

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİNOLON DİRENÇLİ VE DUYARLI İNVAZİV *ESCHERİCHİA*
COLİ KAN İZOLATLARINDA ST131/H30
KLON/SUBKLONUNUN VİRÜLANS İLE İLİŞKİSİ**

Öznur Gürpınar

**Mikrobiyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2018

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİNOLON DİRENÇLİ VE DUYARLI İNVAZİV *ESCHERİCHİA*
COLİ KAN İZOLATLARINDA ST131/H30
KLON/SUBKLONUNUN VİRÜLANS İLE İLİŞKİSİ**

Öznur Gürpınar

**Mikrobiyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Özgen ESER**

**ANKARA
2018**

**KİNOLON DİRENÇLİ VE DUYARLI İNVAZİV *ESCHERİCHİA COLİ* KAN
İZOLATLARINDA ST131/H30 KLON/SUBKLONUNUN VİRÜLANS İLE
İLİŞKİSİ**

Öznur Gürpınar

Prof. Dr. Özgen Eser

Bu tez çalışması 28.06.018 tarihinde jürimiz tarafından “Mikrobiyoloji Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Cumhur ÖZKUYUMCU

(imza)

H.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Özgen ESER

(imza)

H.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Üye:

Prof. Dr. Murat Özsan

(imza)

A.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

12 Temmuz 2018


Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Tezimin 1 Ocak 2020 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

12 / 07 / 2018

Öznur Gürpınar

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Özgen Eser danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

(İmza)

Öznur Gürpınar

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı yapabilmem için bana tüm olanakları sağlayan, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer Prof. Dr. Cumhur ÖZKUYUMCU'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel gelişimime katkıda bulunan ve heyecanıma ortak olan, değerli bilgi birikimiyle yolumu aydınlatan ve beni cesaretlendiren sevgili danışman hocam Prof. Dr. Özgen ESER'e,

Mikrobiyoloji eğitimimin her aşamasında bana katkı sağlayan değerli bölüm hocalarıma,

Tezimin yapımı sırasında katkıda bulunan Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Pınar ZARAKOLU'na,

Dostluklarını ilk günden bu yana hissettiğim başta Özge ALTINOK ve Ecem ÇAĞLAYAN olmak üzere tüm arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan, beni her konuda destekleyen ve yalnız bırakmayan sevgili aileme,

Çok teşekkür ederim.

ÖZET

Gürpınar Ö., Kinolon Dirençli ve Duyarlı İnvaziv *Escherichia coli* Kan İzolatlarında ST131/H30 Klon/Subklonunun Virülans İle İlişkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2018. *Escherichia coli* sekans tipi 131 (ST131) dünya genelinde pandemik bir klon olup antimikrobiyal ilaçlara dirençli enfeksiyonlara yol açmaktadır. Yapılan araştırmalar, *E. coli* ST131 klonunun virülans ve antibiyotik direnç genlerini taşıyabilen dünyada yaygın bir klon olduğunu göstermektedir. Bu klon, özellikle florokinolon dirençli *E. coli* izolatlarında yüksek insidans göstermektedir. Bu klonun Asya ve özellikle Orta Doğu ülkelerinde coğrafik olarak dağılımı hakkında son derece kısıtlı veri bulunmakta olup gelişmekte olan ülkelerde bu klon ile ilgili bilgiler sınırlıdır. ST131 klonunu bu kadar başarılı bir patojen kılan belirli virülans faktörlerin olup olmadığı bilinmeyen bir durumdur. Bu çalışma, Ocak- Aralık 2015 tarihleri arasında bir yıllık bir dönemde Hacettepe Üniversite Hastanesinde takip edilen hastalardan izole edilen tüm invaziv *E. coli* kan izolatlarını kapsamakta ve antimikrobiyal duyarlılık testleri ile antimikrobiyal direnç ve virülans genlerinin moleküler tespitini, ST131/H30 klon/alt klonunun sıklığını belirlemeyi amaçlamaktadır. Bu çalışmada, *E. coli* kan izolatlarında CLSI ve EUCAST önerileri doğrultusunda antimikrobiyal duyarlılık testleri ile genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve karbapenemaz saptanmasına yönelik olarak fenotipik testler uygulanmıştır. Kazanılmış direnç genlerinin; *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48} ve ST131/H30 klon/alt klonu ile virülans genlerinin tespiti polimeraz zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Toplam 152 hastanın ortalama yaşı 60,3±18,6 ve hastanede yatış süresi 25,9±35,1 olarak saptanmıştır. Hastaların yattıkları servislere göre dağılımı acil servis (n=63), yoğun bakım ünitesi (n=29), kemik iliği transplantasyon ünitesi (n=3), onkoloji ünitesi (n=25), cerrahi servis (n=20) ve iç hastalıkları servisi (n=26) olarak belirlenmiştir. Hastane kaynaklı *E. coli* enfeksiyon oranı %53,3, %42, malignite %59,9 olarak bulunmuştur. Bakteriyemi öncesi antibiyotik kullanım oranı %46,1 olup beta laktam/beta-laktamaz inhibitörlerinin kullanımı %24,3, karbapenem kullanımı %14,5 ve florokinolon kullanımı %13,1 olarak belirlenmiştir. Hastalarda idrar ve santral venöz kateter kullanım oranı sırasıyla %36,8 ve %20,4 olarak saptanmıştır. SAM, GEN, AMP, CRO, TMP-SMX, CAZ, CTX ve CIP antibiyotik duyarlılık oranları sırasıyla %23, %32, %65, %23,5, %37, %7,7, %12 ve %53,5 olarak bulunmuştur. Tüm izolatlar IMP ve ERT'e duyarlı olarak saptanmıştır. ST131 156 (%99,4) ve H30 alt klonu 111 (%70,7) izolatta pozitif bulunmuştur. GSBL pozitif saptanan (%53,5) izolatlarda, %49,7 oranında *bla*_{CTX-M} ve %45,2 oranında da *bla*_{CTX-M-15} varlığı tespit edilmiştir. CTX-M-15 pozitif bulunan izolatların %97,2'si H30Rx pozitif bulunmuştur. Karbapenemazlar arasında en sık *bla*_{OXA-48} (%21) saptanırken, bunu *bla*_{NDM-1} (%1,3) ve *bla*_{VIM} (%3,2) takip etmiştir. İzolatlarda *bla*_{KPC} ve *bla*_{IMP} üretimi saptanmamıştır. *E. coli* ST131 izolatlarında virülans genlerinin sıklığı *ompT* (%82,2), *iutA* (%73,2), *usp* (%64,3) ve *papA* (%22,9) olarak belirlenmiştir. Bu çalışma, hastanemizde *E. coli* kan izolatlarında ST131 klonunun yüksek olduğunu göstermiştir. ST131 ile enfekte hastalar sıklıkla hastanede uzun süreli yatış ve bakteriyemi öncesi antibiyotik kullanım öyküsüne sahip immünsuprese hastalardır. Sonuç olarak, ST131 klonu, özellikle H30Rx alt klonu CTX-M-15 tipi GSBL yapımı nedeniyle florokinolanlara belirgin direnç göstermiştir. Virülan invaziv *E. coli* kan izolatlarının tespitini sağlayacak bir belirtecin ortaya konulması, antibiyotiklere dirençli *E. coli* enfeksiyonlarını kontrol edebilecek ve bu enfeksiyonların ampirik tedavisinde akılcı antibiyotik tedavi stratejileri oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, ST131/H30 klon/alt klonu, virülans faktörleri, çok ilaca direnç, antimikrobiyal duyarlılık testleri.

Bu çalışma, 116S009 no'lu proje ile Tübitak 1002 Hızlı Destek Programı tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Gürpınar Ö., Correlation Between ST131/H30 Clone/Subclone and The Virulence in Fluoroquinolone Resistant and Sensitive Invasive Blood Isolates of *Escherichia coli*, Hacettepe University Institute of Health Sciences Microbiology Master of Science Thesis, Ankara, 2018. *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) is a worldwide pandemic clone, causing predominant antimicrobial resistant infections. Subsequent researches have confirmed a worldwide spread of *E. coli* ST131 clone harbouring broad range of virulence and antibiotic resistance genes. A high prevalence of the clone has been identified in fluoroquinolone resistant *E. coli* isolates. Geographical distribution of the clone in Asia and the Middle East is very limited and little is known about the ST131 clone in many parts of the developing world. It has not known if there are certain virulence factors those make this ST131 clone such a successful pathogen. This study included all *E. coli* invasive blood isolates of hospitalized patients during one year period between January-December 2015 in Hacettepe University Hospitals and aimed to determine the antimicrobial susceptibility, molecular detection of antimicrobial resistance genes and virulence factors, and the frequency of ST131/H30 clone/subclones. Antimicrobial susceptibility testing and phenotypic tests of extended spectrum beta-lactamases and carbapenemases of *E. coli* blood isolates were performed and interpreted in accordance with the CLSI and EUCAST criteria. Distribution of acquired antimicrobial resistance genes; *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48} and ST131/H30 clone/subclone and virulence genes were defined using polymerase chain reaction. The mean age of 152 patients was 60.3±18.6 and the mean hospitalization time was 25.9±35.1. Distribution of patients according to the services were emergency services (n=63), intensive care unit (n=29), bone marrow transplantation unit (n=3), oncology unit (n=25), surgical services (n=20) and internal medicine services (n=26). The rate of hospital-acquired *E. coli* infections was 53.3%, mortality was 42%, malignancy was 59.9%. Antibiotic usage rate before bacteremia was 46.1%. Beta lactam/beta-lactamase inhibitors were used in 24.3%, carbapenems in 14.5% and fluoroquinolones in 13.1% of the patients. Urinary and central venous catheterization rate was 36.8% and 20.4% among patients. Antimicrobial resistance rates for SAM, GEN, AMP, CRO, TMP-SMX, CAZ, CTX and CIP were as 23%, 32%, 65%, 23.5%, 37%, 7.7%, 12% and 53.5%, respectively. All isolates were susceptible to IMP and ERT. ST131 was found in 156 (99.4%) and H30 subclone in 111 (70.7%). Among 53.5% ESBL positive isolates, 49.7% were *bla*_{CTX-M} positive and 45.2% were *bla*_{CTX-M-15}. Of the CTX-M-15 positive isolates, 97.2% were identified as H30Rx positive. The predominant carbapenemase was *bla*_{OXA-48} (21%), followed by *bla*_{NDM-1} (1.3%) and *bla*_{VIM} (3.2%). There was no *bla*_{KPC} and *bla*_{IMP} production. Virulence genes *ompT* (82.2%), *iutA* (73.2%), *usp* (64.3%) and *papA* (22.9%) were common in ST131 isolates. This study showed that the presence of ST131 was high in *E. coli* bloodstream isolates in our hospital. ST131-infected patients were frequently immunosuppressed with a long history of hospitalization and antibiotic intake prior to bacteremia was high in these patients. *bla*_{OXA-48} was the most common carbapenemase; *ompT* and *iutA* were the most common virulence genes in ST131 isolates. In conclusion, ST131 clone, in particular the H30Rx subclone showed prominent resistance to fluoroquinolones due to CTX-M-15 type ESBL production. Finding out a parameter to detect virulent clones of *E. coli* in invasive blood isolates may cause to control drug resistant *E. coli* infections and may also cause to set more rational antibiotic strategies in empirical therapy of these infections.

Keywords: *Escherichia coli*, ST131/H30 clone/subclone, virulence factors, multidrug resistance, antimicrobial susceptibility testing.

This study was supported with a grant by TUBITAK 1002 Short Term R and D Funding Program with a Project number 116S009.

İÇİNDEKİLER

Onay Sayfası	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Escherichia coli</i> 'nin Tarihçesi	3
2.2. <i>Escherichia coli</i> 'nin Üreme Özellikleri	3
2.3. <i>Escherichia coli</i> ST131'in Biyolojik Özellikleri	5
2.3.1. Filogenetik Grup ve Serotipler	5
2.3.2. Virülans Faktörlerini Kodlayan Genler ve Virotipler	5
2.3.3. <i>fimH</i> Altıplendirme	6
2.3.4. Klinik İzolatlarda Saptanan <i>E. coli</i> ST131'in Fenotipik Antibiyotik Direnci	6
2.3.5. Klinik İzolatlarda <i>E. coli</i> ST131'in Antibiyotik Direnç Genleri	7
2.4. <i>Escherichia coli</i> ST131'in Patogenik Özellikler	9
2.4.1. <i>E. coli</i> ST131 Enfeksiyonları	9
2.4.2. Bulaş Yolları	9
2.4.3. Biyofilm Üretimi ve Metabolik Potansiyeli	10
2.4.4. Adezyon ve Kolonizasyon	10
2.5. <i>E.coli</i> ST131 Klonunun Epidemiyolojisi	11
2.5.1. <i>E. coli</i> ST131 Klonunun Global Dağılımı	11
2.5.2. <i>E. coli</i> ST131 Klonunun Klinik İzolatlar Arasındaki Prevalansı	12
2.5.3. GSBL Pozitif / FQ Dirençli İzolatlar Arasında <i>E. coli</i> ST131 Prevalansı	12
2.5.4. <i>E. coli</i> İzolatları Arasında <i>E. coli</i> ST131 Prevalansı	13

2.5.5. <i>E. coli</i> ST131 ve <i>E. coli</i> ST131 Alt Klonlarının Moleküler Epidemiyolojisi	14
2.6. Hayvansal ve Gıda Kaynaklı <i>E. coli</i> ST131	15
2.6.1. Gıda Hayvanlarında ve Gıda Maddelerinde <i>E. coli</i> ST131	15
2.6.2. Yabani Hayatta Yaşayan Hayvanlarda <i>E. coli</i> ST131	15
2.6.3. Evcil Hayvanlarda <i>E. coli</i> ST131	16
2.7. <i>E. coli</i> ST131 İzolatlarından Korunma ve Kontrol Önlemleri	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Bakteri İzolatları	17
3.2. İzolatların Tanımlanması	17
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	17
3.3.1. Kullanılan Antibiyotikler	17
3.3.2. İzolatların Hazırlanması	18
3.3.3. Fenotipik Yöntemler	18
3.4. Moleküler Yöntemler	19
3.4.1. DNA İzolasyonu	19
3.4.2. ST131 Klonu ve Alt Klonlarının Moleküler Yöntemle Belirlenmesi	19
3.4.3. Antibiyotik Direnç Genlerinin Moleküler Yöntemle Belirlenmesi	22
3.4.4. Virülans Genlerinin Moleküler Yöntemle Belirlenmesi	27
3.4.5. Agaroz Jel Elektroforezi	32
4. BULGULAR	34
4.1. Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri	34
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	36
4.3. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz ve Karbapenemaz Saptanmasına Yönelik Yapılan Fenotipik Test Sonuçları	37
4.4. <i>E. coli</i> Kan İzolatlarında ST131 Klonu ve Alt Klonlarının Moleküler Sonuçları	37
4.5. Karbapenem Direnç Genlerinin Moleküler Yöntem Sonuçları	39
4.6. GSBL Direnç Genlerinin Moleküler Çalışma Sonuçları	40
4.7. Virülans Genlerinin Moleküler Olarak Saptanması	41
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
7. KAYNAKLAR	49
8. EKLER	61

EK.1 Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar

61

9. ÖZGEÇMİŞ

68



SİMGELER ve KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIEC	Aderan invaziv <i>Escherichia coli</i>
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
DNA	Deoksiribonükleik asit
DM	Diabetes mellitus
EMB	Eosin Methylene Blue
FQ	Florokinolon
GSBL	Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
GSS	Geniş spektrumlu sefalosporin
KAYH	Kronik akciğer yetmezliği hastalığı
KBYH	Kronik böbrek yetmezliği hastalığı
KKYH	Kronik karaciğer yetmezliği hastalığı
İYE	İdrar yolu enfeksiyonu
MGR	Maksimum üreme oranı
MH	Mueller Hinton buyyon
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PFGE	Pulsed-field jel elektroforezi
TE	TRIS-EDTA
TMP-SMX	Trimetoprim-sülfametoksazol
VF	Virülans faktörü

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. “Eosin Methylene Blue (EMB)” besiyerinde metalik röfle veren <i>Escherichia coli</i> .	4
2.2. <i>E. coli</i> ST131 klonunun global dağılımı (2013).	13
4.1. Çalışmaya dahil edilen hastalarda tespit edilen altta yatan hastalıkların yüzdelik dağılımı.	37
4.2. <i>E. coli</i> enfeksiyonu tanısı konulmadan önce kullanılan antibiyotiklerin dağılımı.	38
4.3. <i>E. coli</i> izolatlarına ait ST131, <i>trpA</i> PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	40
4.4. <i>E. coli</i> izolatlarına ait <i>H30</i> alt klonuna ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	40
4.5. <i>E. coli</i> izolatlarına ait <i>H30Rx</i> alt klonuna ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	41
4.6. <i>E. coli</i> ST131 izolatlarına ait antibiyotik direnç geni saptanan <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	41
4.7. <i>E. coli</i> ST131 izolatlarına ait antibiyotik direnç geni olan <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	42
4.8. <i>E. coli</i> ST131 izolatlarına ait GSBL direnç geni olan CTX-M ve CTXM-15 PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	43
4.9. <i>E. coli</i> izolatlarına ait <i>papA</i> virülans geninin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	43
4.10. <i>E. coli</i> izolatlarına ait <i>iutA</i> virülans geninin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	44
4.11. <i>E. coli</i> izolatlarına ait <i>usp</i> virülans geninin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	44
4.12. <i>E. coli</i> izolatlarına ait <i>ompT</i> virülans geninin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	45
4.13. <i>E. coli</i> izolatlarına ait <i>sat</i> virülans geninin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	45

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
3.1. Çalışmada incelenen izolatlarla ilişkin fenotipik GSBL yapımında kullanılan antibiyotik diskleri ve miktarları.	20
3.2. Çalışmada incelenen izolatlarla ilişkin fenotipik karbapenemaz yapımında kullanılan antibiyotik diskleri ve miktarları.	21
3.3. <i>pabB rfb</i> geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.	22
3.4. <i>H30</i> geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.	23
3.5. <i>H30-Rx</i> geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.	24
3.6. <i>bla_{CTX-M}</i> geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.	25
3.7. <i>bla_{CTX-M-15}</i> geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.	26
3.8. <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{OXA-48}</i> genleri için hazırlanan PCR karışımının içeriği.	27
3.9. <i>bla_{VIM}</i> ve <i>bla_{IMP}</i> genleri için hazırlanan PCR karışımının içeriği.	28
3.10. <i>bla_{PER-1}</i> geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.	29
3.11. <i>usp</i> geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.	30
3.12. <i>papA</i> geni için PCR karışım içeriği.	31
3.13. <i>ompT</i> geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.	32
3.14. <i>iutA</i> geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.	33
3.15. <i>sat</i> geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.	34
4.1. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik özellikleri ve risk faktörleri.	36
4.2. İzolatların antibiyotik duyarlılık testi sonucunda elde edilen MİK ₅₀ , MİK ₉₀ değerleri, MİK dağılımı ve direnç oranı.	38
4.3. İzolatların antibiyotik duyarlılık test sonucunda elde edilen antimikrobiyal direnç oranı.	39

1. GİRİŞ

Escherichia coli toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarındaki önemini hala korumaktadır. *E. coli*'nin enfeksiyon etkenleri arasında en sık mikroorganizma olma nedenlerinin başında normal flora elemanı olmasının yanı sıra sahip olduğu virülans faktörleri ve kullanılan antibiyotiklere geliştirdiği direnç gelmektedir. *E. coli*, günümüzde üriner sistem enfeksiyonları başta olmak üzere sepsis, peritonit, yenidoğan menenjit, yara enfeksiyonları gibi birçok enfeksiyondan sorumlu olan bir patojendir (1).

E. coli, ilk kez 1885 yılında Thedor Escherich tarafından bir çocuğun dışkılarından izole edilmiştir ve *Bacterium coli commune* olarak adlandırılmıştır. Bağırsak dışı enfeksiyonlardaki patojenliği tanımlandıktan sonra 1919'da Costellani ve Chalmer tarafından *Escherichia* cins adı önerilmiştir (1).

E. coli, normal bağırsak florasında bulunan, enterik bakteriler ailesinde yer alan basil şeklinde bir patojendir. Boyutları 1-2 µm uzunluğunda ve 0,1-0,5 µm çapındadır (2).

E. coli enfeksiyonları, hasta morbidite ve mortalitesini artırması nedeniyle önemli bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır (1). Dünyada yaygın bir şekilde enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmakta ve hastalık prevalansı %12,5-30 arasında değişmektedir (2). Gerek Amerika Birleşik Devletleri'nde gerekse Avrupa'da büyük bir yaygınlık gösteren ve hem florokinolonlar (FQ)'a hem de geniş spektrumlu beta-laktamlara dirençli olan bu izolatların, ST131 (O25:H24) olarak adlandırılan özel bir *E. coli* klonuyla ilişkili olduğu bulunmuştur. CTX-M-15 tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) oluşturan ve yüksek virülans gösteren bu klon O25b/ST131 olarak adlandırılmıştır (1, 2). O25bST131 klonu, Avrupa ülkeleri; Fransa, Yunanistan, İtalya, Norveç, Türkiye, İspanya, Portekiz, İsviçre, İngiltere'de ve Kanada'da son yıllarda sık olarak görülmektedir (3). Epidemiyolojik olarak enfeksiyona neden olan etken toplum kökenli ve hastane kökenli olabilmektedir. Yaşlılarda ve uzun süreli bakım evinde kalanlarda daha sık görülmektedir. Enfeksiyon ve kolonizasyon prevalansı insanlarda siktir (2).

