



T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**İDRAR YOLU ENFEKSİYON ETKENİ *E.coli* İZOLATLARINDA
FOSFOMİSİN DİRENÇ GENLERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Funda YAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR-2021



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

İDRAR YOLU ENFEKSİYON ETKENİ *E.coli* İZOLATLARINDA
FOSFOMİSİN DİRENÇ GENLERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FOSFOMYCIN
RESISTANCE GENES in *E. coli* ISOLATES

Hazırlayan

Funda YAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Doç. Dr. Fikriye Milletli SEZGİN

KIRŞEHİR-2021

KABUL VE ONAY

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans 171212003 numaralı öğrencimiz Funda YAĞ tarafından hazırlanan “İdrar Yolu Enfeksiyon Etkeni E.coli İzolatlarında Fosfomisin Direnç Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu” adlı tez çalışması **12.03.2021** tarihinde AYDEP (Ahi Yeterliliğe Dayalı Eğitim Projesi) uzaktan eğitim kapsamında yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Yüksek Lisans Tezi kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

(Başkan)

Doç. Dr. Fikriye MİLLETLİ SEZGİN

Amasya Üniversitesi

(Danışman)

Doç. Dr. Akın TEKCAN

Amasya Üniversitesi

(Üye)

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm.

Funda YAĞ



ÖNSÖZ

Bu çalışma, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Çalışmada, Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen idrar örneklerinden izole edilen 24 fosfomisin dirençli *E.coli* izolatu dâhil edilmiş olup antibiyotik direnç profilini belirleyerek bu direncin aktarılması amaçlandı.

Bitirme çalışmamın danışmanlığını üstelenen tez konumu belirlemede ve çalışmalarım sırasındaki bütün zorlukları aşmamda bana rehber olan çalışmamı adım adım takip ederek her türlü desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Fikriye Milletli Sezgin'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen çalışmamın her adımını takip ederek bana yardımcı olan, her zaman desteğini gördüğün sayın hocam Prof. Dr. Elif Sevim hocama teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca beni motive eden canım kızım Eylül YAĞ ve çalışmalarım boyunca yardımını, desteğini esirgemeyen maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan eşim Tanju YAĞ'a teşekkür ederim.

Benim bu günlere gelmemde büyük emeği olan hayatım boyunca her zaman maddi manevi yanımda olan, desteklerini hiç esirgemeyen anneme teşekkür ederim.

Kırşehir- 2021

Funda YAĞ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ÖZET.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1. GİRİŞ	17
2.GENEL BİLGİLER.....	18
2.1. <i>E.Coli</i>	18
2.1.1. <i>E.coli</i> 'nin Epidemiyolojisi ve Virölans özellikleri	19
2.1.2. <i>E.coli</i> Enfeksiyonları.....	20
2.1.3. Tedavisi	21
2.1.4. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	21
2.2. Fosfomisin.....	22
2.2.1. Etki Mekanizması.....	23
2.2.2. Antibakteriyel Aktivitesi	23
2.2.3. Direnç Mekanizması	25
2.3. Genler	26
2.3.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL).....	26
2.3.2. SHV Grubu	26
2.3.3. TEM Grubu.....	26
2.3.4. PER Grubu.....	27
2.3.5. OXA Grubu	27
2.3.6. CTX-M Grubu	27
2.3.7. Diğer GSBL'ler.....	28

2.3.8. Fosfomisin Direnç Genleri	28
2.3.9. Kinolon Grubu Direnç Genler	29
3. MATERYAL VE METOT	29
3.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri, Vektörler ve Primerler	29
3.2. Bakterilerin Tanımlanması ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi.....	30
3.2.1. Vitek 2 Compact (bioMérieux, Fransa) Otomatize Sistemi	30
3.2.2. Disk Difüzyon Yöntemi	31
3.3. <i>E. coli</i> izolatlarından DNA Ekstraksiyonu	32
3.4. Fosfomisin Dirençli <i>E. coli</i> suşlarının Direnç Genlerinin ve İntegron Gen Kasetlerinin Tespiti	32
3.5. Bakteriyal Genotipleme	35
3.5.1. REP-PCR.....	35
3.6. Plazmit Aracılı Fosfomisin Direncinin Belirlenmesi.....	35
3.6.1. Konjugasyon.....	35
3.6.2. Plazmit izolasyon kiti	37
3.7. PCR Tabanlı Plazmit Replikasyon Orjini Belirleme	37
3.8. Veri Analizi.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. İdrar Örneklerinin Toplandığı Servisler.....	39
4.2. İzole Edilen <i>E. coli</i>'lerin Antibiyotik Duyarlılıkları.....	40
4.3. Fosfomisin dirençli <i>E. coli</i> izolatlarının Antibiyotik Direnç Genlerinin belirlenmesi.....	42
4.4. Plazmit Aracılı Fosfomisin Direncinin Belirlenmesi	47
4.5. Rep-PCR.....	48
4.6. Pcr Tabanlı Replikasyon Orjini Belirleme	49
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	52

KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	63



ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** Fosfomisin kimyasal yapısı (Michalopoulos ve ark., 2011'dan).....22
- Şekil 2.** *fosA3* geni PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: DNA markır (Trans, 100 bp plus DNA ladder), 1: FF25 izolatu *fosA3* geni.42
- Şekil 3 (a, b).** *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{SHV}* genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüleri. M: DNA markır (Trans, 100 bp plus DNA ladder), *bla_{TEM}* geni görüntüleri (1-11); 1: FF2, 2: FF4, 3:FF5, 4:FF8, 5:FF10, 6:FF11, 7:FF15, 8:FF22, 9:FF23, 10:FF24, 11:FF25 , *bla_{OXA-1}* genleri görüntüleri (12-17) ; 12:FF6, 13:FF9, 14:FF13, 15:FF14, 16:FF15, 17:FF18, *bla_{SHV}* genleri görüntüleri (1-3);1:FF2, 2:FF15, 3:FF21.....43
- Şekil 4:** *bla_{CTX-M}* geni PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: DNA markır (Trans, 100 bp plus DNA ladder). *bla_{CTX-M}* geni görüntüleri (1-14) ; 1:FF3, 2:FF6, 3:FF8, 4:FF9, 5:FF10, 6:FF13, 7:FF14, 8:FF15, 9:FF18 ,10:FF20 ,11:FF21, 12:FF22, 13:FF23, 14:FF2544
- Şekil 5 :** *aac-(6')-ib-cr* geninin PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: DNA markır (Trans, 100 bp plus DNA ladder). *aac-(6')-ib-cr* genleri (1-9) ; 1:FF2, 2:FF3, 3:FF10,4: FF13, 5:FF14, 6:FF15,7:FF18, 8:FF21,9:FF25.....44
- Şekil 6:** *qnrB* ve *qnrS* genlerinin PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: DNA markır (Trans, 100 bp plus DNA ladder).*qnrB* genleri (1-6); 1:FF2, 2:FF3, 3:FF10, 4:FF15, 5:FF18, 6:FF21, *qnrS* genleri (7-12) ; 7:FF2, 8:FF3, 9:FF10, 10:FF15, 11:FF18, 12: FF21.45
- Şekil 7:** Sınıf-1 integronların genlerinin PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü.45
- Şekil 8 :** İzolatların rep-PCR analizi.....48
- Şekil 9:** Konjugatif pTc25'imn PCR-tabanlı replikasyon orjini. M1: multipleks 1. reaksiyon (HI1, HI2, I1), M2: multipleks 2. reaksiyon (X, L/M, N), M3: multipleks 3. reaksiyon (FIA, FIB, W), M4: multipleks 4. reaksiyon (Y, P, FIC), M5: multipleks 5. reaksiyon (A/C, T, FIAs), S1: F simpleks reaksiyon, S2: K simpleks reaksiyon, S3: B/O simpleks reaksiyon.....49
- Şekil 10:** Transformant pTf21'in PCR-tabanlı replikasyon orjini. M1: multipleks 1. reaksiyon (HI1, HI2, I1), M2: multipleks 2. reaksiyon (X, L/M, N), M3: multipleks 3. reaksiyon (FIA, FIB, W), M4: multipleks 4. reaksiyon (Y, P, FIC), M5: multipleks 5. reaksiyon (A/C, T, FIAs), S1: F simpleks reaksiyon, S2: K simpleks reaksiyon, S3: B/O simpleks reaksiyon.....49

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1: Fosfomisin Antibiyotik Zon Çapı	31
Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Primerler ve Özellikleri.....	32
Tablo 3: Çalışmada Kullanılan Genlerin Büyüklükleri, Tm'leri ve Uzama Süreleri	34
Tablo 4: Fosfomisin dirençli <i>E.coli</i> izolatların toplandığı servis ve özellikleri	39
Tablo 5a: Antibiyotik Direnç Yüzdeleri.	40
Tablo 5b: <i>E.coli</i> İzolatlarının Standart Disk Diffüzyon Testleri İle Elde Edilen Antimikrobiyal Test Sonuçları (İzolatlar FF ve sıralı rakamlar kullanılarak kodlanmıştır).41	
Tablo 6: Fosfomisin Dirençli <i>E. coli</i> İzolatlarının Antibiyotik Direnç Genleri.....	46
Tablo 7: Plazmit Aracılı Fosfomisin Direnç Genlerinin Tespiti.....	47



SİMGELER VE KISALTMALAR

μ: Mikron

μg: Mikrogram

μM: Mikromolar

μl: Mikrolitre

ml: Mililitre L Litre

VP: Voges Proskauer

MRSA: Metilin Dirençli Stafilakok Aureus

H₂S: Sülfürik asit

°: Derece

C: Santigrat

E. coli: Escherichia coli

K. pneumoniae: Klebsiella pneumoniae

DNA: Deoksiribonükleaz

GSBL: Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz

MİK: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu

CLSI: Clinical Laboratory Standarda Institute

EMB: Eosin Metilen Blue

PCR: Polimeraz zincir reaksiyon

FF: Fosfomisin

AM: Ampisilin

SXT: Trimethoprim Sülfametaksazol

GN: Gentamisin

AMC: Amoksisilin Klavunolik Asit

CRO: Sefriaksion

CIP: siproflaksasin

CXM: Sefuroksim

TPZ: Tazobaktam Piperilik Asit

CAZ: Seftazidim

CFM: Sefiksim

FOX: Sefoksitin

AK: Amikasin

N: Netilmisin

ERT: Ertapenem

MEM: Meropenem

IMP: İmipenem

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İDRAR YOLU ENFEKSİYON ETKENİ *E.coli* İZOLATLARINDA FOSFOMİSİN DİRENÇ GENLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Funda YAĞ

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Fikriye Milletli SEZGİN

İYE, üriner ürotelyumun inflamasyonu olup idrar kesesinde asemptomatik bakteriyel kolonizasyon tablosundan sepsise kadar ulaşabilen ciddi düzeyde mortalite ve morbiditeye sebebiyet verebilen genel bir terimdir. İYE’de görülen semptomları arasında poliüri, pollaküri, dizüri, urgency, piyüri, ateş ve böbrek ağrısı bulgularından bir veya birden fazlası birlikte gözlenebilmektedir. *E.coli* toplum kaynaklı üriner infeksiyonlarında ve nozokomiyal üriner sistem infeksiyonlarında sorumlu tutulmaktadır. Antibiyotik direnci ve bu direncin yayılımı tüm dünyada sağlık alanında oldukça endişe verici bir durumdur. İdrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde fosfomisin antibiyotiği yeniden gündeme gelmiştir. Bu Çalışmada, idrar yolu enfeksiyon etkeni *E.coli* izolatlarında fosfomisin dirençli genlerinin moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu doğrultuda Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen idrar örneklerinden izole edilen 24 fosfomisin dirençli *E.coli* izolatı dâhil edilmiştir.

İzolatların tür tayini ve antibiyotik duyarlılık çalışmaları Vitek 2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ve disk difüzyon yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen *E.coli* izolatlarında fosfomisin direncinden sorumlu olduğu bilinen plazmit kaynaklı *fosA*, *fosA3*, *fosB*, *fosC*, *fosC2*, *fosX* genleri spesifik primerler kullanılarak PCR yardımı ile taranmıştır.

E.coli izolatlarının ayrıca beta-laktam ve kinolon grubu antibiyotiklerine karşı dirençten sorumlu olan *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{PER-1}, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac*-(6')-*ib-cr* genlerin ve Sınıf-1 ve Sınıf-2 integron varlığı spesifik primerler kullanılarak PCR yardımı ile taranmıştır. İzolatların Klonal ilişkileri REP PCR yardımı ile çalışılmıştır. İzolatlardan elde edilen konjugatif ve transformant plazmitlerin replikasyon orijinleri PCR-temelli replikasyon orijini belirleme yöntemine göre gerçekleştirilmiştir.