Enfeksiyon tedavisi sıklıkla ampirik olup tedavi başarısı hızla yayılan antibiyotik direnci nedeni ile güç olmaktadır. Bu tür enfeksiyonların tedavisinde tercih edilen antimikrobiyal ajanlara karşı son zamanlarda yüksek bir direnç gelişmiştir. Günümüzde antibiyotiklerin yaygın ve kontrolsüz kullanılması, yoğun bakım desteği, kemoterapi,

transplantasyon olanakları sayesinde insan ömrünün uzaması, yaşlı popülasyonun artması, invaziv girişimlerin artması antibiyotik tüketiminde artışa neden olmuştur. Tüketimdeki artış direnç problemlerini beraberinde getirmiştir.

Özellikle trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMZ), amoksisilin, amoksisilin/klavulonik asite karşı direnç tüm dünyada giderek artmaktadır. 1980'lerde tedavide kullanılan FQ, geniş spektrumlu sefalosporinlere ve geniş spektrumlu beta-laktamlara karşı direnç son 20 yılda hızla artış göstermektedir. Bu direncin tüm dünyada artmasının nedeni, 2008'den bu zamana kadar dünya çapında hızla yayılım gösteren *E. coli* O25bST131 klonudur (4, 5).

Bu çalışmanın amacı, iki ayrı bilim dalının katkılarıyla tek merkezde yürütülen bu çalışma ile bağırsak dışı enfeksiyonlara, özellikle kan yolu enfeksiyonlarına yol açan *E. coli* izolatlarının doğru tanımlanması, antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi, antimikrobiyal direnç genlerinin ve virülans faktörlerinin belirlenmesi, ST131 klon ve H30-alt klonlarının tespit edilmesidir.

Araştırmaya alınan izolatların tanımlandığı hastaların demografik bilgileri ile risk faktörleri, altta yatan hastalık, immünsupresyon, antibiyotik tedavisi, mortalite vs. özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Escherichia coli*'nin Tarihçesi

E. coli, ilk kez 1885'de Theodor Escherich tarafından ishalleri süt çocuklarının dışkılarından elde edilmiş ve 1919'da Castellani ve Chalmer tarafından *Escherichia* cins ismi önerilene kadar *Bacterium coli commune* ismi ile tanınmıştır (6).

1940'lı ve 1950'li yıllarda insan hastalığıyla ilgili ilk *E. coli* bakterisi olan enteropatojenik *E. coli* suşu bulunmuştur (7). *E. coli* O157:H7'nin klinik önemi ilk olarak 1980'li yıllarda Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde açıklanmış ve birçok morbidite ve mortalite ile ilişkilendirilmiştir (8).

E. coli insan ve birçok hayvan türünün sindirim sistemlerinde yaşayan bir mikroorganizmadır. Bu ilişki simbiyotik bir ilişkidir. Normal bağırsak florasında bulunup canlılığın savunma gücü azaldığında doku ve kana yayılarak enfeksiyon etkeni özelliği taşır (9).

E. coli'nin bağırsakta yapmış olduğu hastalıklar arasında; enteropatojenik *E. coli*, enterotoksijenik *E. coli*, enterohemorajik *E. coli*, enteroinvaziv *E. coli*, enteroagregatif *E. coli* yer almakta olup bunların çoğu gelişmekte olan ülkelerde hastalık oluşturmaktadır (6).

E. coli bağırsaktan dışarı diğer vücut bölgelerine çıkarak dokulara geçtiği zaman bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu enfeksiyonlar arasında; bakteriyemi, neonatal menenjit, üriner sistem enfeksiyonları ve karın içi enfeksiyonlar sık görülenleridir (9).

Bağırsak dışı enfeksiyonlar dünya çapında artış göstererek yüksek boyutlara ulaşmıştır. Her yıl yüz milyonlarca insan etkilenmekte ve bakteriyemi veya sepsis sendromuyla komplikasyon oluşması sonucu ciddi morbidite ve mortalite görülmektedir (6).

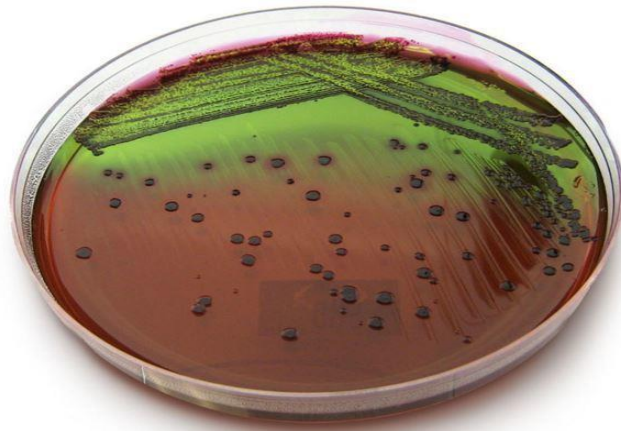
2.2. *Escherichia coli*'nin Üreme Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesinin bir üyesi olan *E. coli*; gram negatif basil, sporsuz, hareketli, ortalama 2-6 mikrometre boyunda ve 1 mikrometre enindedir. Anaerobik koşullarda 37 °C'de seçici ve genel kullanım besiyerlerinde kolaylıkla ürer. Birçok şekeri asit ve gaz yaparak parçalarlar. *E. coli* türlerinin %90'ı laktoz pozitifdir. Kapsül oluşumu nadirdir. Polisakkarit yapısında M antijeni içeren bir mikrokapsül veya yine polisakkarit yapısında K antijenlerini içeren slime tabaka içerebilir (10). *E. coli* bakterileri O somatik antijen ve H kirpik

antijenlerine göre tiplendirilmektedir. Bunların dışında *E. coli* bakteriofajlarına göre faj tiplerine, ayrılırken kolisin tiplerine göre de sınıflandırılmaktadır (11).

E. coli, peptonlu su, buyyon ve jeloz gibi zenginleştirilmemiş besiyerlerinde fakültatif anaerob olarak ürer. Optimal üreme 37 °C'de, nötral pH varlığında olur. *E. coli*, 18-44.5 °C arasında, pH 5- 8 sınırlarında da daha yavaş olarak ürer. Bakterinin 44 °C'de laktozu fermente edebilme ve indol oluşturma özelliği diğer laktozu fermente eden bakterilerden ayırt edilmesinde kullanılmaktadır (12).

E. coli, sıvı besiyerlerinde ürediğinde homojen bulanıklık meydana getirir. Katı besiyerlerinde ise 24 saatte düzgün kenarlı, ortası kalkık, 2-3 mm çapında, pigmentsiz düz koloniler oluşturur. Bazı *E. coli* suşları besiyerinde daha yavaş ürer (10). İndol testi *E. coli* 'de %99 pozitifdir. *E. coli* 'leri diğer *Enterobacteriaceae* türlerinden ayırt edecek tek ve en iyi test olarak değerlendirilir (13). MacConkey agar besiyerinde laktozu fermente ve safrayı presipite ederek kırmızı renkli koloniler oluştururlar. “Eosin Methylene Blue (EMB)” agar besiyerinde laktozu fermente ederek metalik refle veren yeşil siyah koloniler oluşturur (13).



Şekil 2.1. “Eosin Methylene Blue (EMB)” besiyerinde metalik röfle veren *Escherichia coli* (13).

Son zamanlarda, özellikle bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olan patojen *E. coli* suşları, insan ve hayvan enfeksiyonlarını tedavi etmek için verilen birçok antibiyotik grubuna direnç geliştirmiştir. Toplum kökenli *E. coli* enfeksiyonlarını tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX), amoksisilin ve amoksisilin/klavulonik asit gibi birinci basamak oral antibiyotiklere karşı direncin yayılımı zaman içinde istikrarlı bir şekilde artış göstermiştir (14). 1980'lerde FQ ve geniş spektrumlu sefalosporin (GSS)'lerin

piyasaya sürülmesi, tedavi etkinliğine ilişkin beklentileri artırmış ancak daha sonraki gelişmeler beklentileri yarıda bırakmıştır. Aslında, *E. coli* izolatları tarafından geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretilmesine bağlı FQ ve sefalosporinlere karşı direnç, son 20 yılda istikrarlı bir şekilde artmıştır. Bu direncin tüm dünyada artmasının nedeni, 2008'den bu zamana kadar dünya çapında hızla yayılım gösteren *E. coli* O25b/ST131 klonudur (4, 15). *E. coli* ST131'in ilk tanımlanmasından günümüze kadar sekiz yıl geçmiştir.

2.3. *Escherichia coli* ST131'in Biyolojik Özellikleri

Üç kıta üzerinde *E. coli* O25:H4, ST131'in ilk tespit edilmesinden sonra, filogenetik B2 grubunun bu global klonu, “pulsed-field jel elektroforezi (PFGE)” ve çoklu virülans faktörü (VF) gen profil analizi ile gösterilmiştir. Bu klonun yaşamı, çeşitli plazmitler dahil olmak üzere antibiyotiklere karşı direnç gösteren çeşitli genlerin kazanılmasıyla gerçekleşmektedir (5, 6). 2008 yılından bu yana yapılan birçok çalışma, *E. coli* ST131'in kesin doğasını belirlemek amacıyla bu özelliklere odaklanmıştır (2).

2.3.1. Filogenetik Grup ve Serotipler

E. coli türleri toplam dört ana filogenetik gruba ayrılmış durumdadır. Bunlar A, B1, B2 ve D'dir. Kommensal *E. coli* izolatları esas olarak A ve B1 filogenetik gruplara ait olup, bağırsak dışı patojen suşlar B2 ve D gruplarında bulunmaktadır. *E. coli* ST131, bağırsak dışı enfeksiyonlardan sorumlu her iki suşu ve asemptomatik insanların dışkılarından en sık izole edilen suşları içeren filogenetik B2 grubuna aittir (16, 17). Yapılan çalışmalar sonucunda, Le Gall ve arkadaşları (18) Grup B2'de dokuz alt grup tespit etmiştir. Clermont ve arkadaşları (11) ise B2 suşlarının bazal alt grubu olduğu öne sürülen alt grup I'de *E. coli* ST131 olduğunu tespit etmiştir.

E. coli ST131 suşlarının içinde en sıklıkla O25b:H4 serotipi bulunmaktadır. Bu serotip dışında ayrıca O16:H5 serotipi de yer almaktadır. O16:H5 serotipi son zamanlarda Japonya, Danimarka, Avustralya, İspanya, Pakistan ve Fransa'da tespit edilmiştir (19, 20). Ayrıca, O ve H antijenleri için tiplendirilmesi yapılamayan *E. coli* ST131 izolatları bulunmaktadır (20, 21).

2.3.2. Virülans Faktörlerini Kodlayan Genler ve Virotipler

Grup B2 suşlarının, diğer *E. coli* gruplarına kıyasla çok daha fazla virülans faktörü (VF) kodlayan gen barındırdığı bilinmektedir (22). Bu nedenle, *E. coli* ST131 izolatlarının VF gen kompozisyonunu araştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Kıtalar arası *E. coli* ST131 izolatlarında adezin kodlayan P fimbria *pap* genleri ve klasik B2 grubu sitotoksik nekrotizan

faktör (*cnf1*) genlerinin bulunmaması bu çalışmaların başlıca bulgularıdır (23). Bu bulgunun aksine, bazı VF genlerinin, *E. coli* ST131 izolatlarında sıklıkla mevcut olduğu bulunmuştur. Bunlar; *sat* (secreted autotransporter toksin), *fimH* (tip 1 fimbriya), *fyuA* (yersiniabactin reseptör), *kpsM II* (grup 2 kapsül sentezi), *usp* (üropatojen-spesifik protein), *malx* (patojenite adası belirteçleri), *iha* (adezin siderofor reseptörü), *ompT* (dış zar reseptörü), *iucD* (aerobactin), *iutA* (aerobactin receptor) ve *tratT* (serum direnci) genleridir (4, 23-25). Bu çalışmalar, *E. coli* ST131 izolatlarında farklı VF profillerini karakterize eden, çoğu spesifik PFGE kümeleri halinde gruplandırılabilen birkaç VF kodlayan gen tespit etmiştir (20). Blanco ve arkadaşları (24) bu VF profillerini "virotip" olarak adlandırmış ve onları tanımlayan bir dizi VF kodlayan gen tespit etmiştir.

Bu genlerden bazıları klasik olarak ST131 olmayan grup B2 bağırsak dışı patojen suşlarda tanımlanan VF genleridir: *afa/draBC* (*Afa/Dr* adezin kodlayan), *papG* (P fimbrial adezinler) ve *cnf1* ve *hlyA* (alfa hemolizin) gibi toksin genleri. Virotip D ve subvirotiplerini tanımlamak için kullanılabilen *ibeA* (invasion of brain endothelium) geni daha önce ortaya çıkan O25b:H4 ST131 izolatlarında daha önce bildirilmiştir (26). *Afa/draBC* dışında, ST131 olarak tanımlanan ilk suşlarda, farklı ülkelerden köken aldıkları halde, bu virotip ayırıcı VF genlerinden hiçbiri bulunamamıştır (23).

2.3.3. *fimH* Altıplendirmesi

Diğer *E. coli* izolatları gibi tüm *E. coli* ST131 izolatları da *fimH* genini içerirler (27). Bu sayede alelik çeşidi yüksek derecede görüntülenebilmektedir (28, 29). FimH tip bölgesi (*fimH_{TR}*) çok sayıda çeşitli aleller taşımaktadır (30). Adams-Sapper ve arkadaşları (31) bakteriyemi etkeni olan 246 *E. coli* izolatını MLST ve *fimH* alt tiplendirme yöntemleriyle tanımlayarak en sık görülen üç *fimH* tipinin *E. coli* ST131 izolatlarının %96'sını oluşturduğunu göstermiştir. Johnson ve arkadaşları (32) 1967-2011 yılları arasında izole edilen 352 ST131 suşunun alt klonal yapısını araştırmış ve en sık rastlanan *fimH30* ($n=236$; %67) dışında yedi tane *fimH* türü tanımlamışlardır. *fimH30*'un ardından tanımlanan türler arasında *fimH22* ($n=73$; %21), *fimH35* ve *fimH41* yer almaktadır. *E. coli* ST131 izolatlarında ki *fimH* alellerinin çeşitliliği moleküler yöntemler ile araştırma aşamasındadır.

2.3.4. Klinik İzolatlarda Saptanan *E. coli* ST131'in Fenotipik Antibiyotik Direnci

Ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalarda saptanan patojenler için ortak özellik, giderek artan direnç oranlarıdır. Enfeksiyon tedavisi sıklıkla ampirik olup tedavi başarısı hızla

yayılan antibiyotik direnci nedeni ile güçleşmektedir. Bu tür enfeksiyonların tedavisinde sık kullanılan antimikrobiyal ilaçlara karşı son zamanlarda yüksek oranda direnç gelişmiştir.

Enfeksiyonlarda ilk seçenek olarak kullanılan TMP-SMZ, amoksisilin, amoksisilin/klavulonik asit gibi antibiyotiklere karşı direnç tüm dünyada son zamanlarda artış göstermektedir. 1980'lerde tedavide kullanılmak üzere piyasaya sürülen FQ ve GSS kısa sürede ortaya çıkan direnç nedeniyle etkisini kaybetmeye başlamıştır. Geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi nedeniyle *E. coli* izolatlarında son 20 yılda FQ ve GSS direnci hızla artış göstermiştir. Bu direncin tüm dünyada artmasının nedeni, 2008'den bu zamana kadar dünya çapında hızla yayılım gösteren *E. coli* O25b/ST131 klonudur (4, 5).

Tüm kıtalar arası *E. coli* ST131 izolatlarında ortak olarak tespit edilen iki özellik vardır. Bunlardan birincisi GSBL CTX-M-15'in üretilmesine bağlı olarak sefalosporinlere, ikincisi ise FQ'lara karşı direnç gelişimidir (23, 33). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda, GSBL üretmeyen, FQ dirençli *E. coli* izolatları arasında ST131 klonunun yüksek prevalans gösterdiği tespit edilmiştir (34, 35). Kanada'da Saskatchewan topluluklarında yapılan bir çalışmada, ST131 klonunun, incelenen GSS ve FQ'a duyarlı idrar izolatları arasında ST95'den sonra, ikinci en yaygın klon olduğu gösterilmiştir (36). Antibiyotiklere duyarlı olan *E. coli* ST131 izolatları, Paris bölgesinde yaşayan sağlıklı bireylerin fekal *E. coli* popülasyonlarında da tespit edilmiştir (37). Bu nedenle, antibiyotik duyarlılığının *E. coli* ST131 izolatlarında var olduğu açıktır. Çok az sayıda çalışmada, *E. coli* ST131 izolatlarındaki çeşitli antibiyotiklere direnç hakkında bilgi sağlanabilmiş ve sonuçlar, GSBL üreten veya üretmeyen ST131 *E. coli* izolatları ile karşılaştırarak elde edilmiştir. Bu çalışmalar, GSBL üreten izolatlar içinde, *E. coli* ST131 izolatlarının amikasin, amoksisilin-klavulonik asit, piperasilin-tazobaktam veya siprofloksasine ST131 dışındaki izolatlara göre daha sık dirençli olduğunu göstermiştir. Ayrıca, ST131 dışındaki izolatlara gentamisin veya ko-trimoksazole daha sık duyarlılık göstermektedir. GSBL üretmeyen izolatlar içinde ise, *E. coli* ST131 izolatlarının, kinolon/FQ'lara ve ampisilin/amoksisikline karşı daha sık dirençli olduğu bulunmuştur (2, 38, 39).

2.3.5. Klinik İzolatlarda *E. coli* ST131'in Antibiyotik Direnç Genleri

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, plazmitlerce kodlanan ve penisilin, sefalosporin ve monobaktam gibi beta-laktam antibiyotiklerin çoğuna direnç kazandıran enzimlerdir (40). 1990'ların ortalarına kadar başlıca GSBL'ler, daha çok hastane ortamındaki *Klebsiella* türlerince oluşturulan TEM ve SHV türevleri iken; bugün başlıca GSBL üreten bakteriler *E. coli*'ye ait en yaygın GSBL enzimi ise özellikle sefotaksim üzerinde etkili olan ve

ilk kez Münih'te izole edilen CTX-M olmuştur. Bu enzimlerin en yaygın ve dünya çapında bir dağılıma sahip olanı CTX-M-15'dir. CTX-M enzimlerinin -1, -2, -3, -9, -10, -14, -18, -24, -27, -28, -32, -39, -52, -55, -65, 103 tipleri de tespit edilmiştir (11, 20, 38, 40-42). CTX-M-14 üreten ST131; Kanada, Çin, Japonya ve İspanya'da, CTX-M-3 üreten ST131; Birleşik Krallık'ta ve CTX-M-27 üreten ST131 ise genellikle Fransa, Japonya ve İsviçre'de yaygındır (19, 20, 43-45).

CTX-M olmayan diğer GSBL Ambler sınıf A enzimleri de *E. coli* ST131 izolatlarında tanımlanmıştır. Bu enzimler, SHV ailesinin türevlerini (SHV-2 ve SHV-12) (46, 47) ve TEM ailesinin türevlerini (TEM-24 ve -52) içermektedir (11, 48). Bu enzimleri kodlayan genler ise; *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV} genleridir (46, 49, 50).

A sınıfı karbapenemaz KPC-2 *E. coli* ST131 izolatlarında, Birleşik Devletler'de yedi izolatta, Fransa'da bir izolatta, İrlanda'da bir izolatta tespit edilmiştir (51, 52). *E. coli* ST131 izolatlarından Ambler sınıf B enzimleri yalnız birkaç çalışmada bildirilmiştir: NDM-1 (Hindistan'da iki olgu), VIM-1 (İtalya'da bir olgu) ve IMP-8 (Tayvan'da bir olgu). Yapılan çalışmalarda ST131 izolatlarında Ambler sınıf C enzimleri B sınıfı enzimlere göre daha sık tespit edilmiştir. Tespit edilen C sınıfı enzimler, CMY-2 ve CMY-4, nadiren de DHA-1 olarak tanımlanmıştır (46, 53, 54). Son olarak, OXA-48 gibi Ambler sınıf D beta-laktamazlar ST131 izolatlarında nadiren bulunmuştur (55, 56).

CTX-M-15 enzimleri ile ilişkili olarak, hem aminoglikozitlere (amikasin ve tobramisin) hem de siprofloksasine direnç kazandıran bir diğer direnç geni olan *aac* (6')-*Ibc*r sıklıkla tespit edilmiştir (33, 53, 57, 58). İspanya ve Portekiz'deki birkaç çalışma, ST131 izolatlarında klinik etki oluşturan başka bir kinolon mekanizması olan *qnr* belirteçlerinin saptanmasını bildirmiştir (59, 60). *E. coli* ST131 izolatlarındaki FQ direnç kazandırdığı bildirilen ana mekanizma, kinolon/FQ'ların hedefleri olan *gyrA* ve *parC* mutasyonları kinolon direnç belirleme bölgelerindeki aminoasit yerine girerek kinolon direncine neden olmaktadır (23, 32, 34, 61). Çalışmalar FQ'lara dirençli olan *E. coli* ST131 izolatlarında bu duruma neden olan enzimin CTX-M-15 olduğunu göstermektedir (33, 62, 63). Bu durum, *bla*_{CTX-M-15} geninin plazmitten kromozoma transfer olduğunu düşündürmektedir (63).

2.4. *Escherichia coli* ST131'in Patojenik Özellikler

2.4.1. *E. coli* ST131 Enfeksiyonları

E. coli ST131 suşları, dünya çapında toplum ve hastane kökenli idrar yolları enfeksiyonu ve bakteriyemiye neden olmaktadır (31, 64, 65). Ayrıca, ST131 klonunun karın içi ve yumuşak doku enfeksiyonları (39), menenjit (66), osteoartiküler enfeksiyon (67), miyozit ve septik şok (68, 69) gibi başka hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir.

2.4.2. Bulaş Yolları

ST131 klonunun bulaşının aynı evde yaşayan aile üyeleri ve hayvanlar arasında olduğunu gösteren birkaç çalışma bulunmaktadır (70).