Fosfomisin direncini belirlemek için yapılan PCR işlemi sonucunda 24 örnekten 1 (FF25)'i *fosA3* geni bakımından pozitif bulunmuştur. Örneklerin 11'inde *bla*_{TEM}, 6'sında *bla*_{OXA-1}, 3'ünde *bla*_{SHV} geni varlığı tespit edilmiştir. *bla*_{CTX-M} geni için yapılan PCR sonucunda ürünler dizin analizine gönderilmiş ve 14 pozitif sonucun hepsinin CTX-M15 grubuna ait olduğu tespit edilmiştir. İzolatların hiçbirinde *bla*_{PER-1}, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB} genleri tespit edilememiştir. *E.coli* izolatlarının 6'sı *qnrB* ve *qnrS*, 9'u *aac*-(6')-*ib-cr* geni içerdiği tespit edilmiştir. İzolatların hiçbirisi *qnrA* geni içermemektedir. Sınıf-1 ve Sınıf-2 integron içerikleri araştırıldığında; izolatların 3'ünün Sınıf-1, 5'inin de Sınıf-2 integron içerdikleri tespit edilmiştir.

Yapılan konjugasyon çalışmaları sonucunda 24 bakteri izolatının 1'inin konjugatif plazmit taşıdığı tespit edilmiştir. Transformasyon deneyleri sonucunda da 2 izolatın fosfomisin direncinin plazmit üzerinde taşıdığı tespit edilmiştir. Transformant plazmitlerin fosfomisin direnç genleri tanımlanamamıştır.

Çalışmada elde edilen epidemiyolojik veriler ve literatür araştırmaları sonucu fosfomisin antibiyotiği alternatif ajan olarak kullanılma girmesi ile direnç oranı yükselmeye başlamıştır. Bu çalışma direncin hem ülkemizde hem de dünyada yayılımının belirlenmesinde oldukça önemli ipuçları verecektir. Aynı zamanda bundan sonra yapılacak olan çalışmalar için çok önemli bir veri tabanı olacaktır.

Mart 2021, 63 sayfa

Anahatar Kelimeler: *E.coli* İzolatı, Plazmit Aracılı Fosfomisin Direnci, Gen Değişimi, *fosA*, *fosA3*, *fosB*, *fosC*, *fosC2*, *fosX*, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{PER-1}, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac*-(6')-*ib-cr*, Sınıf-1 ve Sınıf-2 İntegron, Transformasyon, Konjugasyon, Replikasyon Orjini, Klonal ilişki; Rep Pcr.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FOSFOMYCIN RESISTANCE GENES in *E. coli* ISOLATES

Funda YAĞ

Kırşehir Ahi Evran University Institute of

Health Sciences Department of

Molecular Medicine

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fikriye Milletli SEZGİN

Urinary tract infection is a general term that is an inflammation of the urinary urothelium that can cause serious mortality and morbidity, ranging from asymptomatic bacterial colonization in the bladder to sepsis. Among the symptoms seen in Urinary tract infection, one or more of the symptoms of polyuria, pollakiuria, dysuria, urgency, pyuria, fever and kidney pain can be observed together. *E.coli* has been blamed for community-acquired urinary infections and nosocomial urinary tract infections. Antibiotic resistance and the spread of this resistance is a very worrying situation in the health field all over the world. Fosfomycin antibiotic has come to the fore again in the treatment of urinary tract infections. In this study, molecular characterization of fosfomycin resistant genes in *E.coli* isolates of urinary tract infection was aimed. Accordingly, 24 fosfomycin resistant *E.coli* isolates isolated from urine samples coming to Ahi Evran University Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory were included.

Species identification and antibiotic susceptibility studies of isolates were carried out with the automated system of Vitek 2 Compact (bioMérieux, France) and disk diffusion methods. The plasmid-derived *fosA*, *fosA3*, *fosB*, *fosC*, *fosC2*, *fosX* genes, which are known to be responsible for the phosphomycin resistance in the *E.coli* isolates included in the study, were screened with the aid of PCR using specific primers. *E.coli* isolates are also responsible for resistance to beta-lactam and quinolone group antibiotics, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{PER-1}, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac*-(6')-ib-cr The presence of *aac*-(6')-ib-cr genes and Class-1 and Class-2 integron were screened with the aid of PCR using specific primers. Clonal relationships of isolates were studied with the

help of REP PCR. The replication origins of conjugative and transformant plasmids obtained from the isolates were determined according to the PCR-based replication origin determination method.

As a result of the PCR procedure to determine the phosphomycin resistance, 1 (FF25) of 24 samples was found positive for the *fosA3* gene. The presence of *bla*_{TEM}, gene in 11, *bla*_{OXA-1}, in 6 and *bla*_{SHV} gene in 3 were detected. As a result of PCR for the *bla*_{CTX-M} gene, the products were sent to index analysis and all 14 positive results were found to belong to the CTX-M 15 group. No *bla*_{PER-1}, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB} genes were detected in any of the isolates. It was determined that 6 of *E. coli* isolates contain *qnrB* and *qnrS*, 9 of them contain *aac*-(6')-*ib-cr* gene. None of the isolates contain the *qnrA* gene. When Class-1 and Class-2 integron contents are researched; It was determined that 3 of the isolates contain Class-1 and 5 of them contain Class-2 integron.

In conjugation and transformation situations that caused genetic changes in bacteria, transformation and conjugation experiment was performed on 24 bacterial isolate samples. According to the experimental findings, one of the samples was identified as transconjugant and both were transformant bacteria.

As a result of the epidemiological data obtained in the study and literature researches, the resistance rate started to increase with the use of fosfomycin antibiotic as an alternative agent. This study will give very important clues in determining the spread of resistance both in our country and in the world. It will also be a very important database for future studies.

March 2021, 63 Pages.

Key words: *E.coli* Isolate, Fosfomycin Resistance *fosA*, *fosA3*, *fosB*, *fosC*, *fosC2*, *fosX* *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{PER-1}, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac*-(6')-*ib-cr*, Class-1 and Class-2 Integron, Transformation, Conjugation, Origin of Replication, Clonal relationship;RepPcr

1. GİRİŞ

Üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE) tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de oldukça sık karşılaşılan ve önemli bir morbidite nedeni olan enfeksiyonlardır (Köken ve ark., 2008; Oteo ve ark., 2010). ÜSE tedavisinde sık kullanılan beta - laktama, beta – laktam / beta - laktamaz inhibitör kombinasyonuna, trimetoprim - sülfametoksazola, kinolonlara ve aminoglikozidlere karşı direnç, hızlı bir artış göstermektedir. Bu hızlı direnç gelişimi sebebiyle yeni antibiyotiklere ihtiyaç duyulmuştur (Tekin ve ark., 2012). Bir fosfonik asit türevi olan fosfomisin, tek doz kullanım avantajı, yan etkisinin az olması ve *Enterobacteriaceae*'larda direnç oranının düşük olması sebebiyle komplike olmayan ÜSE tedavisinde alternatif olarak tercih edilecek antibiyotiklerden biri olmuştur (Falagas ve ark., 2010).

Fosfomisin, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces viridochromogenes* ve *Streptomyces wedmorensis* türlerinin fermentasyon ürünü olup fosfoenolpiruvat analogudur. Bakteri hücre duvarını oluşturan peptidoglikan tabakası, N-asetil glikozamin ve N-asetil muramik asidin (NAMA) birbirini takip eden birimlerinin pentapeptid çapraz bağları ile bağlanması sonucu oluşmaktadır. Bakterinin hücre duvar sentezinde ilk basamak sitoplazmada gerçekleşmekte ve bu basamak, üridin difosfat (UDP)-NAG'ın 3'-hidroksil grubundan inorganik fosfatın ayrılması ile fosfoenol piruvattan gelen enol piruvatın UDP-NAG'a eklenmesini içermektedir. Bu reaksiyon, *E.coli* gibi bakterilerde gerekli temel bir sitoplazmik enzim olan UDP-NAG enol piruvil transferaz (MurA) enzimi tarafından katalize edilir. MurA enziminin inaktivasyonu, peptidoglikan sentezini engelleyerek hücresel bütünlüğün kaybolmasına ve bakterinin ozmotik parçalanmasına yol açmaktadır. Fosfomisin, MurA enziminin sistein kalıntısına geri dönüşümsüz olarak kovalent yolla bağlanmakta, böylece MurA enzimini inhibe ederek UDP-NAMA oluşumunu önlemekte ve antibakteriyel etkinliğini, peptidoglikan tabakasının sentezini engelleyerek göstermektedir (Baylan, 2010)

Kimyasal yapısı ve etkilediği bölgenin farklılığı nedeniyle fosfomisinin diğer antibakteriyel ajanlar ile arasında çapraz direnç yoktur ya da çok nadir gelişmektedir (Greenwood, 2003; Yao, 2007; Patel, Balfour, Bryson, 1997). Gelişmiş ülkelerde uzun süredir yaygın olarak klinik kullanımda olan fosfomisine karşı bakterilerde direnç gelişimi, halen nadir izlenmektedir. Direnç mekanizmaları, çoğunlukla kromozomal kaynaklı veya ender olarak plazmid aracılıdır (Yao, 2007; Mert, 2006; Falagas, 2007; Patel, Balfour,

Bryson, 1997; Afşar, Gonul, Şener, Turker, 2005). Kromozomal mutasyonların çoğu, ilacın hücre içine taşınmasını sağlayan bakteriyel proteinleri kodlayan yapısal ve düzenleyici genlerde olmaktadır. Bu mutasyonlar, bakterilerin iki temel transport mekanizması olan L-alfa-gliserofosfat ve heksoz fosfat sistemlerinin bozulmasına yol açarak fosfomisin, bakteri hücresi içine geçişini azaltmakta ve hedef bölgeye ulaşmasını engellemektedir (Kumar ve ark, 2009; Yao, 2007; Mert, 2006; Falagas, 2007; Patel, Balfour, Bryson, 1997; Afşar, Gonul, Şener, Turker, 2005). Fosfomisine dirençli mutantlar, fosfomisin taşınmasında bozukluğa yol açan özellikle kromozomal *glpT* mutasyonlarına bağlı olarak antibiyotik tedavisi sırasında spontan ortaya çıkmaktadır. G6F tarafından indüklenen heksoz fosfat transport sisteminde hasar oluşan dirençli mutantlar, daha ziyade in vitro ortamda yüksek sıklıkta (Kumar ve ark, 2009; Yao, 2007; Mert, 2006) ortaya çıkmaktadır. İn vivo oluşan direnç ise genellikle L-alfa-gliserofosfat transport mekanizmasının kaybıyla ilişkilidir. Bazı türlerde izlenen plazmid aracılı direnç ise, ilacı inaktive eden enzim üretimi ile ilişkili olup bu durum katalitik bir konjugasyonla sonuçlanmakta, bakteri türleri arasında coğrafik bölgelere bağlı olarak yayılım göstermektedir (Greenwood, 2003; Yao, 2007; Mert, 2006; Patel, Balfour, Bryson, 1997; El Zoeiby, Sanschagrin, Levesque, 2003). Plazmidle kodlanmış glutatyon S-transferaz enzimleri olan FosA ve FosB, fosfomisin direncinde rol oynar. *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* spp. Üyeleri arasında *fosA* geni, oldukça yaygın olarak bildirilmektedir (Greenwood, 2003; Patel, Balfour, Bryson, 1997). *S.aureus*, *Bacillus subtilis* gibi gram-pozitif bakterilerde *fosB*, *Mesorhizobium loti* ve *Listeria monocytogenes* gibi bakterilerde ise *fosX* genleri, fosfomisin direncindeki rolleri açısından detaylı olarak çalışılmıştır (Kumar ve ark, 2009). Bu çalışmada üriner sistem örneklerinden elde edilen fosfomisin dirençli *E. coli* izolatlarının genotipik yapıları belirlenerek, direnç mekanizmalarında plazmid aracılı fosfomisin direnç genleri *fosA*, *fosA3*, *fosB*, *fosC*, *fosC2*, *fosX* genlerinin etkisi olup olmadığının tespiti amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. *E.Coli*

Escherichia coli, 1855 yılında Escherich adında bir araştırmacı tarafından ilk kez infantların dışkılarından izole edilip, *Bacterium coli* olarak tanımlanmıştır. İzole eden kişinin adı verilmiş ve *E. coli* olarak adlandırılmıştır (Baron ve ark., 1994; Bilgehan, 1992).

Escherichia coli, Enterobacteriaceae familyası çubuk şeklinde olup Gram-negatif bir bakteri olarak adlandırılmaktadır. Aerop ve fakültatif anaerob olup 15–45 °C de üreyebilmekle birlikte optimal üreme ısıları 37 °C'dir. Bakteri çoğunlukla insanlar ve sıcakkanlı hayvanların alt bağırsak yolunda yaşar ve genellikle dışkı veya idrar yoluyla dışarıya atılır (Jang ve Ark, 2017).

E. coli 'ler Buyyon ve jeloz gibi genel besiyerlerinde ortalama pH 7–7,2'de hemen ürerler. Buyyon ve peptonlu suda yoğun üreme sonucu homojen bulanıklık meydana getirirler. Agarda genellikle 2–3 mm çapında parlak, düzgün kenarlı, konveks, gri-beyaz renkte S tipi koloniler oluştururlar. Devam eden pasajlarda ise kaba, mat ve granüler R tipi koloniler meydana getirirler.