Ender ve arkadaşları (68) bir baba ile kızının arasındaki gentamisin, trimetoprim-sülfametoksazol ve FQ'lara dirençli bir CTX-M-15 pozitif ST131 izolatının iletilmesine dair güçlü kanıtlar bulunduğunu göstermiştir. Baba ST131 kaynaklı pyelonefrit nedeniyle hastaneye yatırıldığı zaman yetişkin kızı tarafından ziyaret edilmiş ve babasının tuvaletini kullanmıştır. Bir süre sonra kızda da aynı ST131 suşundan kaynaklanan amfizematöz piyelonefrit, renal abse, bakteriyemi, septik şok tablosu gelişmiştir. Bu çalışma ile ST131 suşunun ilk kez virulan olduğu ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, bu suşun virülans gen profili klasik bir virotip A suşu olarak tanımlanmıştır.

Johnson ve arkadaşları (67)'nin yapmış olduğu bir çalışmada ise, osteoartikül enfeksiyonu olan 8 aylık bir kız ile daha önce sağlıklı olan kızın annesi arasında bir ST131 suşunun ev içinde bulaşmasına dair yeni kanıtlar gösterilmiştir. Her iki hastanın sindirim sisteminde aynı ST131 suşu tespit edilmesine rağmen, enfeksiyonun hangi yolla bulaştığı belirsizliğini korumaktadır. Bu çalışmada tespit edilen ST131 suşu FQ dirençli ve GSBL oluşturan bir suştur.

Owens ve arkadaşları, CTX-M-15 üreten FQ'a dirençli ST131 suşunun toplumla ilişkili intrafamilial yayılımını gösteren ölümcül bir ürosepsis olgusu bildirmiştir. *E. coli* nedeniyle kronik, tekrarlayan semptomatik idrar yolu enfeksiyonu olan orta yaşlı bir kadın hasta incelenmiştir. Kadın hasta ve kız kardeşinde özellikle küçük kız kardeşte şiddetli olan alfa-1-antitripsin eksikliği saptanmıştır. Hastanın enfeksiyonu başlamadan birkaç ay önce ablasına bakım veren küçük kız kardeşte bir süre sonra pyelonefrit ve septik şok gelişmiştir. Kız kardeş hastaneye yattıktan kısa bir süre sonra ölmüştür. Bu çalışma, aile üyeleri arasındaki bulaşı göstermektedir (69).

Sonuç olarak, ST131 suşları dahil *E. coli* suşlarının, aynı evdeki insan ve hayvan üyeleri arasında, muhtemelen doğrudan konak-konak bulaşı ile ortaya çıkan antimikrobiyal etkileri toplum çapında patojenin yaygınlaşmasına neden olmaktadır.

2.4.3. Biyofilm Üretimi ve Metabolik Potansiyeli

Bakterinin canlı ve cansız yüzeylere tutunması biyofilm yapımıyla olmaktadır. Biyofilm, bir yüzeye yapışan ve bakterinin ürettiği polisakkarit matriks içerisinde üreyen, uzaklaştırılması zor mikroorganizma tabakası anlamına gelmektedir (71). Bakterilerin yüzeylere tutunma ve biyofilm oluşturma mekanizması çok geniş hücrel ve çevresel etkenlere bağlıdır (72).

Çok az sayıda çalışma, *E. coli* ST131 izolatlarının biyofilm üretimini ve metabolik potansiyelini araştırmış olmakla birlikte, bu çalışmaların sonuçları uyumlu bulunmuştur. Clermont ve arkadaşları (40), incelenen iki ST131 suşunun 48 saat sonra bir biyofilm ürettiğini ve Kudinha ve arkadaşları (73) ise biyofilm üreten izolatların prevalansının ST131 *E. coli* izolatları arasında ST131 olmayan klinik izolatlardan daha fazla olduğunu bulmuştur.

Vimont ve arkadaşları, test edilen ST131 izolatının üç kültür kümesi seti altında (glukonat veya glikoz içeren zengin iki minimal besiyeri içerisinde) maksimum üreme oranını (MGR) ölçerek sindirim sistemini kolonize etme kapasitesini araştırmıştır. Elde edilen sonuçlar, ortak *E. coli* K-12 MG1655 ve iki farklı suş olan CFT073 ve HT7 ile karşılaştırıldığında ST131 suşunun, diğer üç suştan istatistiksel olarak daha yüksek MGR'ye sahip olduğunu göstermiştir (74).

Bu veriler, *E. coli* ST131'in yüksek bir metabolik potansiyele sahip olduğunu, ayrıca kolonize olma ve bu kolonizasyonu sürdürme yeteneğinin olduğunu göstermekle birlikte, bu konuda daha ileri çalışmaların yapılmasının gerek olduğunu işaret etmektedir.

2.4.4. Adezyon ve Kolonizasyon

E. coli ST131 izolatlarının adezyon ve kolonizasyonunu araştıran çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Aderan invaziv *E. coli* (AIEC) ve ExPEC suşlarının benzerliğini ve farklılığını karakterize eden Martinez-Medina ve arkadaşları (75), test edilen 12 ExPEC ST131 suşundan birinin AIEC fenotipine sahip olduğunu ve iki diğer ST131 AEIC suşlarına %50 benzerlik gösterdiğini keşfetmişlerdir. Bu özellikler arasında, bağırsak epitel hücrelerine yapışma ve istila etme yeteneği ve makrofajlar içinde hayatta kalma ve replikasyon yapma yeteneğinin bulunduğu düşünülmektedir.

Adezyon ve kolonizasyonu belirlemek için deneysel fare modellerinde böbrek ve bağırsakta kolonize olmuş virotip C *E. coli* ST131 suşunun yeteneği araştırılmıştır. Karışık olan ST131 suşlarından; komensal *E. coli* K-12 MG1655 (filogenetik A grubu), komensal *E. coli* IAI1 (B1 grubu) ve komensal *E. coli* ED1a (B2 grubu) hazırlanmıştır. Farelere her bakteri karışımından 10^6 cfu/ml dozunda ağızdan uygulanmıştır. ST131 suşu, *E. coli* K-12 MG1655 veya *E. coli* ED1a'ya göre, sindirim kanalındaki *E. coli* IAI1'den daha kolay farenin sindirim sisteminde tespit edilmiştir. Ayrıca ST131 suşunun mesane ve böbrek kolonizasyon kabiliyeti, *E. coli* suşları CFT073 (B2 grubu ST73) ve HT7 (B2 grubu ST95) ile karşılaştırılmıştır. Yedi gün inkübasyon sonunda idrar kesesindeki ortalama cfu miktarı ST131 suşunda, ST95 suşuna göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. ST73'e göre de cfu miktarı ST131'de yüksektir (74). ST131 suşları da diğer suşlar gibi böbrekte enflamatuvar yanıtı neden olmaktadır (75).

Tip 1 fimbria *fim* geni tarafından kodlanır ve üropatojenik *E. coli* içinde önemli bir virülans faktörüdür (76). İngiltere'nin kuzeybatısında dolaşan ST131 CTX-M-15 pozitif suşların bir temsilcisi olan ST131 EC958 suşunun *fim* operon dizisini analiz eden bir çalışmada; bu suşun *fimB* geninde ISL3 benzeri olduğunu keşfetmişlerdir (77).

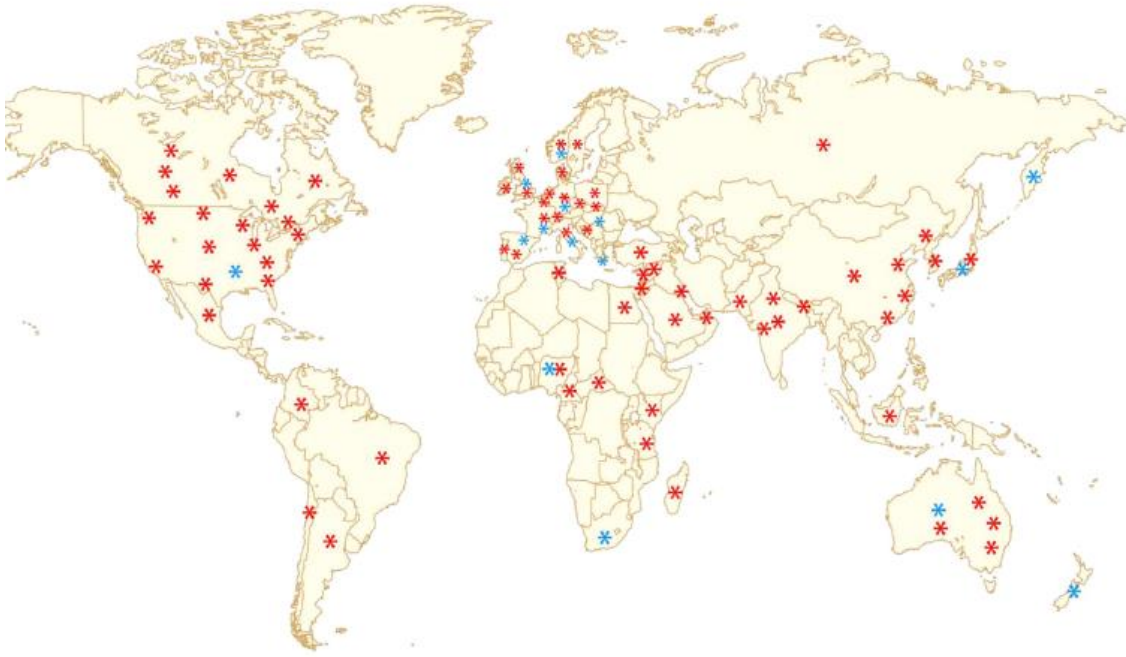
İn vitro fonksiyonel deneyler ile tip1 fimbria üzerine çalışmalar yapılmıştır. Yaşlı hastaların idrar örneklerinden 55 *E. coli* ST131 tanımlanmış ve bu izolatların epitel hücrelerine tutunma yeteneği tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda epitel hücrelerine tutunma yeteneği %56 oranında güçlü, %30 oranında orta, %14 oranında ise sınırlı olarak bulunmuştur (78).

İki klinik *E. coli* ST131 izolatının (biri karbapenemaz NDM-1 pozitif ve diğeri GSBL CTX-M-15 pozitif) insan bağırsak hücrelerine yapışmasını değerlendirildiğinde; bu iki izolatın B1 ve D gruplarındaki diğer izolatlardan daha az yapıştığını tespit etmişlerdir (79).

2.5. *E.coli* ST131 Klonunun Epidemiyolojisi

2.5.1. *E. coli* ST131 Klonunun Global Dağılımı

2008 yılında *E. coli* ST131 suşunun ilk tanımlanmasının ardından üç kıta üzerinde bulunan ülkelerde; Kuzey Amerika'da Kanada, Avrupa'da Fransa, Portekiz, İspanya, İsviçre, Asya'da Hindistan, Güney Kore, Kuveyt, Lübnan çok sayıda tespit edilmiştir (23, 33). Bu klon, bu üç kıta ile birlikte son zamanlarda diğer iki kıta olan Afrika ve Okyanusya'da bulunan birçok ülkede de tespit edilmiştir (80). Kıtalar üzerindeki ST131 dağılımı Şekil 2.2'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. *E. coli* ST131 klonunun global dağılımı (2013). Kırmızı yıldızlar GSBL pozitif izolatlar, mavi yıldızlar florokinolon dirençli ve GSBL içermeyen izolatları göstermektedir (2). Avrupa için kaynaklar; Belçika (81, 82), Hırvatistan (83), Çek Cumhuriyeti (84), Danimarka (85), Fransa (23), Almanya (86, 87), İtalya (88), Hollanda (80), Norveç (89), Portekiz (23), İspanya (23), İsveç (90), İsviçre (23). Asya için kaynaklar; Çin (50), Hindistan (91, 92), İsrail (93), Japonya (21, 50, 94, 95), Güney Kore (23), Kuveyt (23), Lübnan (23), Pakistan (96), Rusya (97), Türkiye (98) ve Birleşik Arap Emirlikleri (99). Amerika için kaynaklar; Kanada (23, 35, 100), Amerika Birleşik Devletleri (4, 31, 32), Arjantin (101), Brezilya (102), Kolombiya (103) ve Meksika (104). Afrika için kaynaklar; Kamerun (105), Orta Afrika Cumhuriyeti (73), Mısır (106), Kenya (107), Madagaskar (108), Nijerya (109), Güney Afrika (110), Tanzanya (111) ve Tunus (112). Okyanusya için kaynaklar; Avustralya (113, 114) ve Yeni Zelanda (115).

2.5.2. *E. coli* ST131 Klonunun Klinik İzolatlar Arasındaki Prevalansı

Dünyada tanımlanan ilk klinik *E. coli* ST131 izolatları üç büyük epidemiyolojik özellik ile karakterize edilmiştir (2). Tespit edilen tüm izolatlar; CTX-M-15 tipi GSBL pozitif, FQ'lara dirençli ve hem hastane hem de toplumda enfeksiyonlara neden olmaktadır (116). Bu nedenle, bu özellikler *E. coli* ST131 prevalansını değerlendirmek amacıyla popülasyon özelliği olarak kullanılmıştır (2).

2.5.3. GSBL Pozitif / FQ Dirençli İzolatlar Arasında *E. coli* ST131 Prevalansı

Tüm örnek türleri dikkate alındığında, GSBL pozitif *E. coli* izolatları arasında *E. coli* ST131 prevalansı, 2006-2011 yılları arasında Avrupa'da (Avrupa'daki beş ülke için ortalama) %39, İspanya'da %22, Birleşik Krallık'ta %66 arasında değişmektedir (42, 45, 49, 78, 117). İspanya'da Galicia ve Katalonya'da yapılan iki ayrı hastanede 2009-2011 yılları arasında

yapılan araştırmada, bu dönemler arasındaki prevalansta belirgin bir artış olduğu tespit edilmiştir. Bu oran, 2006'da %22 iken 2008'de %32'ye çıkmıştır. ABD'nde ise, *E. coli* ST131 sıklığı sırasıyla, genel popülasyonda, çocuklarda ve gazilerde GSBL pozitif *E. coli* izolatlarının %54, %10 ve %64'ünü oluşturmaktadır (118, 119). 2007-2009 yılları arasında Kanada'da yapılan çalışma sonucunda bu tür izolatların %50'sini, 2008-2011 yılları arasında da Japonya'da yapılan çalışmada bu tür izolatların %52'lik kısmını oluşturduğu bildirilmektedir (120, 121).

İdrar yolu enfeksiyonu (İYE) olan hastalar incelendiğinde GSBL pozitif *E. coli* ST131 prevalansı; Fransa'da 2006 yılında %21, Meksika'da 2006-2007 yılları arasında %25, İsveç'teki hastanelerde 2007-2011 yılları arasında %34 ve Hindistan'da 2009 yılında %70 olduğu yapılan çalışmalar sonucunda bildirilmiştir (122-124).

Kan izolatlarında yapılan çalışmalara göre, bakteriyemiye neden olan GSBL pozitif *E. coli* izolatlarının prevalansı; 2000-2010 yılları arasında Kanada'da yapılan çalışmalar sonucunda %60, 2005 yılında Fransa'da %32, 2006-2011 yılları arasında ise Güney Kore'de %20 olduğu bildirilmiştir (47, 125, 126).

Kanada'da yapılan bir çalışmada, yurt dışından dönen yolculardan alınan dışkı örneklerinde GSBL pozitif *E. coli* izolatları arasında *E. coli* ST131 prevalansı belirlenmiştir. Ayrıca, *E. coli* ST131'i CTX-M-15 ve CTX-M-14 üreten izolatlar arasında araştırılmış ve sonuç olarak Kanada'da %53 oranında CTX-M-15 ve CTX-M-14 üreten *E. coli* ST131 izolatına rastlanmıştır (58, 126).

2.5.4. *E. coli* İzolatları Arasında *E. coli* ST131 Prevalansı

İspanya'da 2009 yılında birkaç farklı merkez tarafından idrar örneklerinde yapılan çalışma sonucunda *E. coli* izolatları arasında *E. coli* ST131 prevalansı %12 iken aynı çalışma 2011 yılında tekrarlandığında prevalansın %22'ye yükseldiği tespit edilmiştir (127).

Genel popülasyon üzerine yapılan dört çalışma sonucunda, herhangi bir tipteki örnekten GSBL pozitif ve pozitif olmayan izolatlar karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalar GSBL pozitif olmayan izolatlar arasında *E. coli* ST131'in benzer prevalansını bildirmişlerdir: Fransa'da 2008-2009 yılları arasındaki prevalans %10, İspanya'da 2010 yılındaki prevalans %12 ve ABD'nde 2007-2012 yılları arasında yapılan diğer iki çalışmanın her birinde de prevalans %13'tür. Bununla birlikte, GSBL pozitif izolatlar arasında bildirilen prevalans; Amerika Birleşik Devletlerinde %49-50, Fransa'da %36 ve İspanya'da %23 olarak tespit edilmiştir (1, 38, 39, 57).

Avustralya’da İYE olan çocuk ve üreme çağındaki kadınlar üzerine yapılan bir çalışmada; çocuklardaki prevalans %30, üreme çağındaki kadınlardaki prevalansın ise %13 olduğu bildirilmiştir (40, 128).

ABD’de toplum veya hastane kökenli İYE olan yaşlı hastalarda yapılan çalışmada ise; *E. coli* izolatları arasındaki *E. coli* ST131 prevalansı %22 olarak bulunmuştur (58).

2.5.5. *E. coli* ST131 ve *E. coli* ST131 Alt Klonlarının Moleküler Epidemiyolojisi

Virotip sayesinde fenotipik, genotipik, epidemiyolojik veya klinik özellikler arasındaki ilişkiler belirlenmektedir (24). A ve B virotiplerinin tüm izolatları ve virotip C’nin %63’ü CTX-M-15 üretirken, virotip D izolatlarından hiçbirinde bu enzim tespit edilememiştir. Buna karşılık, virotip D izolatları CTX-M-9 enzimleri, SHV-12 ve CTX-M-32 üretmektedir. Siprofloksasin direnci virotip A, B ve C izolatlarıyla anlamlı olarak ilişkilendirilmiştir (58, 129).

Tüm virotip D izolatlarının bir *fimH22* genine sahip olduğu ve *fimB* geninde ISL3 benzeri bir transpozaz içermediği düşünülürken, virotip A, B ve C izolatlarının tümü *fimB30* geninde *fimH30* ve bir ISL3 benzeri transpozaz içermektedir.

Dört virotipinin demografik verilerle ve enfeksiyonun edinimi ve türü ile ilişkileri de araştırılmıştır. Virotip B’nin özellikle idrar yolu enfeksiyonu olan yaşlı hastalarla anlamlı derecede ilişkili olduğu gösterilmişken, virotip C’nin de semptomatik enfeksiyon olasılığı ile anlamlı derecede ilişkili olduğu bildirilmiştir (130). Virotip D, daha genç yaştaki hastalar ve toplum kökenli enfeksiyonlarla anlamlı şekilde ilişkilidir. Virotip A ve B de, sağlık bakım evlerinde yaşayan insanlarda virotip C ve D’den daha güçlü bir ilişki sergilemektedir (107).

Çeşitli çalışma grupları benzer epidemiyolojik yaklaşımları ST131 alt klon H30, H30-R ve H30-Rx içinde incelemiştir. ABD’nin Minnesota eyaleti Olmsted bölgesinde toplam 299 bağırsak dışı *E. coli* izolatında yapılan araştırmada, ST131 klonunun özellikle yaşlı insanlarda ve sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlarda yaygın olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde hastane enfeksiyonlarında antimikrobiyal ilaçlara dirençli olan *E. coli* ST131 H30 alt klonunun da daha hakim olduğu izlenmiştir (131). Fransa’daki gündüz bakım evlerine gelen çocukların dışkı örneklerinde tanımlanan GSBL pozitif *E. coli* ST131 izolatları arasında H30 ST131 alt klonunun baskın olduğu bulunmuştur (96). Şikago’da yapılan çalışmada, çalışma bölgesinde H30 ST131 alt klonunun, H30 olmayan ST131 alt klonlarına göre daha geniş yayılım gösterdiği ve CTX-M-15 pozitif ST131 izolatlarının hemen hemen sadece H30-Rx alt klonu olduğu tespit

edilmiştir. Bu izolatların non-ST131 izolatlarına göre VF skorları daha yüksek bulunmuştur (132).

Bu moleküler analizler *E. coli* ST131 alt klon dağılımının, enfeksiyonun başladığı yere (toplum/hastane), hastanın yaşına ve izolatın antibiyotik duyarlılığına bağlı olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, tıbbi uygulamalar için önemli sonuçlar doğuran bu bulgular, farklı ülkelerdeki diğer popülasyonlarla ilgili çalışmaların onaylanmasını gerektirmektedir (63).

2.6. Hayvansal ve Gıda Kaynaklı *E. coli* ST131

Hayvan veya yiyecekler üzerinde bulunan *E. coli* ST131 izolatları çok az sayıda çalışmada rapor edilmiştir. Bu yüzden de hayvan ve insanlar arasındaki *E. coli* ST131'in global gelişimini değerlendirmek güçtür.

2.6.1. Gıda Hayvanlarında ve Gıda Maddelerinde *E. coli* ST131

Gıda hayvanlarında *E. coli* ST131 varlığı birkaç çalışmada incelenmiştir.

Türkiye'den İtalya'ya gönderilen sağlıklı tavuklarda 101 (%0,9) *E. coli* izolatı tanımlanmıştır. Bunlar arasından sadece bir tanesinin FQ duyarlı ve GSBL negatif *E. coli* ST131 klonu olduğu bildirilmiştir (133).

Başka bir çalışmada, farklı hayvan türlerinde (domuz, kümes hayvanları ve sığır) tespit edilen 1.378 *E. coli* izolatının 22'si GSBL pozitif bulunurken, GSBL pozitif olan izolatlar arasında sadece bir tane *E. coli* ST131 klonu tanımlanmıştır. Bu *E. coli* ST131 izolatının da, CTX-M-1 pozitif olduğu tespit edilmiştir (134).