Bazı kökenler, özellikle idrar yolu infeksiyonlarından izole edilen *E. coli* 'ler kanlı agarda hemoliz oluşturabilirler. Kapsüllü suşlar ise mukoid koloniler oluşturmaktadırlar. *E. coli* 'ler şekerleri ve diğer karbonhidratları asit ve gaz oluşturarak parçalarlar. Laktoza olan etkisi ile gaz oluşturma, *Shigella* türleri başta olmak üzere diğer barsak bakterilerinden ayırımı açısından önemli etkisi vardır. Bu nedenle pratikte laktoz negatif bakterilerden ayırt edilmesi için içinde laktoz ve bir ayraç bulunan çeşitli besiyerleri kullanılır. İçinde laktoz ve eozin metilen mavisi bulunan Eosin Metilen Blue (EMB) agarda ve içinde laktoz, sodyum sülfid, diyament füksin içeren Endo agarda mavi- siyah yeşilimsi parlaklık veren koloniler meydana getirirken, McConkey ve Salmonella-Shigella (SS) agarda kırmızı koloniler oluşturmaktadırlar (Baron ve ark., 1994; Ryan ve ark., 1994).). *E. coli* bakterilerinin IMVIC olarak bilinen biyokimyasal özellikleri (Tryptofandan indol oluşturma, Metil kırmızısı testi, Voges Proskauer testi, sitratı kullanma) (+ + – –) olarak gösterilmektedir. Oksidaz negatif olup üreyi parçalayamazlar. Hidrojen sülfür (H₂S) oluşturmazlar, ancak bazı türleri sisteinli besiyerinde az miktarda H₂S oluşturmaktadır. Katalaz pozitif, potasyum siyanür testi negatiftir (Baron, Peterson ve Finegold, 1994).

2.1.1. *E.coli*'nin Epidemiyolojisi ve Virülans özellikleri

İnsanda hastalığa neden olan *Escherichia coli* 'ler 6 guruba ayrılmıştır;

- Enterotoksijenik *E.coli*
- Enterohemorajik *E.coli*
- Enteroinvazif *E.coli*
- Enteropatojenik *E.coli*

- Enteroagregatif *E.coli*
- Diffüz adezif *E.coli*

E.coli'nin yaşam alanı olarak insan ve hayvanların barsaklarının bilinmesine rağmen, insan ve hayvanların bütün organ ve dokularında enfeksiyon meydana getirmektedir (Koneman, Allen, Janda, Schreckenberger ve Winn,1999). Barsaklardaki gram-negatif aerobik bakterileri *E.coli*'ler meydana getirmektedir (Gür, 2000). Üriner enfeksiyonlarında %80, nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarında ise %50 *E.coli* bulunmaktadır (Gales, Sader, Jones, 2002; Nicolas ve Chanoine,1997). Üriner sistemde meydana gelen bakteriyel enfeksiyonlar; asemptomatik bakteriüriden, semptomatik sistit ve pyelonefrite kadar kadar çeşitleri görülmektedir (Hoşgör ve ark., 2000). Üropatojenik suşlarla oluşan idrar yolu enfeksiyonları ile enteropatojenik suşlarla oluşan ishaller *E.coli*'nin toplum kaynaklı enfeksiyonlarda en yaygın gözlenen şeklidir (Joklik ve ark., 1984). Yetişkinlerde ve yaşlılarda gözlenen toplum kökenli bakteriyel enfeksiyonların en sık nedenlerinden biride *E.coli*'nin bakteriyemi ve yeni doğan menenjitinde pnömonilerde de etken olmasıdır (Eisenstein ve Zaleznik, 2000). Nozokomiyal enfeksiyonlarda en büyük etken *E.coli*'dir. Nozokomial sepsislerin yaklaşık %15'inde etkili olan *E.coli*'nin neden olduğu enfeksiyonlar arasında; cerrahi alan enfeksiyonları, intraabdominal abseler nozokomiyal pnömoni ve peritonit bulunmaktadır. *E.coli*'nin neden olduğu enfeksiyonlar sekonder bakteriyemi ile birlikte bulunmaktadır. Sık izole edilen bakteriler ise, santral sinir sistemi operasyonları sonrası oluşabilen nozokomial gram-negatif basil menenjitinde izole edilen enfeksiyonlardır (Wagenlehner ve Naber, 2000; Rozenberg ve Visser, 1999).

2.1.2. *E.coli* Enfeksiyonları

İnsan sebepli enfeksiyonlar genellikle assendan enfeksiyonlardır. Üretra ve mesanenin infekte olmasına sebep olan bakteridir (üretit, sistit). Böbreklerin infekte olması enfeksiyonun yukarıya ilerlediği bazı vakalarda görülmektedir (pyelonefrit). Bu nedenle böbrekte ciddi doku hasarı meydana gelmektedir. Sepsis gelişmesi, enfeksiyonun sınırlandırılmaması ya da tedavi edilememesi durumlarında ortaya çıkmaktadır (Salyers, Whitt, 1994). Kateterizasyon veya üriner sisteme yapılan diğer girişimler sonucu oluşan enfeksiyonlar hastane kaynaklı enfeksiyonlardır. Hastane kaynaklı enfeksiyonlar kateterizasyon veya üriner sisteme yapılan diğer girişimler genellikle sekonder olarak bakteremiye neden olabilmektedirler (Salyers ve Whitt, 1994; Paradisi, Corti ve Mangani, 1998). Sekonder bakteremiden sonrasında mortalite riski artmaktadır (Köksal, 1999).

2.1.3. Tedavisi

Üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE)'nin %75-90'nın etkeni *E.coli* 'dir. Tedavide en sık kullanılan antibiyotikler, siprofloksasin, fosfomisin, nitrofurantoin, trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMZ) beta-laktam grubu üyeleridir. Fakat sürekli artan direnç oranları nedeniyle tedavi olanakları azalmaktadır. Amerika enfeksiyon Hastalıkları Derneği'nin ÜSE tedavi rehberinde TMP-SMZ'nin direnç prevelansının %10-20'den aşağıda olduğu bölgelerde ampirik tedavi için kullanılabileceği ifade edilmektedir. ÜSE tedavisinde yer alan diğer bir tedavi seçeneğinde kullanılacak ilaç ise kinolon grubudur. Fakat sürekli kullanımlarının bakterilerdeki kinolon direnç oranlarını arttırdığını ve normal florayı ortandan yok ederek *C. difficile* enfeksiyonuna sebep olduğu bilinmektedir. Basit üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde nitrofurantoin veya fosfomisin tedavisinde iyi geri dönüşlerin alındığı vurgulanmaktadır (Panos ve ark., 2006).

E.coli'nin bağırsak florasında bulunan bir bakteri olması nedeniyle *E.coli*'den korunma zordur. Bağırsak enfeksiyonlarından korunmanın en etkin yolu besin ve suların, seçimi, hazırlanması ve tüketimi sırasında hijyen ve sanitasyon kurallarına dikkat edilmesidir. *E.coli* enfeksiyonlarına karşı bağışıklık kazanarak korunma söz konusu değildir (Erdem, 1999; Brooks ve ark., 2010; Kayser ve ark., 2005).