Çin'de yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada ise; 896 *E. coli* ST131 izolatının 326'sı domuzlardan, 316'sı tavuklardan, 88'si sığırlardan, 58'i ördeklerden, 22'si kazlardan, 61'i güvercinlerden ve 25'i keklüklerden izole edilmiştir (135, 136).

2.6.2. Yabani Hayatta Yaşayan Hayvanlarda *E. coli* ST131

Gıda hayvanlarında *E. coli* ST131 varlığını araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. Halen dünya çapında antimikrobiyal ilaç direnç verileri, çevresel rezervuarların direnç genlerinde ve çok ilaca dirençli bakterilerin seçilmesinde ve yayılmasında önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, vahşi doğada yaşayan hayvanlar neredeyse bir direnç vektörüdür (116).

Rusya’da 2010 yılında mat mavi kanatlı martılarda 532 *E. coli* izolatu tanımlanmıştır. Bu izolatlardan dördü GSBL pozitif *E. coli* olup bunlar arasında yalnız bir ST131 klonu tespit edilmiştir (97).

Portekiz’de yapılan çalışmada; martıların dışkılarından izole edilen GSBL pozitif 45 *E. coli* suşunun dördünde ST131 tespit edilmiştir (137).

Almanya’da yapılan bir çalışmada ise, 220 Norveç sıçanından (*Rattus norvegicus*) elde edilen tek GSBL pozitif *E. coli* izolatının ST131 klonuna ait olduğu bildirilmiştir (138).

2.6.3. Evcil Hayvanlarda *E. coli* ST131

E. coli ST131 klonu evcil hayvanlarda ilk kez, 2009 yılında Portekiz’de idrar yolları enfeksiyonu olan bir bildirilmiştir. Köpekten elde edilen izolat, FQ dirençli, GSBL pozitif, CTX-M-15 pozitif ST131 klonu olarak belirlenmiştir. Aynı suş eş zamanlı olarak köpeğin sahibinde de tespit edilmiştir. Bu rapor, ST131 klonunun insan ve hayvan arasındaki bulaşını gösteren ilk çalışmadır (59).

ABD’de yapılan bir çalışmada ise; GSBL negatif, FQ dirençli ST131 izolatı, aynı evde yaşayan ve idrar yolu enfeksiyonu olan bir köpek ve kedide aynı ST131 klonu tespit edilmiştir. Bu çalışma, ST131 klonunun hayvan-hayvan arasındaki bulaşını göstermektedir (70).

Sekiz Avrupa ülkesinin katıldığı uluslararası büyük bir çalışmada ise, idrar yolları ve yara enfeksiyonu olan kedi, köpek ve at incelenmiştir. Bu hayvanların örneklerinden 177 GSBL pozitif *E. coli* izolatu tanımlanmış ve bunların %5,6’sının *E. coli* ST131 klonu olduğu bildirilmiştir (107, 129, 139).

2.7. *E. coli* ST131 İzolatlarından Korunma ve Kontrol Önlemleri

Bağırsak kolonizasyonu *E. coli* ST131’in bulaşmasını destekleyen birincil koşuldur. Son yapılan çalışmalar, toplum ve hastane kökenli enfeksiyonlara sahip hastalardaki *E. coli* ST131 izolasyonlarının büyük oranda arttığını göstermektedir (100, 140). Ayrıca yapılan çalışmalar, *E. coli* ST131’in hastaneye yatırılmış hastalardan evlerindeki diğer üyelere bulaşabileceğini açık bir şekilde göstermektedir. Toplumda *E. coli* ST131’in bulaşmasını önlemeye yönelik halk sağlığı önlemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir (140).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bakteri İzolatları

Çalışma kapsamında 2015 yılı içerisinde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran erişkin hastalardan bir yıl boyunca izole edilmiş toplam 157 adet *E. coli* kan izolatu çalışmaya dahil edildi. Bu izolatların bir bölümü kinolon dirençli, bir bölümü kinolon duyarlı izolatlardan oluşmaktadır.

Çalışmada yoğun bakım üniteleri, yatan hasta ve acil serviste yatarak tedavi gören hastaların kan örneklerinden elde edilen invaziv enfeksiyon etkeni olarak kabul edilen tüm *E. coli* izolatları çalışmaya dahil edildi.

Bu çalışmada proje kapsamında daha önceden düzenlenen hasta bilgi formu hastaları izleme alan Enfeksiyon Hastalıkları Uzmanı tarafından dolduruldu. Bu formlarda hastaların demografik bilgileri (yaş, cinsiyet, meslek, vb.) ile altta yatan hastalık, risk faktörleri, hastanede yatış süresi, invaziv girişim veya operasyon varlığı, antibiyotik tedavisi ve tedavi yanıtı gibi bilgilere yer verildi.

3.2. İzolatların Tanımlanması

Çalışmada yoğun bakım üniteleri, yatan hasta ve acil serviste yatarak tedavi gören kan örneklerinden elde edilen *E. coli* izolatlarının tanısı MALDI-TOF/Phoenix (BD, ABD) sistemi ile gerçekleştirildi. Tüm izolatlarda tür düzeyinde tanımlama, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda konvansiyonel yöntemlerle tekrar çalışılarak doğrulandı.

3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testleri "Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi (141).

İzolatların antimikrobiyal duyarlılık testleri için CLSI önerilerine göre hazırlanan Mueller Hinton Agar (BD, ABD) besiyeri kullanıldı.

3.3.1. Kullanılan Antibiyotikler

Çalışmada antibiyotik gradiyent test yöntemi için siprofloksasin (Bioanalyse, Ankara, Türkiye) ve imipenem (Liofilchem s.r.l, Abruzzi, İtalya) gradiyent şeritler, disk difüzyon yöntemi için ampisilin, ampisilin-sulbaktam, seftriakson, gentamisin, trimetoprim-sulfametoksazol, ertapenem (Bioanalyse, Ankara, Türkiye) antibiyotik diskleri kullanıldı.

3.3.2. İzolatların Hazırlanması

- 1) Test edilecek izolatlar koyun kanlı agar plaklarına pasajlandı.
- 2) Ertesi gün çalışılacak izolatlardan öze yardımı ile alınan bir koloni, 2 ml steril Mueller hinton broth (MHB) içeren tüplere aktarılarak 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlandı.
- 3) -20 °C’de saklanan antibiyotikler oda sıcaklığına getirildi.
- 4) Tüm izolatlar CLSI önerileri doğrultusunda seri dilüsyonda antibiyotik bulunan, katyon ayarlı Mueller Hinton Agar içeren plaklara 10⁴ cfu/ml son konsantrasyonda ekildi.
- 5) Plaklar bir gece 37 °C’da etüvde inkübe edildi.
- 6) Ertesi gün plaklar okunarak minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri kaydedildi.

3.3.3. Fenotipik Yöntemler

Fenotipik yöntemler CLSI önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi (141).

İzolatların fenotipik testleri için CLSI önerilerine göre hazırlanan Mueller Hinton Agar (BD, ABD) besiyeri kullanıldı.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının saptanması için kombine disk difüzyon yöntemi ile sefotaksim ve sefotaksim/klavulonik asit (Bioanalyse, Ankara, Türkiye), seftazidim ve seftazidim/klavulonik asit (Bioanalyse, Ankara, Türkiye) diskleri kullanıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Çalışmada incelenen izolatlara ilişkin fenotipik GSBL yapımında kullanılan antibiyotik diskleri ve miktarları (n=157).

Antibiyotik Diskleri (Kombine disk difüzyon testi)	Miktar (µg)
Seftazidim	30
Sefotaksim	30
Klavulonik asit	10

Karbapenemaz varlığının saptanması için kombine disk difüzyon yöntemi kullanılarak ertapenem ve ertapenem-10 mg boronik asit (Bioanalyse, Ankara, Türkiye) ile hazırlanmış antibiyotik diskleri kullanıldı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Çalışmada incelenen izolatlarla ilişkin fenotipik karbapenemaz yapımında kullanılan antibiyotik diskleri ve miktarları (n=157).

Antibiyotik Diskleri (Kombine disk difüzyon testi)	Miktar (µg)
Ertapenem	10
Boronik asit	400

3.4. Moleküler Yöntemler

3.4.1. DNA İzolasyonu

1) Kanlı agara tek koloni ekim yöntemi ile ekilen bakterilerin 18-24 saatlik inkübasyonu sonunda, bakteri kültüründen tek koloni alındı, MHB'a ekildi ve 37 °C'de 18 saat inkübe edildi.

2) İnkübasyonun ardından süspansiyon, 15 dakika 3000 xg'de santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı döküldü. Kalan kısım üzerine 1ml Tris/EDTA (TE) tamponu eklenerek vortekslendi ve mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

3) Süspansiyon tekrar 1 dakika 10.000 xg'de santrifüj edildi ve üstteki sıvı atıldı.

4) Çökelti üzerine 1 ml TE tamponu eklenerek birkaç kez pipetaj işlemi uygulandı. Tüpler vortekslendi ve mikrosantrifüjde 1 dakika santrifüj edildi.

5) Üstte kalan sıvı alındıktan sonra yıkama işlemi (4. Basamak) en az 3 kez tekrarlandı. En son yıkamadan sonra üstteki sıvı atıldı, çökeltiye 100 µl TE tamponu eklendi ve tüpler ısı bloğuna konarak 15 dakika 100 °C'da bekletildi.

6) Bu işlemi takiben bakteriler mikrosantrifüjde 1 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı çökeltiye dokunmadan yeni bir steril mikrosantrifüj tüpüne alındı ve elde edilen DNA, ileri moleküler testlerin uygulanması aşamasına kadar -20 °C'de saklandı.

3.4.2. ST131 Klonu ve Alt Klonlarının Moleküler Yöntemle Belirlenmesi

pabB rfb Geninin PCR Protokolü

Multipleks PCR protokolü belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler 100 pmol/µl sulandırıldı (118).

Kullanılan Primerler:

<i>O25pabBspe</i>	F-5 –TCC AGCAGGTGCTGGATCGT-3
<i>O25pabBspe</i>	R-5 -GCGAAATTTTTCGCCGTACTGT-3 (347 bp)
<i>trpA2</i>	F-5-GCTACGAATCTCTGTTTGCC-3
<i>trpA2</i>	R-5-GCAACGCGGCCTGGCGGAAG-3 (427 bp)

PCR Karışımı: Kullanılan PCR karışımının içeriği Tablo 3.3'te özetlenmiştir.

Tablo 3.3. *pabB rfb* geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	25 µl	Son konsantrasyon
Su	15,0 µl	
Taq DNA tampon (10x)	2,5 µl	1x
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µl	200 µM
PrimerF (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
PrimerR (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
Taq polimeraz (5 U/µl)	0,2µl	1 U
DNA	5,0µl	

PCR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

İlk denatürasyon	4 dakika	94°C'de gerçekleştirildikten sonra;
Denatürasyon	5 saniye	94°C
Primer birleşmesi	10 saniye	65°C

olacak şekilde toplam 30 döngü olarak programlandı. Amplifikasyonun sonunda 72 °C'de 5 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırıldı.

H30 Geninin PCR Protokolü

PCR protokolü belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler 100 pmol/µl sulandırıldı (118).

Kullanılan Primerler:

<i>fimH30</i>	F-21-5-CCG CCA ATG GTA CCG CTA TT-3
<i>fimH30</i>	R-20-5-CAG CTT TAA TCG CCA CCC CA-3 (354 bp)

PCR Karışımı: Kullanılan PCR karışımının içeriği Tablo 3.4'te özetlenmiştir.

Tablo 3.4. *H30* geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	25 µl	Son konsantrasyon
Su	15,0 µl	
<i>Taq</i> DNA tampon (10x)	2,5 µl	1x
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µl	200 µM
PrimerF (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
PrimerR (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
<i>Taq</i> polimeraz (5 U/µl)	0,2µl	1 U
DNA	5,0µl	

PCR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

İlk denatürasyon	4 dakika	94°C’de gerçekleştirildikten sonra;
Denatürasyon	5 saniye	94°C
Primer birleşmesi	10 saniye	65°C

olacak şekilde toplam 30 döngü olarak programlandı. Amplifikasyonun sonunda 72 °C’de 5 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırıldı.

***H30-Rx* Geninin PCR Protokolü**

PCR protokolü belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler 100 pmol/µl sulandırıldı (1).

Kullanılan Primerler:

<i>H30-Rx</i>	F-5-GGT TGC GGT CTG GGC A-3
<i>H30-Rx</i>	R-5-CAA TAT CCA GCA CGT TCC AGG TG-3 (194 bp)

PCR Karışımı: Kullanılan PCR karışımının içeriği Tablo 3.5’te özetlenmiştir.

Tablo 3.5. *H30-Rx* geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	25 µl	Son konsantrasyon
Su	15,0 µl	
Taq DNA tampon (10x)	2,5 µl	1x
MgCl₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µl	200 µM
PrimerF (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
PrimerR (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
Taq polimeraz (5 U/µl)	0,2µl	1 U
DNA	5,0µl	

PCR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

İlk denatürasyon	4 dakika	94°C’de gerçekleştirildikten sonra;
Denatürasyon	20 saniye	95°C
Primer birleşmesi	20 saniye	51°C
Amplifikasyon	30 saniye	72°C

olacak şekilde toplam 35 döngü olarak programlandı. Amplifikasyonun sonunda 72 °C’de 3 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırıldı.

3.4.3. Antibiyotik Direnç Genlerinin Moleküler Yöntemle Belirlenmesi *bla_{CTX-M}* PCR Protokolü

bla_{CTX-M} PCR protokolü aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler 100 pmol/µl olacak şekilde sulandırıldı (63).

Kullanılan Primerler:

<i>bla_{CTX-M}</i>	F-5-TCTTCCAGAATAAGGAATCCC-3
<i>bla_{CTX-M}</i>	R- 5- CCGTTTCCGCTATTACAAAC-3 (909 bp)

PCR Karışımı: Kullanılan PCR karışımının içeriği Tablo 3.6’da özetlenmiştir.

Tablo 3.6. *bla*_{CTX-M} geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	25 µl	Son konsantrasyon
Su	15,0 µl	
<i>Taq</i> DNA tampon (10x)	2,5 µl	1x
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µl	200 µM
PrimerF (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
PrimerR (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
<i>Taq</i> polimeraz (5 U/µl)	0,2µl	1 U
DNA	5,0µl	

PCR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

İlk denatürasyon	5 dakika	94°C’de gerçekleştirildikten sonra;
Denatürasyon	20 saniye	95°C
Primer birleşmesi	30 saniye	51°C
Amplifikasyon	30 saniye	72°C

olacak şekilde toplam 35 döngü olarak programlandı. Amplifikasyonun sonunda 72 °C’de 3 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırıldı.

***bla*_{CTX-M-15} PCR Protokolü**

PCR protokolü belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler 100 pmol/µl olacak şekilde sulandırıldı (63).

Kullanılan Primerler:

<i>bla</i> _{CTX-M-15}	F-5- ATA AAA CCG GCA GCG GTG G- 3
universal reverse primer	R-5-GAA TTT TGA CGA TCG GGG- 3 (483 bp)

PCR Karışımı: Kullanılan PCR karışımının içeriği Tablo 3.7’de özetlenmiştir.

Tablo 3.7. *bla*_{CTX-M-15} geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	25 µl	Son konsantrasyon
Su	15,0 µl	
Taq DNA tampon (10x)	2,5 µl	1x
MgCl₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µl	200 µM
PrimerF (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
PrimerR (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
Taq polimeraz (5 U/µl)	0,2µl	1 U
DNA	5,0µl	

PCR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

İlk denatürasyon	5 dakika	94°C’de gerçekleştirildikten sonra;
Denatürasyon	20 saniye	95°C
Primer birleşmesi	30 saniye	51°C
Amplifikasyon	30 saniye	72°C

olacak şekilde toplam 35 döngü olarak programlandı. Amplifikasyonun sonunda 72 °C’de 3 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırıldı.

***bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} Antibiyotik Direnç Genlerinin PCR Protokolü**

Multipleks PCR protokolü belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler 100 pmol/µl sulandırıldı (142).

Kullanılan Primerler:

<i>bla</i>_{NDM}	F- 5'- GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC- 3'
<i>bla</i>_{NDM}	R-5'- CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC- 3' (621 bp)
<i>bla</i>_{KPC}	F- 5'- CGT CTA GTT CTG CTG TCT TG- 3'
<i>bla</i>_{KPC}	R-5'- CTT GTC ATC CTT GTT AGG CG- 3' (798 bp)
<i>bla</i>_{OXA-48}	F- 5'- GCG TGG TTA AGG ATG AAC AC- 3'
<i>bla</i>_{OXA-48}	R-5'- CAT CAA GTT CAA CCC AAC CG- 3' (438 bp)

PCR Karışımı: Kullanılan PCR karışımının içeriği Tablo 3.8’de özetlenmiştir.

Tablo 3.8. *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}* genleri için hazırlanan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	25 µl	Son konsantrasyon
Su	15,0 µl	
Taq DNA tampon (10x)	2,5 µl	1x
MgCl₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µl	200 µM
PrimerF (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
PrimerR (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
Taq polimeraz (5 U/µl)	0,2µl	1 U
DNA	5,0µl	

PCR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

İlk denatürasyon	10 dakika	94°C’de gerçekleştirildikten sonra;
Denatürasyon	30 saniye	94°C
Primer birleşmesi	40 saniye	55°C
Amplifikasyon	50 saniye	72°C

olacak şekilde toplam 36 döngü olarak programlandı. Amplifikasyonun sonunda 72 °C’de 5 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırıldı.

***bla_{VIM}* ve *bla_{IMP}* PCR Antibiyotik Direnç Genlerinin PCR Protokolü**

Multipleks PCR protokolü belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler 100 pmol/µl sulandırıldı (142).

Kullanılan Primerler:

<i>bla_{VIM}</i>	F- 5'- GAT GGT GTT TGG TCG CAT A- 3'
<i>bla_{VIM}</i>	R- 5'- CGA ATG CGC AGC ACC AG - 3' (390 bp)
<i>bla_{IMP}</i>	F- 5'- GGA ATA GAG TGG CTT AAY TC- 3'
<i>bla_{IMP}</i>	R- 5'- TCG GTT TAA YAA AAC AAC CAC C- 3' (232 bp)

PCR Karışımı: Kullanılan PCR karışımının içeriği Tablo 3.9’da özetlenmiştir.

Tablo 3.9. *bla_{VIM}* ve *bla_{IMP}* genleri için hazırlanan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	25 µl	Son konsantrasyon
Su	15,0 µl	
Taq DNA tampon (10x)	2,5 µl	1x
MgCl₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µl	200 µM
PrimerF (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
PrimerR (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
Taq polimeraz (5 U/µl)	0,2µl	1 U
DNA	5,0µl	

PCR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

İlk denatürasyon	10 dakika	94°C’de gerçekleştirildikten sonra;
Denatürasyon	30 saniye	94°C
Primer birleşmesi	40 saniye	55°C
Amplifikasyon	50 saniye	72°C

olacak şekilde toplam 36 döngü olarak programlandı. Amplifikasyonun sonunda 72 °C’de 5 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırıldı.

***bla_{PER-1}* Antibiyotik Direnç Geninin PCR Protokolü**

PCR protokolü belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler pmol/µl sulandırıldı (142).

Kullanılan Primerler:

<i>per-1</i>	F-5-ATGAATGTCATTATAAAAGC-3
<i>per-1</i>	R-5-ATTTGGGCTTAGGGCAGAA-3 (920 bp)

PCR Karışımı: Kullanılan PCR karışımının içeriği Tablo 3.10’da özetlenmiştir.

Tablo 3.10. *bla_{PER-1}* geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	25 µl	Son konsantrasyon
Su	15,0 µl	
<i>Taq</i> DNA tampon (10x)	2,5 µl	1x
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µl	200 µM
PrimerF (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
PrimerR (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
<i>Taq</i> polimeraz (5 U/µl)	0,2µl	1 U
DNA	5,0µl	

PCR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

İlk denatürasyon	10 dakika	94°C’de gerçekleştirildikten sonra;
Denatürasyon	30 saniye	94°C
Primer birleşmesi	40 saniye	55°C
Amplifikasyon	50 saniye	72°C

olacak şekilde toplam 36 döngü olarak programlandı. Amplifikasyonun sonunda 72 °C’de 5 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırıldı.

3.4.4. Virülans Genlerinin Moleküler Yöntemle Belirlenmesi *usp* (üropatojen-spesifik protein) Virülans Geninin PCR Protokolü

PCR protokolü belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler 100 pmol/µl sulandırıldı (143).

Kullanılan Primerler:

<i>usp</i>	F-5’-ACA TTC ACG GCA AGC CTC AG
<i>usp</i>	R-5’-AGC GAG TTC CTG GTG AAA GC (440 bp)

PCR Karışımı: Kullanılan PCR karışımının içeriği Tablo 3.11’de özetlenmiştir.

Tablo 3.11. *usp* geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	25 µl	Son konsantrasyon
Su	15,0 µl	
<i>Taq</i> DNA tampon (10x)	2,5 µl	1x
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µl	200 µM
PrimerF (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
PrimerR (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
<i>Taq</i> polimeraz (5 U/µl)	0,2µl	1 U
DNA	5,0µl	

PCR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

İlk denatürasyon	2 dakika	94°C’de gerçekleştirildikten sonra;
Denatürasyon	30 saniye	94°C
Primer birleşmesi	30 saniye	58°C
Amplifikasyon	30 saniye	73°C

olacak şekilde toplam 30 döngü olarak programlandı. Amplifikasyonun sonunda 73 °C’de 10 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırıldı.

***pap A* (adezin) Virülans Geninin PCR Protokolü**

PCR protokolü belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler 100 pmol/µl sulandırıldı (144).

Kullanılan Primerler:

<i>papA</i>	F-ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG
<i>papA</i>	R-CGTCCCACCATACGTGCTCTTC (717 bp)

PCR Karışımı: Kullanılan PCR karışımı Tablo 3.12’de özetlenmiştir.