2.1.4. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

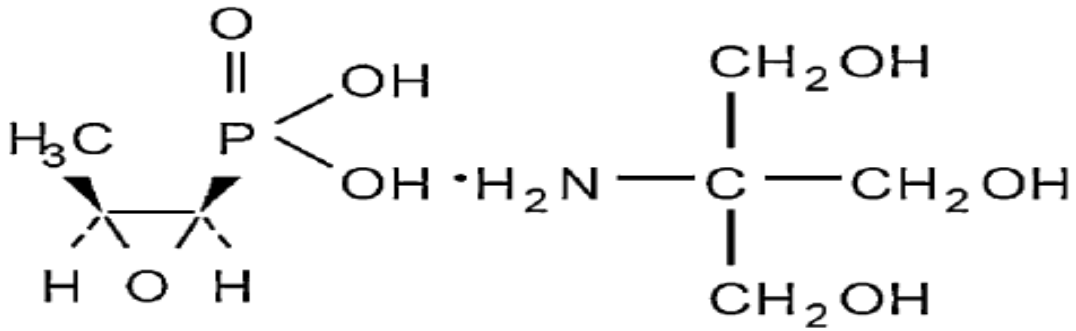
E.coli'nin direnç ortaya koyması, 1960'ların sonlarında ampisilin ve diğer aminopenisilinlere karşı hastane enfeksiyonlarına karşın tedavisinde güçlüklerle sebebiyet vermiştir (Sanders, 1992). 1965 yılında ilk kez izole edilmiş Ampisiline dirençli *E.coli* suşlarıdır. Direnci sağlayan beta laktamaza TEM-1 adı verilmiştir (Datta ve Kontomichas, 1965). Kullanımda olan geniş spektrumlu beta-laktamların etkisine direnç yanıtı, geniş spektrumlu beta laktamazlar olan TEM-1, onun varyantı TEM-2 ve SHV-1 enzim sentezi ortaya çıkarmıştır. SHV-1 *K. Pneumoniae*'da genellikle kromozomal, *E.coli*'de ise genellikle plazmidik olarak bulunmaktadır (Kliebe, Nies, Meyer, 1985). Gram-negatif bakteri enfeksiyonları için oldukça fazla kullanılan genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere (oksiimino sefalosporinler, üçüncü kuşak sefalosporinler) karşın, 1980'li yıllarda GSBL enzimine ulaşılmıştır. GSBL Almanya'da ilk kez 1983 yılında *K. pneumoniae* suşunda tanımlanan bir SHV-2 enzimidir (Kliebe, Nies, Meyer, 1985). Bu enzim daha sonra *E.coli* ve diğer *Enterobacteriaceae* familyasında gözlenmiş sonra pek çok çeşitli GSBL enzimi tanımlanmıştır (Sirot, 1995). *E.coli*'de direnç problemi her geçen gün

artmaktadır. Beta laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişmesinde; beta laktamaz enzimi sentezi yapımı ve bakteri içine antibiyotik girişinin azalması iki asıl direnç mekanizması görülmektedir (Akalin, 1999). Ülkemizde nozokomiyal enfeksiyon etkeni *E.coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz yapımı oranı % 0–27 arasında farklı oranlarda karşımıza çıkmaktadır. Plazmid kontrolünde sentezlenen bu enzime sahip olan bakteriler; sefotaksim, seftazidim, seftriakson ve aztreonama dirençlidirler (Yücesoy, Yuluğ, Kocagöz, 2000).

2.2. Fosfomisin

Fosfomisin, ilk kez 1969 yılında İspanya’da *Streptomyces* kültürlerinden elde edilmiş ve önceleri fosfonomisin olarak adlandırılmıştır (Schito, 2003). Fosfomisin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, glikopeptid duyarlı veya dirençli enterokok ve gram-negatif pek çok patojeni içeren geniş bir antibakteriyel spektruma ve hızlı bir bakterisidal etkiye sahiptir (Baylan, 2010). Fosfomisin, düşük molekül ağırlıklı bir fosfonik asit türevidir olup, bu özelliği proteinlere neredeyse hiç bağlanmadığını gösterir. Fosfomisin, bilinen herhangi bir antibakteriyel maddeyle kimyasal olarak ilgisi olmayan eşsiz bir antibiyotiktir. Kimyasal formülü $C_3H_7O_4P.C_4H_{11}NO_3$ şeklindedir ve kimyasal yapısı Şekil 1.’de gösterilmiştir (Michalopoulos ve ark., 2011).

Fosfomisinin oral olarak kullanılabildiği iki formülasyon vardır, bunlar fosfomisin trometamol ve fosfomisin kalsiyumdur. Fosfomisin trometamol, sentetik olarak hazırlanmış, biyoyararlanımı olan çözünebilir bir tuzdur. Fosfomisin kalsiyuma kıyasla emilimi daha kolay olduğu için oral yoldan uygulanmada tercih edilen formülasyon fosfomisin trometamoldur. Fosfomisinin oral formülasyonu dışında, intravenöz olarak kullanılabilen fosfomisin disodyum formülasyonu da vardır (Michalopoulos ve ark., 2011).



Şekil 1. Fosfomisinin kimyasal yapısı (Michalopoulos ve ark., 2011’den)

2.2.1. Etki Mekanizması

Fosfomisin, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces viridochromogenes* ve *Streptomyces wedmorensis* türlerinin fermentasyon ürünü olup fosfoenolpiruvat analogudur (Greenwood, 2003). Bakteri hücre duvarını oluşturan peptidoglikan tabakası, N-asetil glikozamin ve N-asetil muramikasidin (NAMA) birbirini takip eden birimlerinin pentapeptid çapraz bağları ile bağlanması sonucu oluşmaktadır. Bakterinin hücre duvar sentezinde ilk basamak sitoplazmada gerçekleşmekte ve bu basamak, uridin difosfat (UDP)-NAG'ın 3'-hidroksil grubundan inorganik fosfatın ayrılması ile fosfoenol piruvattan gelen enol piruvatın UDP-NAG'a eklenmesini içermektedir. Bu reaksiyon, *E.coli* gibi bakterilerde gerekli temel bir sitoplazmik enzim olan UDP-NAG enol piruvil transferaz (MurA) enzimi tarafından katalize edilir. MurA enziminin inaktivasyonu, peptidoglikan sentezini engelleyerek hücresel bütünlüğün kaybolmasına ve bakterinin osmotik parçalanmasına neden olmaktadır (Kumar ve ark., 2009). Fosfomisin, MurA enziminin 115. sistein kalıntısına geri dönüşümsüz olarak kovalent yolla bağlanmakta, böylece MurA enzimini inhibe ederek UDP-NAMA oluşumunu önlemekte ve antibakteriyel etkinliğini, peptidoglikan tabakasının sentezini engelleyerek göstermektedir (Baylan, 2010).