Tablo 3.12. *papA* geni için PCR karışım içeriği.

Malzeme	25 µl	Son konsantrasyon
Su	15,0 µl	
<i>Taq</i> DNA tampon (10x)	2,5 µl	1x
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µl	200 µM
PrimerF (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
PrimerR (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
<i>Taq</i> polimeraz (5 U/µl)	0,2µl	1 U
DNA	5,0µl	

PCR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

İlk denatürasyon	12 dakika	94°C’de gerçekleştirildikten sonra;
Denatürasyon	30 saniye	94°C
Primer birleşmesi	30 saniye	63°C
Amplifikasyon	3 dakika	68°C

olacak şekilde toplam 25 döngü olarak programlandı. Amplifikasyonun sonunda 72 °C’de 10 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırıldı.

***ompT* (dış zar reseptörü) Virülans Geninin PCR Protokolü**

PCR protokolü belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler 100 pmol/µl sulandırıldı (145).

Kullanılan Primerler:

<i>ompT</i>	F-5-ATC TAG CCG AAG AAG GAG GC
<i>ompT</i>	R-5-CCC GGG TCA TAG TGT TCA TC (559 bp)

PCR Karışımı: Kullanılan PCR karışımının içeriği Tablo 3.13’te özetlenmiştir.

Tablo 3.13. *ompT* geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	25 µl	Son konsantrasyon
Su	15,0 µl	
Taq DNA tampon (10x)	2,5 µl	1x
MgCl₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µl	200 µM
PrimerF (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
PrimerR (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
Taq polimeraz (5 U/µl)	0,2µl	1 U
DNA	5,0µl	

PCR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

İlk denatürasyon	3 dakika	94°C’de gerçekleştirildikten sonra;
Denatürasyon	30 saniye	94°C
Primer birleşmesi	30 saniye	58°C
Amplifikasyon	30 saniye	72°C

olacak şekilde toplam 30 döngü olarak programlandı. Amplifikasyonun sonunda 72 °C’de 10 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırıldı.

***iutA* (aerobactin receptor) Virülans Geninin PCR Protokolü**

PCR protokolü belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler 100 pmol/µl sulandırıldı (144).

Kullanılan Primerler:

<i>iutA</i>	F-5-GGC TGG ACA TCA TGG GAA CTG G
<i>iutA</i>	R-5-CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG (302 bp)

PCR Karışımı: Kullanılan PCR karışımının içeriği Tablo 3.14’te özetlenmiştir.

Tablo 3.14. *iutA* geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	25 µl	Son konsantrasyon
Su	15,0 µl	
Taq DNA tampon (10x)	2,5 µl	1x
MgCl₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µl	200 µM
PrimerF (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
PrimerR (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
Taq polimeraz (5 U/µl)	0,2µl	1 U
DNA	5,0µl	

PCR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

İlk denatürasyon	5 dakika	95°C’de gerçekleştirildikten sonra;
Denatürasyon	30 saniye	94°C
Primer birleşmesi	30 saniye	63°C
Amplifikasyon	3 dakika	68°C

olacak şekilde toplam 25 döngü olarak programlandı. Amplifikasyonun sonunda 72 °C’de 10 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırıldı.

***sat* (secreted autotransporter toksin) Virülans Geninin PCR Protokolü**

PCR protokolü belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler 100 pmol/µl sulandırıldı (144).

Kullanılan Primerler:

<i>sat</i>	F-5-ACT GGC GGA CTC ATG CTG T
<i>sat</i>	R-5-AAC CCT GTA AGA AGA CTG AGC (387 bp)

PCR Karışımı: Kullanılan PCR karışımının içeriği Tablo 3.15’te özetlenmiştir.

Tablo 3.15. *sat* geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	25 µl	Son konsantrasyon
Su	15,0 µl	
<i>Taq</i> DNA tampon (10x)	2,5 µl	1x
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µl	200 µM
PrimerF (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
PrimerR (100 pmol)	0,3µl	30 pmol
<i>Taq</i> polimeraz (5 U/µl)	0,2µl	1 U
DNA	5,0µl	

PCR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

İlk denatürasyon	10 dakika	94°C’de gerçekleştirildikten sonra;
Denatürasyon	50 saniye	94°C
Primer birleşmesi	90 saniye	55°C
Amplifikasyon	2 dakika	72°C

olacak şekilde toplam 30 döngü olarak programlandı. Amplifikasyonun sonunda 72 °C’de 7 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırıldı.

3.4.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Steril şekilde hazırlanan 50xTAE (242 g TRİS; 57.1 ml glasiyal asetik asit, 0.5 M EDTA, pH 8) çözeltisinden 20 ml alınarak 1 litre distile su ile karıştırıldı ve 1xTAE tamponu hazırlandı.

PCR ürünlerini agaroz jel elektroforezde yürütmek için agaroz jel, 220 ml 1xTAE %2 oranında agaroz içerecek şekilde hazırlandı. Tamponun içerisinde agaroz eritildikten sonra 45-50 °C’ye soğutuldu ve içerisine 25 µl etidyum bromür çözeltisi eklendi. Düz bir zeminde agarozun döküleceği kalıp hazırlandı ve jel kalıba dökülerek katılaşması beklendi. Önceden hazırlanan 1xTAE tamponu, elektroforez tankının içine yerleştirilmiş olan jelin üzerini kapatacak şekilde döküldü.

PCR ürünlerinin herbirinden 10 µl alındı ve 10 µl orange G yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Moleküler ağırlık belirteci olarak 100 bp ladder (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, ABD) kullanıldı. Yürütme işlemi 120 voltta 120 dakikada gerçekleştirildi. Yürütülen jel distile su ile çalkalanarak fazla boyanın uzaklaşması sağlandı ve jel BioSpectrum 500 (UVP, Cambridge, Birleşik Krallık) ile ultraviyole ışık altında incelendi. PCR ürünlerindeki *trpA*, *pabB*, *rfb*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{PER-1}*, *H30*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{CTX-M-15}*, *sat* (secreted autotransporter toxin), *usp* (üropatojen-spesifik protein), *pap A* (adezin), *ompT* (dış zar reseptörü), *iutA* (aerobactin receptor) genlerinin varlığı araştırıldı.



4. BULGULAR

4.1. Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri

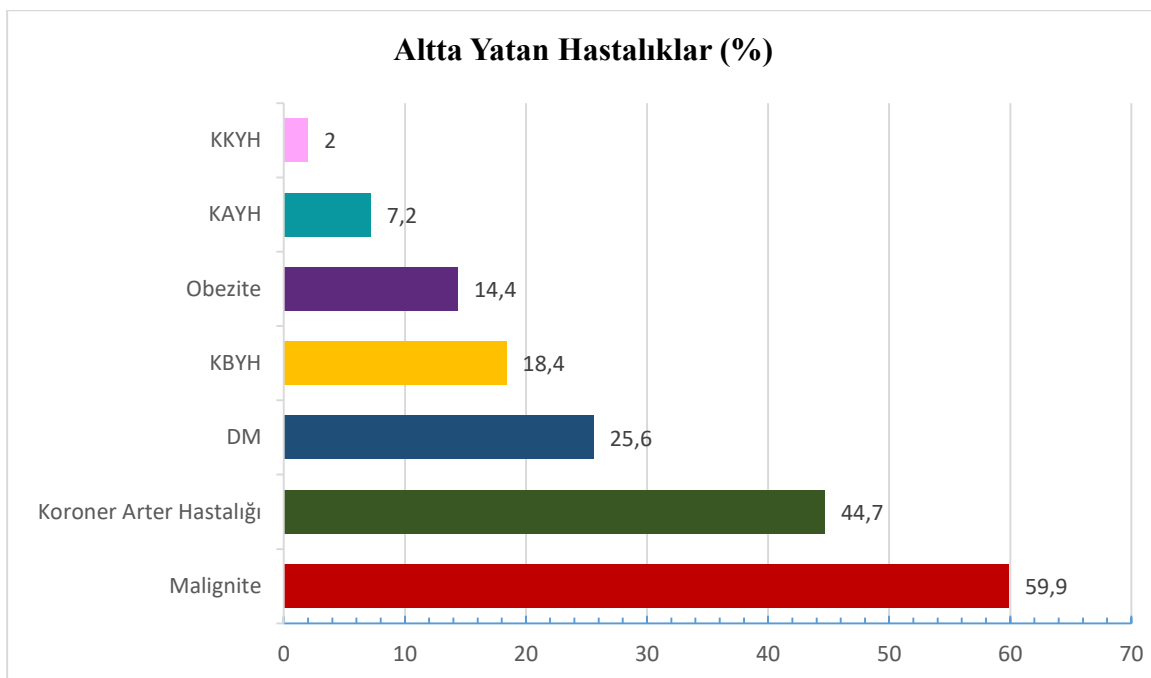
Çalışmaya katılan hastalara ilişkin kayıtlar geriye dönük olarak incelendiğinde, 2015 yılı içinde kan kültüründe *E. coli* izole edilen toplam 152 erişkin hastanın, 86'sının (%56,6) kadın, 66'sının (%43,4) erkek olduğu tespit edilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen hastaların ortalama yaşı $60,3 \pm 18,6$ olarak belirlenmiştir. Hastaların hastanede yatış süreleri ortalama olarak $25,9 \pm 3$ olarak saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen izolatların 81 (%51,6)'i hastane kaynaklı, 76 (%48,4)'sı ise toplum kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak tespit edilmiştir. Hastalarda mortalite oranı %42 (n=64) olarak belirlenirken, bir hasta ile ilgili veriye ulaşılamamıştır. Hastaların yattığı servislere göre dağılımı; %40,1 (n=63)'i acil servis, %18,5 (n=29)'i yoğun bakım üniteleri, %15,9 (n=25)'u onkoloji, %12,7 (n=20)'si cerrahi servis, %9,6 (n=15)'sı dâhiliye servisi, %1,9 (n=3)'ü kemik iliği transplantasyon ünitesinden, %1,3 (n=2)'ü enfeksiyon polikliniği şeklindedir. Hastaların %17,8'inde steroid kullanım öyküsü bulunurken; organ veya kemik iliği transplantasyonu yapılmış 15 hasta bulunmaktadır. Hastalarda en sık saptanan invaziv girişimler sırasıyla, üriner kateterizasyon, cerrahi girişim, santral kateterizasyon ve mekanik ventilasyon olarak saptanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik özellikleri ve risk faktörleri (n=152).

	Sayı (n)	Yüzde (%)
Cinsiyet		
Erkek	66	43,4
Kadın	86	56,6
Pozitif Kültürlerin Alındığı Servisler (n=157)		
Acil servis	63	40,1
Yoğun bakım üniteleri	29	18,5
Onkoloji servisi	25	15,9
Cerrahi servisler	20	12,7
Dâhiliye servisi	15	9,6
Kemik iliği transplantasyon ünitesi	3	1,9
Enfeksiyon polikliniği	2	1,3
İmmünsupresyon		
Steroid kullanımı	27	17,8
Transplantasyon (organ, kemik iliği, diğer)	15	9,8
İnvaziv İşlemler		
Üriner kateterizasyon	56	36,8
Cerrahi (acil, elektif, bilinmeyen)	40	26,3
Santral venöz kateterizasyon	31	20,3

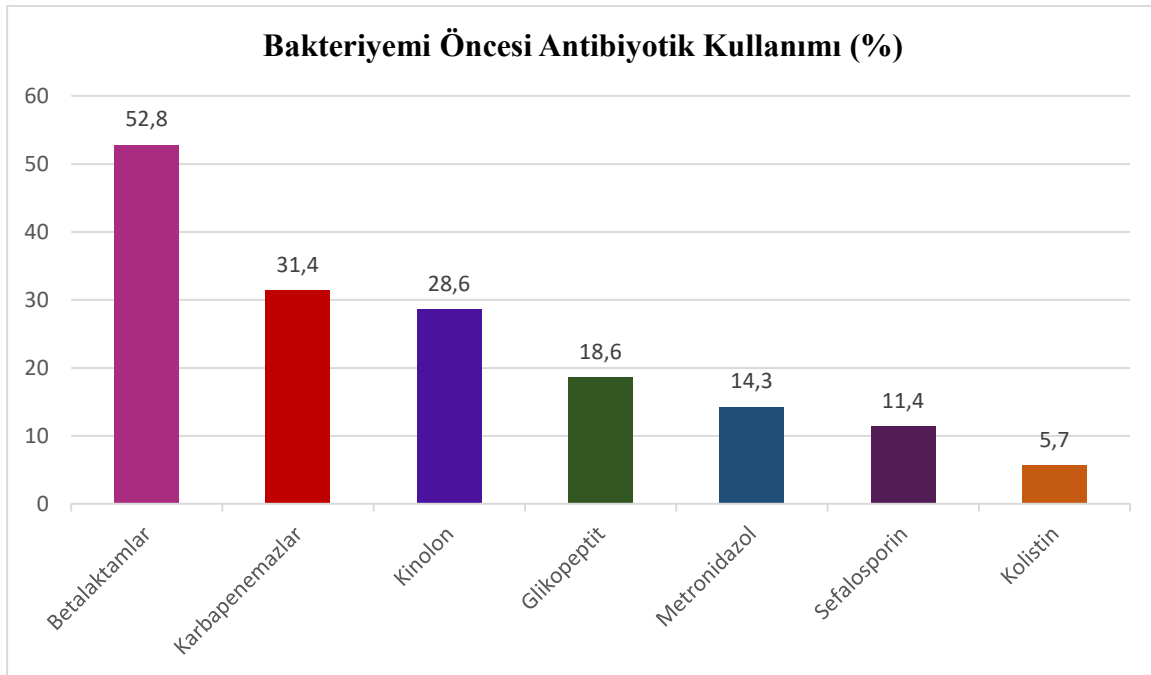
Mekanik ventilasyon	18	12
Nazogastik sonda	13	8,5
Arteriyel kateterizasyon	8	5,2
Gastronomi	6	4
Mortalite	65	42

Çalışmaya dahil edilen hastalarda diabetes mellitus (DM), koroner arter hastalığı, kronik böbrek yetmezliği (KBY), kronik akciğer yetmezliği (KAY), kronik karaciğer yetmezliği (KKY), obezite ve malignite (lösemi, lenfoma, solid tümör) gibi altta yatan çeşitli hastalıklar saptanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Çalışmaya dahil edilen hastalarda tespit edilen altta yatan hastalıkların yüzdelik dağılımı (n=157). KKYH: Kronik karaciğer yetmezliği hastalığı, KAYH: Kronik akciğer yetmezliği hastalığı, KBYH: Kronik böbrek yetmezliği hastalığı, DM: Diabetes mellitus.

E. coli enfeksiyonu tanısı konulmadan önce hastalarda kullanılan antibiyotikler incelendiğinde ilk sırada %52,8 oranı ile beta-laktam ve beta-laktamaz inhibitörleri (n=37), ikinci sırada %31,4 oranı ile karbapenamazlar (%31,4) yer aldığı saptanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *E. coli* enfeksiyonu tanısı konulmadan önce kullanılan antibiyotiklerin dağılımı.

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Antibiyotik duyarlılık testleri sonunda izolatların siprofloksasin ve imipenem için MİK dağılımı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ile direnç yüzdeleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Çalışmada gerçekleştirilen diğer antibiyotiklere ait duyarlılık testleri sonuçlarına ait direnç yüzdeleri de Tablo 4.3’te verilmiştir.

Tablo 4.2. İzolatların antibiyotik duyarlılık testi sonucunda elde edilen MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri, MİK dağılımı ve direnç oranı (n=157).

Antimikrobiyal İlaç (Antibiyotik gradiyent testi)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)	MİK Dağılımı (µg/ml)	Direnç (%)
Siprofloksasin	0,047	>32	0,023 >32	53,5
İmipenem	0,20	0,25	0.125-0.281	0

Tablo 4.3. İzolatların antibiyotik duyarlılık test sonucunda elde edilen antimikrobiyal direnç oranı (n=157).

Antimikrobiyal İlaç (Disk difüzyon testi)	Direnç (%)
Ampisilin	65
Ampisilin-Sulbaktam	23
Seftriakson	23,5
Gentamisin	32
Trimethoprim-Sulfametoksazol	37

4.3. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz ve Karbapenemaz Saptanmasına Yönelik Yapılan Fenotipik Test Sonuçları

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve karbapenemaz varlığının fenotipik olarak belirlenmesi amacıyla uygulanan kombine disk difüzyon testlerinin sonuçlarına göre GSBL yapımı %53,5 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada fenotipik olarak karbapenemaz yapımı tespit edilmemiştir.

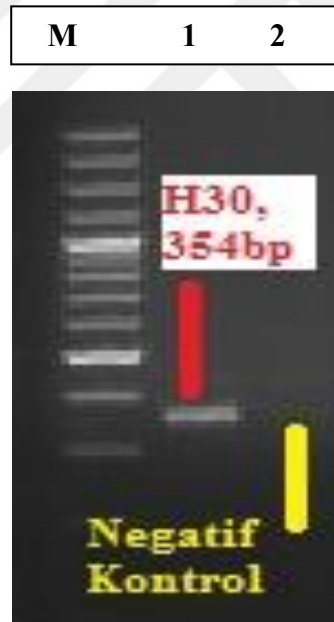
4.4. *E. coli* Kan İzolatlarında ST131 Klonu ve Alt Klonlarının Moleküler Sonuçları

E. coli izolatlarında ST131, H30 ve H30Rx genlerinin belirlenmesine yönelik moleküler ağırlık belirteci (100 bp DNA Ladder, New England Biolabs, Birleşik Krallık) kullanılmıştır.

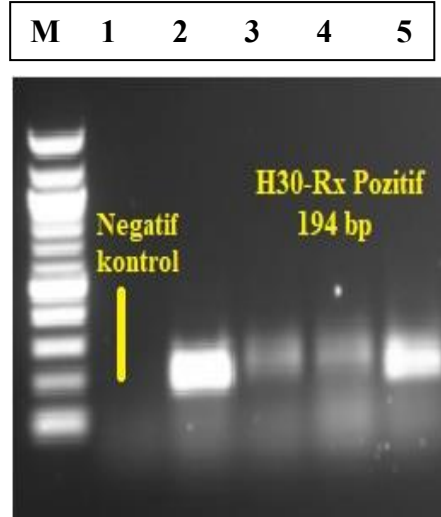
Çalışmaya dahil edilen 157 izolattan; 156 (%99,4) izolatın ST131 klonuna ait olduğu belirlenmiştir. Bunlar arasında, 111 (%70,7) izolatın H30 alt klonuna ait olduğu bulunmuştur. H30-Rx alt klonu varlığı araştırılan CTX-M-15 pozitif 71 (%45,2) izolatın 69 (%97,2)'unun H30-Rx alt klonuna ait olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3, 4.4, 4.5).



Şekil 4.3. *E. coli* izolatlarına ait ST131, *trpA* PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık belirteci; 1, 2, 3, 4 ve 6: ST131 pozitif izolatlar; 5: *trpA* Pozitif izolat; 7: Negatif kontrol.



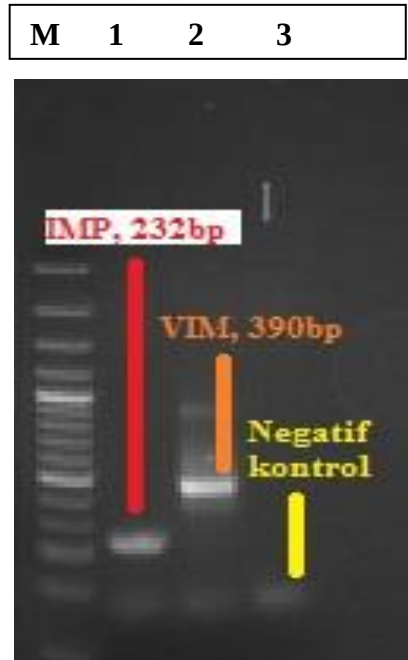
Şekil 4.4. *E. coli* izolatlarına ait *H30* alt klonuna ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık belirteci; 1: *H30* pozitif izolat; 2: Negatif kontrol.



Şekil 4.5. *E. coli* izolatlarına ait *H30Rx* alt klonuna ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık belirteci; 1: Negatif kontrol; 2, 3, 4, 5: *H30Rx* pozitif izolat.

4.5. Karbapenem Direnç Genlerinin Moleküler Yöntem Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 157 izolattan; 33 (%21) izolatta *bla*_{OXA-48}, 5 (%3,2) izolatta *bla*_{VIM} ve 2 (%1,3) izolatta *bla*_{NDM} saptanırken, hiçbir izolatta *bla*_{KPC} ve *bla*_{IMP} direnç genleri saptanmamıştır (Şekil 4.6, 4.7).



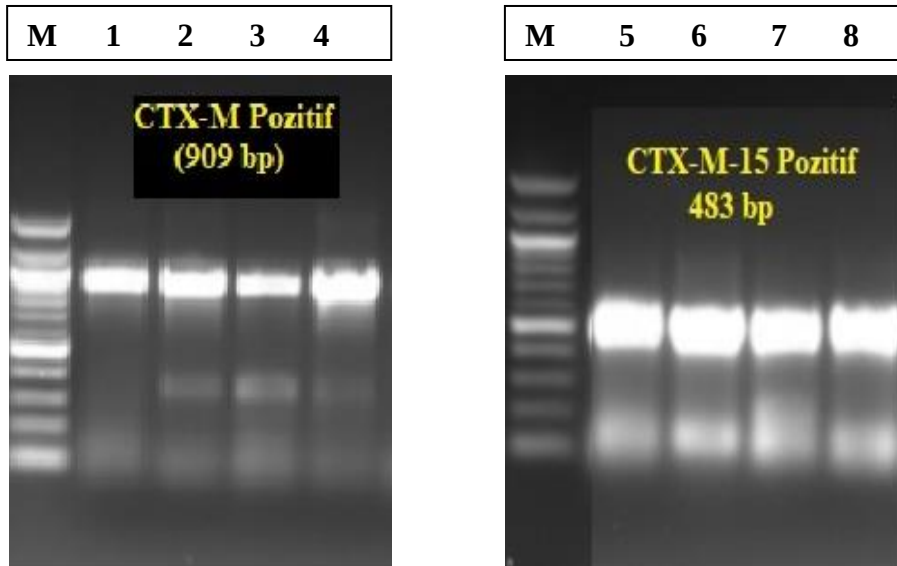
Şekil 4.6. *E. coli* ST131 izolatlarına ait antibiyotik direnç geni saptanan *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık belirteci; 1: *bla*_{IMP} pozitif; 2: *bla*_{VIM} pozitif; 3: Negatif kontrol.