2.2.2. Antibakteriyel Aktivitesi

Fosfomisin, kendine özgü farmakolojik özellikleri ve terapötik aralığıyla geniş antimikrobiyal spektruma sahip olup alt ÜSE tedavisinde önerilen spesifik bir antibiyotiktir (Garau, 2008). Fosfomisin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve glikopeptidlere duyarlı veya dirençli *Enterococcus spp.* gibi gram pozitif ve birçok antibiyotiğe dirençli *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Salmonella* cinslerine ait türler ile *E. coli* gibi gram negatif patojenlerin çoğuna karşı, hızlı bakterisidal aktiviteye sahiptir (Patel ve ark., 1997; Minassian ve ark., 1998; Greenwood, 2003; Afşar ve ark., 2005; Falagas ve ark., 2007; Göker ve ark., 2007; Falagas ve ark., 2008; Köken ve ark., 2008; Hoşbul ve ark., 2009). Gram negatif basillere karşı (*Pseudomonas aeruginosa* suşları hariç), gram pozitif koklardan daha etkilidir. *In vitro* çalışmalarda, fosfomisinin bir grup beta-laktam antibiyotikler, aminoglikozidler ve diğer bazı ajanlar ile birlikte kullanılmasının; solunum, dolaşım ve üriner sistem enfeksiyonlarının bakteriyel etkenlerine karşı sinerji oluşturduğu gösterilmiştir (Neuman, 1984; Greenwood, 2003; Falagas ve ark., 2008). Benzer şekilde *Acinetobacter baumannii* fosfomisine dirençli olmakla birlikte aminoglikozidlerle kombine edilmesi, bu etkene karşı sinerjistik etki yaratabilmektedir (Greenwood, 2003; Falagas ve ark., 2008). *Pseudomonas*, *Morganella*

morganii ve *Staphylococcus saprophyticus* izolatlarının sırasıyla %40, %80 ve %20'sinin fosfomisine dirençli olduğu belirtilmektedir (Yao ve ark., 2007). Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), MİK50 ve MİK90 değerleri, *P. aeruginosa* için sırasıyla 32 ve 64 g/ml; *S. aureus* için ise 8 ve 16 µg/ml'dir. *Bacteroides fragilis* ve diğer *Listeria* türlerinden farklı olarak *L. monocytogenes* de fosfomisine dirençlidir (Falagas ve ark., 2008).

Fosfomisin bileşiklerinin bakteri hücrelerine girişi, çoğu *Enterobacteriaceae* üyesi bakteride glukoz-6-fosfat (G6F) tarafından indüklenir (Greenwood, 2003). Fosfomisinin deneysel enfeksiyonlardaki etkinliği, G6F'nin eş zamanlı uygulanmasıyla artırılmıştır. G6F, glikolizin gerçekleştiği yerlerde hücre içinde mevcuttur; ancak doku içindeki içeriği genellikle düşüktür. Ayrıca G6F, serum veya beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda mevcut değildir ve muhtemelen enfeksiyon bölgelerinde suboptimal düzeydedir. In vitro duyarlılık test materyaline 25 µg/ml G6F eklendiğinde fosfomisinin etkinliği büyük oranda artmakta, bu etkinlik in vivo etkinliğe yaklaşmakta ve in vivo ve in vitro aktiviteler arasındaki korelasyon daha iyi olmaktadır. Bu yüzden duyarlılık testlerinde, 25 µg/ml G6F eklenmiş agar ve buyyon dilüsyon yöntemleri tavsiye edilmektedir (Greenwood, 2003; Yao ve ark., 2007). Disk difüzyon yönteminde kullanılan 200 µg fosfomisin trometamin diski aynı zamanda 50 µg/ml G6F içermektedir (Barry ve ark., 1993; Yao ve ark., 2007; CLSI, 2008).

Trometamin tuzunun fosfomisine yakın bir moleküler ağırlığa sahip olması sebebiyle, fosfomisin trometamin, in vitro duyarlılık testlerinde diğer türevlerinin yarısı kadar aktivite göstermektedir (Greenwood, 2003). Fosfomisinin in vitro aktivitesi, ayrıca test materyali ve ortam koşullarından etkilenmektedir. Alkali pH'da ve glukoz, fosfat ve sodyum klorid varlığında etkinlik azalmakta; dolayısıyla antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan besiyerlerinin içeriklerine bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Basit besleyici buyyon veya agarda gözlenen inhibisyon konsantrasyonları, genellikle Mueller-Hinton (MH) besiyerindekinden daha düşüktür (Greenwood, 2003; Yao ve ark., 2007).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre, disk difüzyon yönteminin 50 µg G6F içeren 200 µg fosfomisin diski kullanılarak *Enterococcus* cinsinden sadece *E. faecalis*'in, *Enterobacteriaceae* ailesinden ise sadece *E. coli*'nin idrar örneği izolatlarının fosfomisin duyarlılığının belirlenmesi için kullanımı önerilmektedir. *E. coli* ve *E. faecalis* izolatları için fosfomisin trometamin diskinin inhibisyon zon çapı ≤ 12 mm ise dirençli, 13-15 mm ise orta duyarlı ve ≥ 16 mm ise duyarlı olarak değerlendirilir. *E. coli* ve *E. faecalis* izolatları için direnci belirleyen eş değer MİK sınır değeri, CLSI kriterlerine

göre ≥ 256 µg/ml olanlar dirençli, ≤ 64 µg/ml olanlar ise duyarlı olarak kabul edilir. Fosfomisinin MİK değerleri, 25 mg/L G6F ilavesi yapılmış MH kullanılarak yalnızca agar dilüsyon yöntemiyle saptanmalıdır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmamalıdır. Sonuçlar 35°C’de normal atmosferik ortamda 18-20 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilmektedir (CLSI, 2017).