Şekil 4.7. *E. coli* ST131 izolatlarına ait antibiyotik direnç geni olan *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık belirteci; 1: *bla*_{OXA-48} pozitif izolat; 2: *bla*_{NDM} pozitif; 3: *bla*_{KPC}; 4: Negatif kontrol.

4.6. GSBL Direnç Genlerinin Moleküler Çalışma Sonuçları

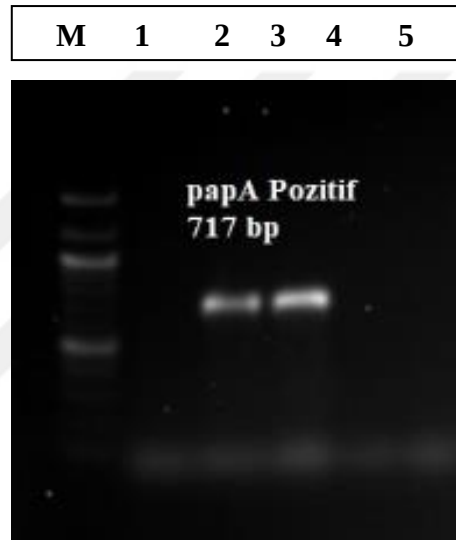
Çalışmaya dahil edilen ST131 izolatlarının; 78 (%49,7) izolat CTX-M pozitif, bu izolatlarında 71 (45,2)'inde CTX-M-15 pozitifliği tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *E. coli* ST131 izolatlarına ait GSBL direnç geni olan CTX-M ve CTX-M-15 PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık belirteci; 1, 2, 3, 4: CTX-M pozitif; 5, 6, 7, 8: CTX-M-15 pozitif.

4.7. Virölans Genlerinin Moleküler Olarak Saptanması

Çalışmaya dahil edilen 157 izolattan; 36 (%22,9) izolatta *papA*, 115 (%73,2) izolatta *iutA*, 101 (%64,3) izolatta *usp*, 129 (%82,2) izolatta *ompT* ve 76 (48,4) izolatta *sat* genleri saptanmıştır (Şekil 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13). Çalışmamızda *E. coli* ST131 klonuna ait izolatlar (n=157) arasında toplam 30 izolatta tüm virölans genleri (*sat*, *usp*, *papA*, *ompT* ve *iutA*) pozitif olarak tespit edilmiştir. H30 alt klonuna ait izolatlar (n=111) arasında ise toplam 17 izolatta ve H30Rx alt klonuna ait izolatlar (n=69) içerisinde toplam 11 izolatta tüm virölans genleri (*sat*, *usp*, *papA*, *ompT* ve *iutA*) pozitif olarak saptanmıştır.



Şekil 4.9. *E. coli* izolatlarına ait *papA* virölans geninin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık belirteci; 1, 4, 5: Negatif kontrol; 2, 3: *papA* pozitif.



Şekil 4.10. *E. coli* izolatlarına ait *iutA* virülans geninin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık belirteci; 1, 2, 3, 4: *iutA* pozitif; 5: Negatif kontrol.



Şekil 4.11. *E. coli* izolatlarına ait *usp* virülans geninin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık belirteci; 1: Negatif kontrol; 2, 3, 4: *usp* pozitif.



Şekil 4.12. *E. coli* izolatlarına ait *ompT* virülans geninin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık belirteci; 1, 2, 3, 4: *ompT* pozitif; 5: Negatif kontrol.



Şekil 4.13. *E. coli* izolatlarına ait *sat* virülans geninin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık belirteci; 1, 2, 3: *sat* pozitif; 4: Negatif kontrol.

5. TARTIŞMA

İnsan ve hayvan enfeksiyonlarını tedavi etmek ve hayvancılığın büyümesini sağlamak için muazzam miktarlarda antibiyotik 50 yılı aşkın bir süredir yaygın olarak kullanılmaktadır.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz tipi CTX-M-15'in üretilmesine bağlı olarak florokinolonlara karşı dirençli *E. coli* ST131 klonunun küresel şekilde ortaya çıktığı görülmektedir. Bu klonun yaygınlaşması, 2000'li yılların başından bu yana GSBL pozitif *E. coli* izolatlarının toplum ve hastane ortamında dünya çapında artışına neden olmuştur.

E. coli ST131 önemli bir insan patojeni olarak dünya çapında yaygın bir şekilde ortaya çıkmıştır ve *E. coli* izolatları arasında antimikrobiyal direncin hızlı artışından sorumludur (100). ST131'in bağırsak dışı florokinolonlara dirençli enfeksiyonlara neden olduğu ve en sık CTX-M-15'e bağlı olarak GSBL üretimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (2). *E. coli* ST131, diğer antimikrobiyal dirençli patojenlerden nispeten daha az ilgi görmüştür. Retrospektif moleküler sürveyans çalışmaları, *bla*_{CTX-M-15} pozitif ST131 klonunun, 2000'lerin başında *E. coli*'de nadir olduğunu, ancak dünyanın farklı yerlerinde sporadik olarak bulunduğunu göstermektedir. 2000'lerin ilk dekadında hızlı bir artış göstermiştir (2). Bu ani artışın nedenleri tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada, 157 *E. coli* kan izolatının 156'sı (%99,4) PCR yöntemi ile ST131 klonuna ait bulunmuştur. Bunların 78 (%49,7)'i *bla*_{CTX-M} pozitif bulunmuştur. Bunların da 71 (%91)'inin *bla*_{CTX-M-15} pozitif olduğu tespit edilmiştir. 2007-2011 yılları arasında Avrupa, ABD ve Latin Amerika bölgesinde yapılan SENTRY sürveyans sonuçlarına göre ST131 popülasyonlarının gitgide arttığı bildirilmektedir (118).

Tüm genom filogenetik analizi gibi ileri teknolojilerden faydalanan yeni moleküler epidemiyolojik çalışmalar, *E. coli* ST131 klonunun 2000'li yılların başında ortaya çıktığını ve ardından H30 ve H30Rx alt klonlarının hızla arttığını göstermektedir. Çalışmamızda ST131 klonuna ait izolatlarda bu alt klonlar yüksek oranda tespit edilmiştir. H30 alt klonu 111 (%70,7) izolatta pozitif bulunurken bunların 69 (%97,2)'sinin H30-Rx alt klonuna ait olduğu belirlenmiştir.

ST131 klonu, genel olarak *E. coli*'nin popülasyon yapısını önemli ölçüde değiştirmektedir ve dünyadaki en yaygın antimikrobiyal dirençli insan ilişkili *E. coli* suşlarını yaratmaktadır. Bu klon, büyük olasılıkla uluslararası birçok yüksek riskli klonun en iyi örneğidir (1).

Nepal’de 2013 yılında yapılan ve *E. coli* ST131 enfeksiyonlarında mortalite açısından risk faktörlerinin incelendiği bir çalışmada, uzun süre yoğun bakım ünitesinde tedavi görmenin ve enfeksiyon tanısı öncesi antibiyotik kullanımının mortaliteyi artırdığı bildirilirken, altta yatan hastalıkların bu tür enfeksiyonları etkilemediği bildirilmiştir (146). Çalışmamızda; altta yatan hastalıklar, yaş, cinsiyet, hastalara uygulanan invaziv işlemler ve tanı öncesi kullanılan antibiyotikler araştırılmıştır. Çalışmamızda ST131 ile enfekte hastaların sıklıkla bakteriyemi öncesi antibiyotik kullanım öyküsü olan, invaziv girişim uygulanan, hastanede yatış süresi uzun olan immünsupresif hastalar olduğu belirlenmiştir.

Kinolon dirençli *E. coli* ST131 enfeksiyonları son zamanlarda Avrupa’da birçok ülkede tedavi açısından sorun yaratmaktadır. Avrupa’da direnç oranlarının en yüksek olduğu ülkelerin başında Belçika, Hırvatistan, Fransa, İtalya ve Türkiye gelmektedir (81, 98). Çalışmamızda, 157 *E. coli* ST131 kan izolatlarındaki kinolon direnci %53,5 olarak bulunmuştur.

Antimikrobiyallerin yaygın ve gereksiz kullanımı, muhtemelen ST131’in ortaya çıkmasına ve yayılmasına katkıda bulunmuştur. H30 ST131 ve florokinolon direnci arasındaki güçlü ilişki, florokinolon kullanımının H30 ST131 alt klonunun yayılmasına yol açtığını göstermektedir. Benzer şekilde, sefalosporinlerin kullanımı, CTX-M-15 ile güçlü bir şekilde ilişkili olan H30Rx alt klonunun yayılmasına neden olmuş olabilir.

Sherchan ve arkadaşları (146) tarafından yapılan bir çalışmada, *E. coli* ST131 klonuna ait izolatlarda antimikrobiyal duyarlılık sonuçları incelenmiştir. Bu izolatlarda en yüksek antibiyotik direnci levofloksasin (%96,3)’de görülmüştür. Fransa’da Brisse ve arkadaşları (38) tarafından yapılan çalışmada, *E. coli* ST131 klonlarında antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarına bakıldığında en yüksek direnç amoksisilin/ampisilinde görülürken, seftazidim ve amikasin direnci tespit edilememiştir. 2014 yılında İspanya’da yapılan çalışmada ise, yine aynı şekilde en yüksek amoksisilin/ampisilin direnci görülürken, seftazidim ve fosfomisin direnci tespit edilememiştir (39). Çalışmamızda da en yüksek dirence sahip antimikrobiyal ilaç ampisilin (%65)’ken, imipenem direnci tespit edilememiştir.

Ülkemizde *E. coli* ST131 klonunun antimikrobiyal direncine ilişkin çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmalar genellikle idrar izolatları üzerine yapılmış olan çalışmalardır. 2017 yılında idrar izolatları üzerinde yapılmış bir çalışmada ertapenem ve imipenem direnci tespit edilemezken, siprofloksasin direnci %62,1, trimetoprim-sulfametoksazol direnci %65,5 olarak tespit edilmiştir (147). Ülkemizde kan izolatları üzerine

yapılmış bir tane çalışma bulunmaktadır. 2016 yılında Füsün Can ve arkadaşları (148) tarafından yapılan çalışmada, *E. coli* ST131 kan izolatlarında en yüksek dirence sahip antimikrobiyal ilaç %98 direnç oranlarıyla levofloksasin ve siprofloksasin olarak saptanmıştır. En düşük dirence sahip antimikrobiyal ilaç ise %40 direnç oranı ile piperacillin/tazobaktam olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda siprofloksasin direnci %53,5, trimetoprim-sulfametoksazol direnci %37 olarak bulurken, imipenem ve ertapenem direnci saptanmamıştır.

E. coli ST131’de antimikrobiyal direncin yayılmasında büyük öneme sahip beta-laktamazlardan TEM ve SHV türevleri, 1990’ların ortalarında belirlenmiştir (19). Günümüzde antimikrobiyal direncin yayılmasına sebep olan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ise, özellikle “sefotaksim” üzerinde etkili olan ve ilk kez Münih’te izole edilen CTX-M tipi enzimdir (20). Ülkemizde 2017 yılında yapılan bir çalışmada idrar örneklerinde %83,5 oranında CTX-M enzimi tespit edilmiş ve çalışmada idrar örneklerinde CTX-M-15 pozitifliği %43 oranında bulunmuştur. Çalışmamızda bu dirence sebep olan CTX-M enzimi *E. coli* ST131 kan izolatları arasında %50 (156 oranında, tespit edilirken CTX-M-15 pozitifliği 71 izolatta (%45,5) bulunmuştur.

E. coli ST131’de karbapenem direncinin yayılmasında büyük öneme sahip genlerden olan; A sınıfı karbapenemaz KPC-2 *E. coli* ST131 izolatlarında, Birleşik Devletlerde yedi izolatta, Fransa’da ve İrlanda’da ise bir izolatta tespit edilmiştir (51, 52). *E. coli* ST131 izolatlarında Ambler sınıf B genleri sadece birkaç çalışmada bildirilmiştir. Bu genler NDM-1; Hindistan’dan iki olgu, VIM-1; İtalya’da bir olgu ve IMP-8; Tayvan’da bir olgu olarak bildirilmektedir (44, 46, 54). Son olarak, OXA-48 gibi Ambler sınıf D beta-laktamazlar ST131 izolatlarında nadiren bulunmuştur (56). Çalışmamızda, karbapenem direncinin yayılmasında büyük öneme sahip olan genlerden; *E. coli* ST131 kan izolatlarında; KPC, IMP ve PER genlerini saptanmazken NDM pozitifliği sadece iki izolatta (%1,3), OXA-48 pozitifliği ise 33 (%21) izolatta tespit edilmiştir.

E. coli izolatları içinde grup B2 suşları daha fazla virülans faktörü içermektedir. Bu virülans faktörlerini kodlayan genler halen araştırma aşamasındadır. *E. coli* ST131 izolatları üzerine ilk yapılan çalışmalarda adezinde görevli olan P fimbriyalarında bulunan PAP genlerinin ve grup B2 sitotoksik nekrotizan faktörünün *E. coli* ST131 izolatlarında bulunmadığı tespit edilmiştir (24). Fakat son yapılan çalışmalarda çok sayıda virülans genlerinin *E. coli* ST131 izolatlarında olduğu belirlenmiştir (148).

Avustralya’da yapılan bir çalışmada; *E. coli* ST131 idrar izolatlarında; *usp* (üropatojen-spesifik protein), *ompT* (dış zar reseptörü), *iutA* (aerobactin receptor) ve *sat* (secreted autotransporter toksin) virülans genlerine PCR yöntemi ile bakılmışlardır. Bu genlerin sıklığı sırasıyla %95-100, %80-85, %80-85 ve %95-100 şeklinde olduğu bildirilmiştir (149).

Minnesota’da ürosepsisli hastalar üzerine yapılan bir çalışmada; *papA* (adezin) ve *iutA* (aerobactin receptor) virülans genleri sırası ile %97 ve %80 olarak bulunmuştur (144).

Tunus’ta 2016 yılında yapılan başka bir çalışmada ise, *usp* (üropatojen- spesifik protein), *ompT* (dış zar reseptörü), *iutA* (aerobactin receptor) ve *papA* (adezin) virülans genleri ile çalışmış ve bu genlerin oranlarını sırası ile %67, %79, %56 ve %30 olarak tespit etmişlerdir (150).

Ülkemizde de *E. coli* ST131 kan izolatlarında virülans faktörlerini araştıran bir adet çalışma bulunmaktadır. Füsün Can ve arkadaşları (151) tarafından 2016 yılında yapılan bu çalışmada; *E. coli* ST131 kan izolatlarında PCR yöntemi ile *iutA* (aerobactin receptor), *papA* (adezin) ve *sat* (secreted autotransporter toksin) virülans genlerinin sırasıyla %100, %16 ve %96 olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda ST131 klonu pozitif izolatlarda en sık görülen virülans genlerinden *papA* (adezin), *iutA* (aerobactin receptor), *usp* (üropatojen- spesifik protein), *ompT* (dış zar reseptörü) ve *sat* (secreted autotransporter toksin) virülans genleri incelenmiş ve sırası ile %22,9, %73,2, %64,3, %82,2 ve %48,4 şeklinde bulunmuştur.

ST131 klonuna sahip kan izolatlarında, karbapenemazlar arasında yer alan *bla*_{OXA-48} en sık görülen enzim, *ompT* ve *iutA* ise en sık görülen virülans genleri olarak belirlenmiştir. ST131 pozitif kan izolatlarında H30Rx ve CTX-M-15 pozitifliğinin yüksek, ayrıca H30Rx izolatlarının hepsinin siprofloksasin dirençli olduğu saptanmıştır.

Bu çalışma, hastanemiz kan izolatlarında *E. coli* ST131 klonuyla beraber H30Rx alt klonunun hakimiyetini, ayrıca bu alt klon ile direnç ve virülansın başarılı birlikteliğinin var olduğunu işaret etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Uluslararası çok ilaca dirençli yüksek riskli klonlar, küresel bir yayılım göstermekte ve farklı coğrafik bölgelerde uzun süre canlılıklarını sürdürebilmektedir. Bu klonlar, aynı zamanda direnç determinantları ile birlikte virülans genlerinin de aktarımını üstlenmektedir. Uluslararası çok ilaca dirençli yüksek riskli klonun bazı özellikleri bir arada bulundurması gerekmektedir. Bunlar; i) küresel yayılım ii) antimikrobiyal direnç determinantları ile ilişkili olma iii) uzun zaman aralıkları boyunca konakta kolonize olma yeteneğine sahip olma (>6 ay) iv) konaklar arasında etkin şekilde bulaş v) yüksek patojenite ve uyum vi) ciddi ve/veya tekrarlayan enfeksiyonlara yol açma yeteneğinin olmasıdır (152).

E. coli ST131 1990'lı yıllarda ve 2000'li yılların başında *E. coli* izolatları arasında oldukça nadir görülürken, 2000'li yılların ilk dekadının sonlarına doğru *bla*_{CTX-M-15} yapımı ile birlikte florokinolon dirençli *E. coli* ST131 izolatlarında artış gözlenmeye başlamıştır (2). Florokinolonların ve sefalosporinlerin yaygın kullanımı sonucu *E. coli*'nin popülasyon yapısında ortaya çıkan bu değişiklik, antimikrobiyal ilaçların kullanımı sonucu yapay olarak ortaya çıkan seçici baskının yol açtığı mikroevolüsyona en mükemmel örnektir. Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi olarak tek merkezde iki ayrı Anabilim Dalının katkılarıyla yürütülmüştür. Çalışmamızda kan yolu enfeksiyonlarına neden olan *E. coli* izolatları tanımlanarak, bu izolatlarda ST131 klon ve alt klonları, antibiyotik duyarlılık ve direnç genleri ile virülans genleri araştırılmıştır.

ST131 klonuna sahip kan izolatlarında, karbapenemazlar arasında yer alan *bla*_{OXA-48} en sık görülen enzim, *ompT* ve *iutA* ise en sık görülen virülans genleri olarak belirlenmiştir. ST131 pozitif kan izolatlarında H30Rx ve CTX-M-15 pozitifliğinin yüksek, ayrıca H30Rx izolatlarının hepsinin siprofloksasin dirençli olduğu saptanmıştır.

Bu çalışma, hastanemiz kan izolatlarında *E. coli* ST131 klonuyla beraber H30Rx alt klonunun hakimiyetini, ayrıca bu alt klon ile direnç ve virülansın başarılı birlikteliğinin var olduğunu işaret etmektedir.

Klinik olarak risk altında bulunan hasta gruplarında, yüksek riskli *E. coli* ST131 klonunu hızlı bir şekilde erken tanınması ile başlanacak olan uygun antimikrobiyal tedavi bu klonun yayılımını durduracaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Banerjee R, Johnson JR. A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(9):4997-5004.
2. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(3):543-74.
3. Downing T. Tackling Drug Resistant Infection Outbreaks of Global Pandemic *Escherichia coli* ST131 Using Evolutionary and Epidemiological Genomics. *Microorganisms*. 2015;3(2):236-67.
4. Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Dis* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2010;51(3):286-94.
5. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. *Escherichia coli* ST131: The quintessential example of an international multiresistant high-risk clone. *Adv Appl Microbiol*. 2015;90:109-54.
6. Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect*. 2003;5(5):449-56.
7. Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*. 2005;29(1):83-98.
8. Lawson JM. Update on *Escherichia coli* O157:H7. *Curr Gastroenterol Rep*. 2004;6(4):297-301.
9. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(1):26-38.
10. Nuesch-Inderbinen MT, Baschera M, Zurfluh K, Hachler H, Nuesch H, Stephan R. Clonal Diversity, Virulence Potential and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Causing Community Acquired Urinary Tract Infection in Switzerland. *Front Microbiol*. 2017;8:2334.
11. Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, et al. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(2):274-7.
12. Ukah UV, Glass M, Avery B, Daignault D, Mulvey MR, Reid-Smith RJ, et al. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Escherichia coli* and development of community-acquired urinary tract infections. *Epidemiol Infect*. 2018;146(1):46-57.
13. James T. The story of the enteropathic *Escherichia coli*. *South African medical journal* = *Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*. 1973;47(32):1476-80.
14. Gupta K, Scholes D, Stamm WE. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. *Jama*. 1999;281(8):736-8.
15. Jones RN, Kehrberg EN, Erwin ME, Anderson SC. Prevalence of important pathogens and antimicrobial activity of parenteral drugs at numerous medical centers in the United States, I. Study on the threat of emerging resistances: real or perceived? Fluoroquinolone Resistance Surveillance Group. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1994;19(4):203-15.

16. Escobar-Paramo P, Grenet K, Le Menac'h A, Rode L, Salgado E, Amorin C, et al. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(9):5698-700.
17. Escobar-Paramo P, Le Menac'h A, Le Gall T, Amorin C, Gouriou S, Picard B, et al. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ microbiol.* 2006;8(11):1975-84.
18. Le Gall T, Clermont O, Gouriou S, Picard B, Nassif X, Denamur E, et al. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Evol.* 2007;24(11):2373-84.
19. Blanc V, Leflon-Guibout V, Blanco J, Haenni M, Madec JY, Rafignon G, et al. Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(5):1231-7.
20. Dahbi G, Mora A, Lopez C, Alonso MP, Mamani R, Marzoa J, et al. Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42(4):347-51.
21. Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino J, Ito K, Arakawa Y. Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(1):72-9.
22. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis.* 2000;181(5):1753-4.
23. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Canica MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(2):273-81.
24. Blanco J, Mora A, Mamani R, Lopez C, Blanco M, Dahbi G, et al. Four main virotypes among extended-spectrum-beta-lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. *J Clin Microbiol.* 2013;51(10):3358-67.
25. Van der Bij AK, Peirano G, Pitondo-Silva A, Pitout JD. The presence of genes encoding for different virulence factors in clonally related *Escherichia coli* that produce CTX-Ms. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;72(4):297-302.
26. Mora A, Herrera A, Mamani R, Lopez C, Alonso MP, Blanco JE, et al. Recent emergence of clonal group O25b:H4-B2-ST131 *ibcA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(21):6991-7.
27. Johnson JR, O'Bryan TT, Delavari P, Kuskowski M, Stapleton A, Carlino U, 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):1508-17.
28. Diaz MA, Hernandez-Bello JR, Rodriguez-Bano J, Martinez-Martinez L, Calvo J, Blanco J, et al. Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol.* 2010;48(8):2840-5.
29. Weissman SJ, Chattopadhyay S, Aprikian P, Obata-Yasuoka M, Yarova-Yarovaya Y, Stapleton A, et al. Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2006;59(3):975-88.

30. Weissman SJ, Johnson JR, Tchesnokova V, Billig M, Dykhuizen D, Riddell K, et al. High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 2012;78(5):1353-60.
31. Adams-Sapper S, Diep BA, Perdreau-Remington F, Riley LW. Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and -resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(1):490-7.
32. Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, Clabots C, Roberts PL, Billig M, et al. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. J Infect Dis. 2013;207(6):919-28.
33. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. Emerg Infect Dis. 2008;14(2):195-200.
34. Cagnacci S, Gualco L, Debbia E, Schito GC, Marchese A. European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST 131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. J Clin Microbiol. 2008;46(8):2605-12.
35. Johnson JR, Menard M, Johnston B, Kuskowski MA, Nichol K, Zhanel GG. Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(7):2733-9.
36. Golding GR, Persaud N, Levett PN, McDonald RR, Irvine J, Nsungu M, et al. Characterization of *Escherichia coli* urinary tract infection isolates in remote northern Saskatchewan communities: the Northern Antibiotic Resistance Partnership. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;74(3):242-7.
37. Leflon-Guibout V, Blanco J, Amaqdouf K, Mora A, Guize L, Nicolas-Chanoine MH. Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. J Clin Microbiol. 2008;46(12):3900-5.
38. Brisse S, Diancourt L, Laouenan C, Vigan M, Caro V, Arlet G, et al. Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. J Clin Microbiol. 2012;50(9):2974-81.
39. Lopez-Cerero L, Navarro MD, Bellido M, Martin-Pena A, Vinas L, Cisneros JM, et al. *Escherichia coli* belonging to the worldwide emerging epidemic clonal group O25b/ST131: risk factors and clinical implications. J Antimicrobial Chemother. 2014;69(3):809-14.
40. Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL. *Escherichia coli* sequence type 131 as a prominent cause of antibiotic resistance among urinary *Escherichia coli* isolates from reproductive-age women. J Clin Microbiol. 2013;51(10):3270-6.
41. Mora A, Blanco M, Lopez C, Mamani R, Blanco JE, Alonso MP, et al. Emergence of clonal groups O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 and ONT:H21,42-B1-ST101 among CTX-M-14-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Galicia, northwest Spain. Int J Antimicrob Agents. 2011;37(1):16-21.
42. Olesen B, Hansen DS, Nilsson F, Frimodt-Moller J, Leihof RF, Struve C, et al. Prevalence and characteristics of the epidemic multiresistant *Escherichia coli* ST131 clonal group among extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* isolates in Copenhagen, Denmark. J Clin Microbiol. 2013;51(6):1779-85.

43. Cao X, Cavaco LM, Lv Y, Li Y, Zheng B, Wang P, et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections in 20 Chinese hospitals. *J Clin Microbiol*. 2011;49(7):2496-501.
44. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S. Association of fluoroquinolone resistance, virulence genes, and IncF plasmids with extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) and ST405 clonal groups. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(10):4736-42.
45. Seiffert SN, Hilty M, Kronenberg A, Droz S, Perreten V, Endimiani A. Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in community, specialized outpatient clinic and hospital settings in Switzerland. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(10):2249-54.
46. Izdebski R, Baraniak A, Fiett J, Adler A, Kazma M, Salomon J, et al. Clonal structure, extended-spectrum beta-lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1):309-16.
47. Peirano G, van der Bij AK, Gregson DB, Pitout JD. Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region. *J Clin Microbiol*. 2012;50(2):294-9.
48. Voets GM, Platteel TN, Fluit AC, Scharringa J, Schapendonk CM, Stuart JC, et al. Population distribution of Beta-lactamase conferring resistance to third-generation cephalosporins in human clinical *Enterobacteriaceae* in the Netherlands. *PloS one*. 2012;7(12):e52102.
49. Coelho A, Mora A, Mamani R, Lopez C, Gonzalez-Lopez JJ, Larrosa MN, et al. Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(3):517-26.
50. Uchida Y, Mochimaru T, Morokuma Y, Kiyosuke M, Fujise M, Eto F, et al. Clonal spread in Eastern Asia of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* serogroup O25 strains, and associated virulence factors. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(5):444-50.
51. Cai JC, Zhang R, Hu YY, Zhou HW, Chen GX. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates producing KPC-2 carbapenemase in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(2):1146-52.
52. Kim YA, Qureshi ZA, Adams-Haduch JM, Park YS, Shutt KA, Doi Y. Features of infections due to *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Escherichia coli*: emergence of sequence type 131. *Clin Infect Dis* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2012;55(2):224-31.
53. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Hotta G, Matsushima A, Ito Y, et al. Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(11):2612-20.
54. Naseer U, Olsson-Liljequist BE, Woodford N, Dhanji H, Canton R, Sundsfjord A, et al. Multi-locus variable number of tandem repeat analysis for rapid and accurate typing of virulent multidrug resistant *Escherichia coli* clones. *PloS one*. 2012;7(7):e41232.
55. Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N. Characterization of *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(7):1660-5.

56. Morris D, McGarry E, Cotter M, Passet V, Lynch M, Ludden C, et al. Detection of OXA-48 carbapenemase in the pandemic clone *Escherichia coli* O25b:H4-ST131 in the course of investigation of an outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(7):4030-1.
57. Banerjee R, Strahilevitz J, Johnson JR, Nagwekar PP, Schora DM, Shevrin I, et al. Predictors and molecular epidemiology of community-onset extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* infection in a Midwestern community. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013;34(9):947-53.
58. Pitout JD, Gregson DB, Campbell L, Laupland KB. Molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia in the Calgary Health Region from 2000 to 2007: emergence of clone ST131 as a cause of community-acquired infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(7):2846-51.
59. Pomba C, da Fonseca JD, Baptista BC, Correia JD, Martinez-Martinez L. Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the qnrB2 and aac(6')-Ib-cr genes in a dog. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(1):327-8.
60. Vredenburg J, Varela AR, Hasan B, Bertilsson S, Olsen B, Narciso-da-Rocha C, et al. Quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from birds of prey in Portugal are genetically distinct from those isolated from water environments and gulls in Portugal, Spain and Sweden. *Environ Microbiol*. 2014;16(4):995-1004.
61. Leflon-Guibout V, Jurand C, Bonacorsi S, Espinasse F, Guelfi MC, Duportail F, et al. Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(10):3736-42.
62. Andersen PS, Stegger M, Aziz M, Contente-Cuomo T, Gibbons HS, Keim P, et al. Complete Genome Sequence of the Epidemic and Highly Virulent CTX-M-15-Producing H30-Rx Subclone of *Escherichia coli* ST131. *Genome Announc*. 2013;1(6).
63. Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, et al. The epidemic of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *mBio*. 2013;4(6):e00377-13.
64. Gibreel TM, Dodgson AR, Cheesbrough J, Fox AJ, Bolton FJ, Upton M. Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. *Journal Antimicrob Chemother*. 2012;67(2):346-56.
65. Williamson DA, Freeman JT, Porter S, Roberts S, Wiles S, Paterson DL, et al. Clinical and molecular correlates of virulence in *Escherichia coli* causing bloodstream infection following transrectal ultrasound-guided (TRUS) prostate biopsy. *Journal Antimicrob Chemother*. 2013;68(12):2898-906.
66. Assimacopoulos A, Johnston B, Clabots C, Johnson JR. Post-prostate biopsy infection with *Escherichia coli* ST131 leading to epididymo-orchitis and meningitis caused by Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*. 2012;50(12):4157-9.
67. Johnson JR, Anderson JT, Clabots C, Johnston B, Cooperstock M. Within-household sharing of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* sequence type ST131 strain causing pediatric osteoarticular infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(5):473-5.

68. Ender PT, Gajanana D, Johnston B, Clabots C, Tamarkin FJ, Johnson JR. Transmission of an extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* (sequence type ST131) strain between a father and daughter resulting in septic shock and Emphysematous pyelonephritis. *J Clin Microbiol.* 2009;47(11):3780-2.
69. Owens RC, Jr., Johnson JR, Stogsdill P, Yarmus L, Lolans K, Quinn J. Community transmission in the United States of a CTX-M-15-producing sequence type ST131 *Escherichia coli* strain resulting in death. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3406-8.
70. Johnson JR, Miller S, Johnston B, Clabots C, Debroy C. Sharing of *Escherichia coli* sequence type ST131 and other multidrug-resistant and Urovirulent *E. coli* strains among dogs and cats within a household. *J Clin Microbiol.* 2009;47(11):3721-5.
71. Xu Q, Li X, Jin Y, Sun L, Ding X, Liang L, et al. Bacterial self-defense antibiotics release from organic-inorganic hybrid multilayer films for long-term anti-adhesion and biofilm inhibition properties. *Nanoscale.* 2017.
72. Lee JH, Kim YG, Shim SH, Lee J. Antibiofilm activities of norharmane and its derivatives against *Escherichia coli* O157:H7 and other bacteria. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology.* 2017;36:254-61.
73. Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, et al. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(5):1024-8.
74. Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon JM, Garry L, et al. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. *PloS one.* 2012;7(9):e46547.
75. Tangden T, Cars O, Melhus A, Lowdin E. Foreign travel is a major risk factor for colonization with *Escherichia coli* producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases: a prospective study with Swedish volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(9):3564-8.
76. Lau SH, Kaufmann ME, Livermore DM, Woodford N, Willshaw GA, Cheasty T, et al. UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(6):1241-4.
77. Totsika M, Beatson SA, Sarkar S, Phan MD, Petty NK, Bachmann N, et al. Insights into a multidrug resistant *Escherichia coli* pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: genome analysis and virulence mechanisms. *PloS one.* 2011;6(10):e26578.
78. Croxall G, Hale J, Weston V, Manning G, Cheetham P, Achtman M, et al. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from a regional cohort of elderly patients highlights the prevalence of ST131 strains with increased antimicrobial resistance in both community and hospital care settings. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(11):2501-8.
79. Peirano G, Mulvey GL, Armstrong GD, Pitout JD. Virulence potential and adherence properties of *Escherichia coli* that produce CTX-M and NDM beta-lactamases. *J Med Microbiol.* 2013;62(Pt 4):525-30.
80. van der Bij AK, Peirano G, Goessens WH, van der Vorm ER, van Westreenen M, Pitout JD. Clinical and molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in the Rotterdam Area, Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3576-8.

81. Montesinos I, Rodriguez-Villalobos H, De Mendonca R, Bogaerts P, Deplano A, Glupczynski Y. Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase associated with the ST131 *Escherichia coli* clone in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(8):1828-30.
82. Rodriguez-Villalobos H, Bogaerts P, Berhin C, Bauraing C, Deplano A, Montesinos I, et al. Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* of clinical interest: results of a nationwide survey in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(1):37-47.
83. Literacka E, Bedenic B, Baraniak A, Fiett J, Tonkic M, Jajic-Bencic I, et al. blaCTX-M genes in *Escherichia coli* strains from Croatian Hospitals are located in new (blaCTX-M-3a) and widely spread (blaCTX-M-3a and blaCTX-M-15) genetic structures. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(4):1630-5.
84. Dolejska M, Frolkova P, Florek M, Jamborova I, Purgertova M, Kutilova I, et al. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(12):2784-90.
85. Nielsen JB, Albayati A, Jorgensen RL, Hansen KH, Lundgren B, Schonning K. An abbreviated MLVA identifies *Escherichia coli* ST131 as the major extended-spectrum beta-lactamase-producing lineage in the Copenhagen area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2013;32(3):431-6.
86. Arvand M, Moser V, Pfeifer Y. Prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and spread of the epidemic clonal lineage ST131 in nursing homes in Hesse, Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(11):2686-8.
87. Ewers C, Grobbel M, Stamm I, Kopp PA, Diehl I, Semmler T, et al. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(4):651-60.
88. Cerquetti M, Giufre M, Garcia-Fernandez A, Accogli M, Fortini D, Luzzi I, et al. Ciprofloxacin-resistant, CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 clone in extraintestinal infections in Italy. *Clin Microbiol Infect* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2010;16(10):1555-8.
89. Naseer U, Haldorsen B, Simonsen GS, Sundsfjord A. Sporadic occurrence of CMY-2-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* of ST-complexes 38 and 448, and ST131 in Norway. *Clin Microbiol Infect* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2010;16(2):171-8.
90. Woksepp H, Jernberg C, Tarnberg M, Ryberg A, Brolund A, Nordvall M, et al. High-resolution melting-curve analysis of ligation-mediated real-time PCR for rapid evaluation of an epidemiological outbreak of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4032-9.
91. Hussain A, Ewers C, Nandanwar N, Guenther S, Jadhav S, Wieler LH, et al. Multiresistant uropathogenic *Escherichia coli* from a region in India where urinary tract infections are endemic: genotypic and phenotypic characteristics of sequence type 131 isolates of the CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing lineage. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(12):6358-65.

92. Roy S, Krishnan R, Mukherjee S, Schneiders T, Niyogi SK, Basu S. Prevalence of ST131 virulence-associated strains among CTX-M-producing *Escherichia coli* in the gut of hospitalized neonates in India. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;77(2):158-9.
93. Adler A, Gniadkowski M, Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Hryniewicz W, et al. Transmission dynamics of ESBL-producing *Escherichia coli* clones in rehabilitation wards at a tertiary care centre. *Clin Microbiol Infect : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(12):E497-505.
94. Harada K, Nakai Y, Kataoka Y. Mechanisms of resistance to cephalosporin and emergence of O25b-ST131 clone harboring CTX-M-27 beta-lactamase in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from dogs and cats in Japan. *Microbiol Immunol*. 2012;56(7):480-5.
95. Yokota S, Sato T, Okubo T, Ohkoshi Y, Okabayashi T, Kuwahara O, et al. Prevalence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* O25:H4-ST131 (CTX-M-15-nonproducing) strains isolated in Japan. *Chemother*. 2012;58(1):52-9.
96. Habeeb MA, Haque A, Iversen A, Giske CG. Occurrence of virulence genes, 16S rRNA methylases, and plasmid-mediated quinolone resistance genes in CTX-M-producing *Escherichia coli* from Pakistan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2014;33(3):399-409.
97. Hernandez J, Bonnedahl J, Eliasson I, Wallensten A, Comstedt P, Johansson A, et al. Globally disseminated human pathogenic *Escherichia coli* of O25b-ST131 clone, harbouring blaCTX-M-15, found in Glaucous-winged gull at remote Commander Islands, Russia. *Environ Microbiol Rep*. 2010;2(2):329-32.
98. Yumuk Z, Afacan G, Nicolas-Chanoine MH, Sotto A, Lavigne JP. Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(2):284-8.
99. Szijarto V, Pal T, Nagy G, Nagy E, Ghazawi A, al-Haj M, et al. The rapidly emerging ESBL-producing *Escherichia coli* O25-ST131 clone carries LPS core synthesis genes of the K-12 type. *FEMS microbiology letters*. 2012;332(2):131-6.
100. Peirano G, Pitout JD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(4):316-21.
101. Sennati S, Santella G, Di Conza J, Pallecchi L, Pino M, Ghiglione B, et al. Changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):6003-5.
102. Peirano G, Asensi MD, Pitondo-Silva A, Pitout JD. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;17(7):1039-43.
103. Ruiz SJ, Montealegre MC, Ruiz-Garbajosa P, Correa A, Briceno DF, Martinez E, et al. First characterization of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clones causing community-onset infections in South America. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1993-6.
104. Molina-Lopez J, Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM, Gavilanes-Parra S, Chavez-Berrocal ME, Hernandez-Castro R, et al. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups

among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. J Infect Dev Ctries. 2011;5(12):840-9.

105. Magoue CL, Melin P, Gangoue-Pieboji J, Okomo Assoumou MC, Boreux R, De Mol P. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Ngaoundere, Cameroon. Clin Microbiol Infect : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2013;19(9):E416-20.

106. Fam N, Leflon-Guibout V, Fouad S, Aboul-Fadl L, Marcon E, Desouky D, 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. Microbial drug resistance (Larchmont, NY). 2011;17(1):67-73.

107. Albrechtova K, Dolejska M, Cizek A, Tausova D, Klimes J, Bebora L, et al. Dogs of nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated cephalosporin- and quinolone-resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(7):4013-7.

108. Rakotonirina HC, Garin B, Randrianirina F, Richard V, Talarmin A, Arlet G. Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated in Antananarivo, Madagascar. BMC microbiology. 2013;13:85.

109. Aibinu I, Odugbemi T, Koenig W, Ghebremedhin B. Sequence type ST131 and ST10 complex (ST617) predominant among CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates from Nigeria. Clin Microbiol Infect : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2012;18(3):E49-51.

110. Peirano G, van Greune CH, Pitout JD. Characteristics of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from community hospitals in South Africa. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;69(4):449-53.

111. Mshana SE, Imirzalioglu C, Hain T, Domann E, Lyamuya EF, Chakraborty T. Multiple ST clonal complexes, with a predominance of ST131, of *Escherichia coli* harbouring blaCTX-M-15 in a tertiary hospital in Tanzania. Clin Microbiol Infect : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2011;17(8):1279-82.

112. Dahmen S, Bettaieb D, Mansour W, Boujaafar N, Bouallegue O, Arlet G. Characterization and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in a Tunisian University Hospital. Microbial drug resistance (Larchmont, NY). 2010;16(2):163-70.

113. Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL. Distribution of phylogenetic groups, sequence type ST131, and virulence-associated traits among *Escherichia coli* isolates from men with pyelonephritis or cystitis and healthy controls. Clin Microbiol Infect : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2013;19(4):E173-80.

114. Sidjabat HE, Derrington P, Nimmo GR, Paterson DL. *Escherichia coli* ST131 producing CTX-M-15 in Australia. J Antimicrob Chemother. 2010;65(6):1301-3.

115. Williamson DA, Roberts SA, Paterson DL, Sidjabat H, Silvey A, Masters J, et al. *Escherichia coli* bloodstream infection after transrectal ultrasound-guided prostate biopsy: implications of fluoroquinolone-resistant sequence type 131 as a major causative pathogen. Clin Microbiol Infect : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2012;54(10):1406-12.

116. Guenther S, Ewers C, Wieler LH. Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution? *Frontiers in microbiology*. 2011;2:246.
117. Nascimento T, Cantamessa R, Melo L, Fernandes MR, Fraga E, Dropa M, et al. International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters. *Sci Total Environ*. 2017;598:910-5.
118. Colpan A, Johnston B, Porter S, Clabots C, Anway R, Thao L, et al. *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans. *Clin Microbiol Infect: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;57(9):1256-65.
119. Perez Heras I, Sanchez-Gomez JC, Beneyto-Martin P, Ruano-de-Pablo L, Losada-Pinedo B. Community-onset extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in urinary tract infections in children from 2015 to 2016: Prevalence, risk factors, and resistances. *Medicine*. 2017;96(50):e8571.
120. Simner PJ, Zhanel GG, Pitout J, Tailor F, McCracken M, Mulvey MR, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: results of the CANWARD 2007-2009 study. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;69(3):326-34.
121. Yano H, Uemura M, Endo S, Kanamori H, Inomata S, Kakuta R, et al. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates from *Escherichia coli* at a Japanese tertiary hospital. *PloS one*. 2013;8(5):e64359.
122. Brolund A, Edquist PJ, Makitalo B, Olsson-Liljequist B, Soderblom T, Wisell KT, et al. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007-2011. *Clin Microbiol Infect : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20(6):O344-52.
123. Reyna-Flores F, Barrios H, Garza-Ramos U, Sanchez-Perez A, Rojas-Moreno T, Uribe-Salas FJ, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O25b-ST131 isolates causing community-acquired UTIs in Mexico. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;76(3):396-8.
124. Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, et al. Nationwide survey of extended-spectrum {beta}-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the French community setting. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(6):1205-14.
125. Kang CI, Cha MK, Kim SH, Ko KS, Wi YM, Chung DR, et al. Clinical and molecular epidemiology of community-onset bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* over a 6-year period. *J Korean Med Sci*. 2013;28(7):998-1004.
126. Dhanji H, Doumith M, Rooney PJ, O'Leary MC, Loughrey AC, Hope R, et al. Molecular epidemiology of fluoroquinolone-resistant ST131 *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in nursing homes in Belfast, UK. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(2):297-303.
127. Chung HC, Lai CH, Lin JN, Huang CK, Liang SH, Chen WF, et al. Bacteremia caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type ST131 and non-ST131 clones: comparison of demographic data, clinical features, and mortality. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(2):618-22.

128. Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from children with urinary tract infection and from healthy carriers. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(5):543-8.
129. Dierikx CM, van Duijkeren E, Schoormans AH, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Kant A, et al. Occurrence and characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(6):1368-74.
130. Guo S, Brouwers HJ, Cobbold RN, Platell JL, Chapman TA, Barrs VR, et al. Fluoroquinolone-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, including O25b-ST131, isolated from faeces of hospitalized dogs in an Australian veterinary referral centre. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(5):1025-31.
131. Banerjee R, Johnston B, Lohse C, Chattopadhyay S, Tchesnokova V, Sokurenko EV, et al. The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(12):5912-7.
132. Banerjee R, Robicsek A, Kuskowski MA, Porter S, Johnston BD, Sokurenko E, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 and H30-Rx subclones among extended-spectrum-beta-lactamase-positive and -negative *E. coli* clinical isolates from the Chicago Region, 2007 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(12):6385-8.
133. Giufre M, Graziani C, Accogli M, Luzzi I, Busani L, Cerquetti M. *Escherichia coli* of human and avian origin: detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(4):860-7.
134. Schink AK, Kadlec K, Kaspar H, Mankertz J, Schwarz S. Analysis of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates collected in the GERM-Vet monitoring programme. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(8):1741-9.
135. Dhanji H, Murphy NM, Doumith M, Durmus S, Lee SS, Hope R, et al. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(12):2534-7.
136. Vincent C, Boerlin P, Daignault D, Dozois CM, Dutil L, Galanakis C, et al. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):88-95.
137. Simoes RR, Poirel L, Da Costa PM, Nordmann P. Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):110-2.
138. Guenther S, Grobbel M, Beutlich J, Guerra B, Ulrich RG, Wieler LH, et al. Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(3):582-4.
139. Huber H, Zweifel C, Wittenbrink MM, Stephan R. ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Switzerland. *Vet Microbiol*. 2013;162(2-4):992-6.
140. Pitout JD. Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs*. 2010;70(3):313-33.

141. Huse HK, Miller SA, Chandrasekaran S, Hindler JA, Lawhon SD, Bemis DA, et al. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Evaluation of Oxacillin and Cefoxitin Disk Diffusion and Minimum Inhibitory Concentration Breakpoints for Detection of *mecA*-mediated Oxacillin Resistance in *Staphylococcus schleiferi*. *J Clin Microbiol*. 2017.
142. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(1):119-23.
143. Schaeffer AJ. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection--*usp*, *iha*, and *iroN*(*E. coli*). *J Urol*. 2003;169(4):1613.
144. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis*. 2000;181(1):261-72.
145. Johnson JR, O'Bryan TT, Low DA, Ling G, Delavari P, Fasching C, et al. Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express *papG* allele III. *Infect Immun*. 2000;68(6):3327-36.
146. Sherchan JB, Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama T, Ohmagari N, Kirikae T, Nagamatsu M, et al. Clinical epidemiology and molecular analysis of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Nepal: characteristics of sequence types 131 and 648. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3424-32.
147. Aktas E, Otlu B, Erdemir D, Ekici H, Bulut E. 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. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)*. 2017;23(8):1032-6.
148. Mora A, Dahbi G, Lopez C, Mamani R, Marzoa J, Dion S, 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. *PloS one*. 2014;9(1):e87025.
149. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(1):1-14.
150. Safi M, Achour W, Baaboura R, El Fatmi R, Ben othmen T, Ben Hassen A. Distribution of virulence associated traits among urine *Escherichia coli* isolates from patients in onco-hematology. *J Infect Chemother : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2016;22(4):221-4.
151. Can F, Kurt-Azap O, Nurtop E, Ispir P, Seref C, Ergonul O. Molecular Epidemiology of Bloodstream Associated *E. coli* ST131 H30-Rx Subclone Infection in a Region with High Quinolone Resistance. *J Med Microbiol*. 2016.
152. Ripoll A, Galan JC, Rodriguez C, Tormo N, Gimeno C, Baquero F, et al. Detection of resistance to beta-lactamase inhibitors in strains with CTX-M beta-lactamases: a multicenter external proficiency study using a well-defined collection of *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol*. 2014;52(1):122-9.

8. EKLER

EK.1 Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar

Kan yolu enfeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli*'lerde karbapenem direnç genleri ve ST131/H30 varlığı

Öznur Gürpınar, Ahmet İlbaý, Gökhan Metan, Pınar Zarakolu, Özgen Köseoğlu Eser
37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16 – 20 Kasım 2016, Antalya.
Sözlü Bildiri.

Frequency of ST131/H30 clone/subclone and carbapenem resistance genes in fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* bloodstream isolates

Öznur Gürpınar, Ahmet İlbaý, Gokhan Metan, Pınar Zarakolu, Özgen Eser
27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 22-25
April 2017, Vienna, Austria.
Poster presentation.



Kinolon Dirençli ve Duyarlı İnvaziv *Escherichia coli* Kan İzolatlarında ST131/H30 Klon/Subklonunun Virulans İle İlişkisi

Öznur Gürpınar, Ahmet İlbay, Gökhan Metan, Pınar Zarakolu, Özgen Köseoğlu Eser
4. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 08 - 12 Kasım 2017, Antalya.
Sözlü Bildiri.

İnvaziv *Escherichia coli* Kan İzolatlarında Karbapenemaz Varlığının Hızlı Tanısı

Öznur Gürpınar, Pınar Zarakolu, Özgen Köseoğlu Eser
4. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 08 - 12 Kasım 2017, Antalya.
Poster Bildirisi.



Rapid diagnosis of carbapenem present in invasive *Escherichia coli* blood isolates

Öznur Gürpınar¹, Özgen Köseoğlu Eser, Pınar Zarakolu

10th Balkan Congress of Microbiology, 16th – 18th November 2017, Sofia, Bulgaria,
Poster presentation.



RAPID DIAGNOSIS OF CARBAPENEMASES IN INVASIVE *ESCHERICHIA COLI* BLOOD ISOLATES

Öznur Gürpınar¹, Pınar Zarakolu², Özgen Köseoğlu Eser¹

¹Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology

²Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology



INTRODUCTION

Escherichia coli is an important pathogen with increasing morbidity and mortality rates worldwide particularly with the complications of bacteremia and/or sepsis occurring during nosocomial infections. This pathogen has become a superbug, especially resistant to fluoroquinolones (FQ) and broad-spectrum cephalosporins due to extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in the last 20 years. *E. coli* is known as the most frequently isolated pathogen from bloodstream infections. Resistance to FQ, broad spectrum cephalosporins and broad spectrum beta-lactams used in the 1980s has increased rapidly in the last 20 years.

AIM

The aim of this single center study was to assess the performance of a commercial immunochromatographic diagnostic assay for the rapid detection of carbapenemases in *E. coli* bloodstream isolates which were detected in patients hospitalized in Hacettepe University Adult Hospitals during one-year period of 2015.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and antimicrobial testing: A total of 157 *E. coli* bloodstream isolates were included. The isolates were identified by the MALDI-TOF/MS system and verified by conventional methods. Patient's demographic data, risk factors and underlying diseases were retrospectively reviewed from the electronic patient records.

Antimicrobial resistance testing was performed for imipenem and ertapenem in all *E. coli* bloodstream isolates and they were tested by immunochromatographic method using a commercial kit (Coris BioConcept, Belgium) to detect OXA-48, KPC and NDM. This method; Using colloidal gold nanoparticles bound to a nitrocellulose membrane in the lateral flow device, is based on the immunological capture of two epitopes specific to OXA-48, KPC and NDM enzymes.

Figure 1: Immunochromatographic method

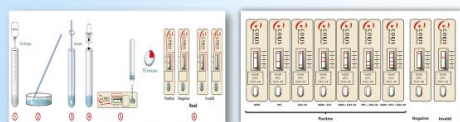
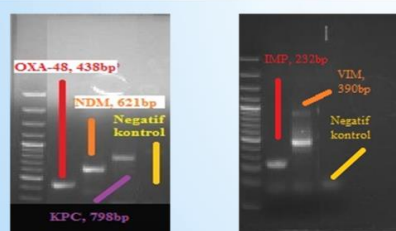


Figure 2: *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} PCR results of genes



Immunochromatographic Method

Isolates were produced in Mueller-Hinton II cation-adjusted media. 10 drops of LY-A buffer (pH: 7,5) were first added to the test tubes, then one of the colony grown in Mueller Hinton agar was added to the tube and homogenized. Three drops of the obtained solution were dropped in the well. If there is only one line at the end after 15 min, the test is negative. The other 3 lines were evaluated as positive if the enzyme belonged to one if it was positive.

Detection of Carbapenem Resistance Genes

Carbapenem resistance genes (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{PER}) were investigated by PCR method.

RESULTS

The mean age of the 152 patients included in the study was 60.3±18.6, and the mean hospitalization time was 25.9±35.1.

Table 1. Distribution of patients according to the service

Service	Number (%)
Emergency	63 (40.4)
Intensive care unit	29 (18.1)
Oncology	25 (16.0)
Surgical services	20 (13.0)
Internal services	15 (10.0)
Bone marrow transplantation unit	3 (1.9)
Infectious diseases service	1 (0.6)

- ✓ Hospital-borne *E. coli* infections rate was 53.3% and mortality was 42.0%. 59.9% of the patients had malignancy as the underlying disease.
- ✓ Antibiotic use rate of the patients before bacteremia was 46.1%, beta-lactam / beta-lactamase inhibitor was used in 24.3%, carbapenem was used in 14.5% and FQ was used in 13.1% of these patients. Urinal catheterization was found in 36.8% of the patients and central venous catheter was found in 20.4% of the patients.
- ✓ It was determined that all isolates were susceptible to imipenem and ertapenem.
- ✓ Of the *E. coli* blood isolates, 157 (100%) were found negative for OXA-48, NDM and KPC with rapid test.
- ✓ *E. coli* blood isolates were found positive for *bla*_{OXA-48}, 33 (21.0%), *bla*_{NDM} two (1.3%) and *bla*_{VIM} five (3.2%) genes. They were negative for *bla*_{KPC} and *bla*_{IMP} by PCR method.

CONCLUSIONS

- ❖ In this study, carbapenem susceptible isolates were all negative for three main carbapenemases; OXA-48, NDM and KPC by rapid immunochromatographic test.
- ❖ In this study, 40 isolates which were negative for carbapenemases by rapid test were found carbapenemase producers by conventional PCR. This may be explained by phenotypical expression of resistance genes has not been occurred in genotypically carbapenemase producing isolates.
- ❖ As a result, the immunochromatographic rapid test is unable to detect isolates of carbapenem sensitive, carbapenemase-producers. For this reason, planning of antimicrobial therapy based on rapid diagnosis of carbapenem resistant blood-borne pathogens should be performed with caution during such rapid diagnostic tests.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Hacettepe University Scientific Research Unit with a grant project (Project no. THD-2017-12974).

REFERENCES

- Koroska F, Götting S, Kaase M, Steinmann, Gatermann S, Sommer J, Wille T, Plum G, Hamprecht A. Comparison of Phenotypic Tests and an Immunochromatographic Assay and Development of a New Algorithm for Detection of OXA-48-like Carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2017 Mar;55(3):877-883.
- Poirer L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiol Infect Dis* 2011; 70: 119-123.

Correlation between ST131/H30 clone/subclone and the virulence in fluoroquinolone resistant and sensitive invasive blood isolates of *Escherichia coli*

Öznur Gürpınar, Ahmet Ilbay, Gökhan Metan, Pınar ZarakolU, Özgen Eser

28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 21-24

April 2018, Spain, Madrid

Poster presentation.



Molecular Epidemiology and Virulence Determinants of *Escherichia coli* ST131/H30 Clone/subclone Among Bloodstream Isolates

Öznuur Gürpınar¹, Almet Ilbay², Gökhan Metan³, Pinar Zarakolu¹, Özgen Eser¹

¹Hacettepe University Faculty of Medicine

²Department of Medical Microbiology, ³Department of Internal Medicine,

⁴Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Ankara TURKEY



28th ECCMID 21-24 April 2018 Madrid, Spain

Copyright © 2018
Hacettepe University
All rights reserved.

INTRODUCTION AND PURPOSE

Escherichia coli sequence type 131 (ST131) is a worldwide pandemic clone. It causes predominantly community onset antimicrobial-resistant infections. ST131 clone was first identified in 2008 by multilocus sequence typing (MLST) method in extended-spectrum-beta-lactamase producing *E. coli* isolates. A high prevalence of the clone has been identified in fluoroquinolone resistant (QR) *E. coli* isolates. The aim of this study was to determine the frequency of ST131/H30 clone/subclone, antimicrobial resistance and virulence genes in *E. coli* bloodstream isolates of patients hospitalized during one-year period, 2015 at Hacettepe Hospital.

METHODS

Bacterial Isolates and Patients
A total of 157 *E. coli* bloodstream isolates from patients admitted to Hacettepe University Adult Hospital were included. The isolates were identified by the MALDI-TOF/MS system and verified by conventional methods. Patient demographic data, risk factors and underlying diseases were retrospectively reviewed from the electronic patient records.

Antimicrobial Susceptibility Testing
Antimicrobial susceptibilities to AMP, SAM, CAZ, CRO, CTX, BCT, GEN, TMP-SMX were determined by disc diffusion. Susceptibilities to CIP and INP were performed by antibiotic-gradient test method (Bioscience, Turkey).

Molecular Testing
ST131/H30 clone/subclone, carbapenem resistance genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA}, *bla*_{IMP}) and the virulence genes [*fliC* (unpathogen-specific protein), *fliC*_{H70} (adhesin), *ompT* (outer membrane receptor), *iutA* (serine protease)] were investigated by PCR method.

PCR detection of the O25b-ST131 clone isolates
Primers O25bUpR-5'-TCC AGC AGC TCG ATC GT-3' and O25bUpR-5'-GCG AAA ATT TTC GGC GTA CTG T-3' were used to amplify a 347 bp fragment of the *pubB* gene specifically in isolates belonging to the O25b-ST131 clone as described by Clement et al.

PCR detection of carbapenemase and extended spectrum beta-lactamases (ESBL)
Genetic determinants of ESBL production (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA}, *bla*_{IMP}) and carbapenemase (*bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}) were identified by PCR as described by Patel et al. The PCR mixture contained bacterial DNA, primers (0.3 μM), PCR buffer 50 mM, 200 mM (each) deoxynucleoside triphosphates and 1.25 U Taq polymerase (New England Biolabs, USA). The mixtures were amplified in 36 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 40 sec and 72°C for 50 sec, with a final extension at 72°C for 10 min in thermal cycle.

PCR detection of the virulence genes
Genetic determinants of virulence genes [*fliC* (unpathogen-specific protein), *fliC*_{H70} (adhesin), *ompT* (outer membrane), *iutA* (serine protease)] were investigated by PCR method.

rate receptor), *iutA* (serine protease) were identified by PCR. The PCR mixture contained bacterial DNA, 0.3 μM primers, 50 mM PCR buffer, 200 mM of each deoxynucleoside triphosphates and 1.25 U Taq polymerase (New England Biolabs, USA).

Primers: *fliC* (unpathogen-specific protein), F-5'-ACA TTC AGC AGC CTC AG-3', R-5'-AGC GAG TTC CTG GTG AAA GC-3' (440 bp), *fliC*_{H70} (adhesin) F-5'-ATG GCA GTG GTG TCT TTT GGT G-3', R-5'-CGT CCG ACC ATA GGT CTT C-3' (717 bp), *ompT* (outer membrane receptor) F-5'-ATC TAG CCG AAG AAG GAG GC-3', R-5'-CGC GGG TCA TAG TGT TCA TC-3' (359 bp), *iutA* (serine protease) F-5'-GCG TGG ACA TCA TGG GAA CTG G-3', R-5'-CGT CCG GAA GAA GAA TCG-3' (302 bp) were used.

RESULTS

The mean age of totally 152 patients was 60.3±18.6. The mean hospitalization time was 25.9±35.1. The ratio for hospital-acquired *E. coli* infections was 53.3%.

Of the patients, 59.9% had malignancy as the most prevalent underlying diseases. Mortality rate was 42%. Urinary catheterization was found 36.8% and central venous catheterization was 20.4%.

Table 1. Distribution of hospitalized patients according to units/wards

Emergency unit	n
Intensive care units	63
Bone marrow transplantation unit	27
Oncology units	3
Surgical units	25
Internal medicine wards	19

CONCLUSIONS

This study showed that the presence of ST131 was high in *E. coli* bloodstream isolates in our hospital. ST131-infected patients were frequently immunosuppressed with a long history of hospitalization and antibiotic intake prior to bacteremia was high in these patients. *bla*_{TEM} was the most common carbapenemase and *ompT* and *iutA* were the most common virulence genes in ST131 isolates. In conclusion, ST131 clone, in particular the H30R subclone showed prominent resistance to fluoroquinolones due to CTX-M-15 type ESBL production.

References

1. Patel R, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* O25b-ST131 clone. J Antimicrob Chemother 2008; 64: 254-7.
2. Patel R, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O25b-ST131 clone. J Antimicrob Chemother 2008; 64: 254-7.
3. Shuman B, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* O25b-ST131 clone. J Antimicrob Chemother 2008; 64: 254-7.

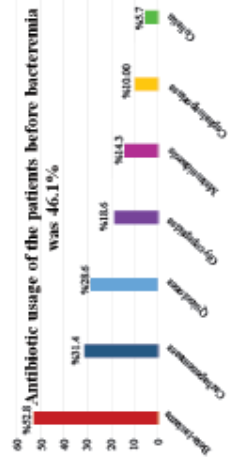


Figure 1. Antibiotic usage of the patients before bacteremia

- Among *E. coli* bloodstream isolates, 156 (99.4%) were found to have ST131 clone and 111 (70.7%) H30 subclone.
- The predominant carbapenemase was *bla*_{TEM} (21%), followed by *bla*_{SHV} (1.3%) and *bla*_{KPC} (3.2%). There was no *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA} production.
- Antimicrobial resistance rates for SAM, GEN, AMP, CRO, TMP-SMX, CAZ, CTX and CIP were 23%, 32%, 65%, 23.5%, 37%, 7.7%, 12% and 53.5%, respectively. All isolates were susceptible to INP and BCT.
- Of the isolates, 84 (53.5%) were QR and all were belonged to the ST131 clone. Of these, 80 (95.2%) were belonged to the H30 subclone.
- Among 53.5% ESBL-positive isolates, 40.7% were *bla*_{TEM} positive and 45.2% were *bla*_{KPC} positive. Of the CTX-M-15 positive isolates, 97.2% were identified as H30-Rx positive.
- Virulence genes *ompT* (82.2%), *iutA* (78.2%), *fliC* (64.3%) and *fliC*_{H70} (22.9%) were common in ST131 isolates.

9. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Ad-Soyad: Öznur GÜRPINAR

Doğum Yeri - Tarihi: Ankara- 03.01.1991

Uyruk: TC

İletişim Adresi: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Telefon: 506 605 50 49

II. Eğitim

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi SBE. Mikrobiyoloji Programı

Lisans: Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Programı

III. Mesleki Deneyim

IV. Bildiri Faaliyetleri

Yayınlar:

ÖZNUR GÜRPINAR, AHMET İLBAY, GÖKHAN METAN, PINAR ZARAKOLU, ÖZGEN KÖSEOĞLU ESER (2016). Kan Yolu Enfeksiyonlarından İzole Edilen *Escherichia coli* 'lerde Karbapenem Direnç Genleri ve ST131/H30 Varlığı. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

ÖZNUR GÜRPINAR, BARIŞ BORAL, ALPER ERGİN, ÖZGEN KÖSEOĞLU ESER (2016). Çok İlaça Dirençli İnvaziv *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Tigesiklin Duyarlılığı. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, (Özet Bildiri/Poster)

ÖZNUR GÜRPINAR, AHMET İLBAY, GOKHAN METAN, PINAR ZARAKOLU, ÖZGEN ESER (2017). Frequency of ST131/H30 Clone/Subclone and Carbapenem Resistance Genes In Fluoroquinolone Resistant *Escherichia coli* Bloodstream Isolates. ECCMID 2017 (Özet Bildiri/Poster)

ÖZNUR GÜRPINAR, AHMET İLBAY, GÖKHAN METAN, PINAR ZARAKOLU, ÖZGEN KÖSEOĞLU ESER (2017). Kinolon Dirençli ve Duyarlı İnvaziv *Escherichia coli* Kan İzolatlarında ST131/H30 Klon/Subklonunun Virulans İle İlişkisi. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

ÖZNUR GÜRPINAR, PINAR ZARAKOLU, ÖZGEN KÖSEOĞLU ESER (2017). İnvaziv *Escherichia coli* Kan İzolatlarında Karbapenemaz Varlığının Hızlı Tanısı.

4. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, (Özet Bildiri/Poster)

ÖZNUR GÜRPINAR, ÖZGEN KÖSEOĞLU ESER, PINAR ZARAKOLU (2017). Rapid Diagnosis of Carbapenem Present in Invasive *Escherichia coli* Blood Isolates. 10. Balkan Kongresi, (Özet Bildiri/Poster)

ÖZNUR GÜRPINAR, AHMET ILBAY, GÖKHAN METAN, PINAR ZARAKOLU, ÖZGEN ESER (2018). Correlation Between ST131/H30 Clone/Subclone and The Virulence in Fluoroquinolone Resistant and Sensitive Invasive Blood Isolates of *Escherichia coli*. ECCMID 2018, (Özet Bildiri/Poster)

TAHSİN BATUHAN AYDOĞAN, ÖZNUR GÜRPINAR, ÖZGEN ESER, ALİ ERGEN (2018). The Role of Comprehensive Microbiological Diagnosis in The Aetiology of Interstitial Cystitis: A Prospective Case-Control Study. ECCMID 2018, (Özet Bildiri/Poster)

TAHSİN BATUHAN AYDOĞAN, ÖZNUR GÜRPINAR, ÖZGEN ESER, ALİ ERGEN (2018). İnterstisyel Sistit Etiyolojisinde Kapsamlı Mikrobiyolojik Tanının Rolü: İleriye Dönük Bir Vaka-Kontrol Çalışması
Ankem 2018, (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

Burs:

Tübitak 1002 Hızlı Destek Programı (Proje No: 166S009)