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterlerine göre ise; disk difüzyon yönteminin, 50 µg G6F içeren 200µg fosfomisin diski kullanılarak *Enterobacteriaceae* ailesine üye türlerden yalnızca *E. coli*’nin fosfomisin duyarlılığının belirlenmesi için kullanımı önerilmektedir. Diğer türler için MİK metotları kullanılmalıdır. MHA’da 0,5 McFarland standardı kullanılarak $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ısı aralığında ve normal atmosfer koşullarında 18 ± 2 saatlik inkübasyon sonrasında gerçekleştirilen disk difüzyon duyarlılık testinde, *E. coli* için fosfomisin diskinin inhibisyon zon çapı < 24 mm ise dirençli ve ≥ 24 mm ise duyarlı olarak değerlendirilir. İnhibisyon zonu içerisinde, zonu tamamen kaplamayacak şekilde bakteri üremesi varsa ihmal edilmeli ve dış zon dikkate alınmalıdır. *Enterobacteriaceae* ailesine üye türler ve *Staphylococcus spp.* izolatları için direnci belirleyen eş değer MİK sınır değeri, EUCAST kriterlerine göre ≥ 32 µg/ml olanlar dirençli, < 32 µg/ml olanlar ise duyarlı olarak kabul edilir. EUCAST’a göre bu türler için fosfomisin duyarlılığının belirlenmesinde referans yöntem agar dilüsyon yöntemidir. MİK değeri belirlenirken besiyerinde 25 mg/L G6F olması gerekmektedir. Sonuçlar, $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ısı aralığında ve normal atmosfer koşullarında 18 ± 2 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilmektedir, (EUCAST, 2018).

Trometamin tuzu, komplike olmayan alt ÜSE olan erişkinlerde oral 3 g tek doz olarak değişik ticari isimler altında, günümüzde İngiltere, İtalya, İspanya, İsveç, İsviçre, Fransa, Belçika, Hollanda, Avustralya, Almanya, Portekiz, Brezilya, Amerika Birleşik Devletleri, Meksika, İsrail, Finlandiya, Kanada ve Güney Afrika gibi birçok gelişmiş ülkede ruhsatlı olarak kullanılmaktadır (Warren ve ark., 1999; Greenwood, 2003).

2.2.3. Direnç Mekanizması

Fosfomisin direnci üç mekanizma ile ilişkili olup bunlardan ikisi kromozom üzerinde yer alırken, üçüncüsü ise plazmid kökenlidir (Etienne ve ark., 1989). Fosfomisine karşı bakteriyel direnç; sıklıkla kromozomal olarak kodlanmış transport sistemleri *glpT* ve/veya *uhpT*’nin inaktivasyonu ya da bu transport sistemlerin regülasyonunda görevli genler *uhpA*, *cyaA* ve *ptsI*’ın inaktivasyonu, antibiyotik hedefi olan MurA enziminin inaktivasyonu ve daha az olarak da plazmidlerce kodlanan fosfomisin modifiye edici

enzimler sebebiyle oluşmaktadır (Horii ve ark., 1999; Beharry ve Palzkill, 2005; Castaneda-Garcia ve ark., 2013).

2.3. Genler

2.3.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL)

Beta-laktamazlar kromozomal ya da plazmit kontrolünde sentezlenirler. Plazmitler kromozom dışı genetik elemanlar olup direncin yayılmasında önemlidirler. Gram negatif bakterilerde direnç genleri plazmitler aracılığı ile konjugasyonla yayılmaktadır (Somer, 2010).

Gram pozitif bakterilerde beta-laktamazlar ekzoenzim olarak hücre dışına salgılanırken, gram negatif bakterilerde periplazmik boşlukta bulunurlar. Bu nedenle gram negatif bakterilerde az miktarda enzim bile antibiyotiklerin etkisiz hale getirilmesi için yeterli olmaktadır (Livermore, 1995).

GSBL'ler, oksiminino-sefalosporinleri benzilpenisiline eşit ya da %10 daha fazla hidroliz edebilen, aktif bölgelerinde serin içeren, plazmidlerle kodlanan, klavulanik asit, sulbaktam ya da tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olan enzimlerdir (Martinez-Martinez ve ark., 1996).GSBL'lerin büyük kısmı, gendeki belli bir bölgede nokta mutasyonu ile karakterize TEM ve SHV enzim türevlerinden oluşmaktadır (Livermore1995; Black ve ark., 2005). Bunların dışında CTX-M ve OXA ile henüz gruplandırılmayan birçok enzim ailesi de mevcuttur. Günümüzde 214 TEM, 186 SHV, 86 CTX-M ve 19 OXA türü beta-laktamaz vardır (Paterson ve Bonomo, 2005).

2.3.2. SHV Grubu

İlk kez *Klebsiella pneumoniae*'de (*K. pneumoniae*) tanımlanan ve ailenin tanımlayıcısı olan SHV-1 enzimi, geniş spektrumlu penisilinlere karşı dirençten sorumludur (Livermore, 1995). SHV-2 ise, 1983'de Almanya'da *K.ozaenae*'den izole edilmiştir. SHV-1'den farklılaşan bir beta-laktamazdır, plazmidle taşınır, yeni jenerasyon sefalosporinler ve sefotaksime karşı dirençten sorumludur (Knothe, Shah ve Krcmery, 1983).

2.3.3. TEM Grubu

Gram-negatif bakterilerde en sık rastlanan ve ilk TEM türevi enzim TEM-1'dir. Ampisilini; karbenisilin, oksasilin ya da sefalotinden daha fazla hidroliz eder, geniş spektrumlu sefalosporinlere az etkilidir ve klavulanik asit ile inhibe olur (Paterson ve Bonomo, 2005). TEM-1, *E. Coli*'de ampisilin, *H. İnfluenza* ve *N.gonorrhoea*'de ampisilin

ve penisilin direncinden sorumludur, penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidroliz edebilir (Ben-Ami ve ark., 2016). TEM-1'den bir aminoasitin yer değiştirmesi sonucu TEM-2 oluşmuştur. TEM-3 ise GSBL fenotipi gösteren ilk TEM türevidir (Sturenburg ve Mack, 2003). TEM ailesi daha çok *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*)'de saptanmıştır. Günümüzde 214 TEM grubu enzim izole edilmiştir (Paterson ve Bonomo, 2005).

2.3.4. PER Grubu

Bu enzim grubu, TEM ve SHV tipi GSBL ile %25 oranında homoloji gösterir (Bauernfeind ve ark., 1996). İlk kez Fransa'da bir Türk hastadan izole edilen *P. Aeruginosa* suşunda bulunmuştur (Nordmann ve ark., 1963). Daha sonraki yıllarda Türkiye'deki nozokomiyal *Acinetobacter spp.* izolatlarının %46'sının ve *P. Aeruginosa* izolatlarının %11'inin PER-1 ürettiği bulunmuştur (Vahaboğlu ve ark., 1968). Penisilin ve sefalosporinleri hidroliz eder, klavulanik asit ile inhibe olur (Neuhauser ve ark., 2003).

2.3.5. OXA Grubu

Daha çok *P. Aeruginosa*'da bulunmakla birlikte diğer gram-negatif bakterilerde de saptanmıştır (Weldhagen, Poirel ve Nordmann, 2003). Bu enzim grubunun dar spektrumlu olanları OXA-1'den OXA-10'a kadar olanlardır ve substrat olarak oksasilin ve kloksasilini kullanırlar. Ampisilin ve birinci kuşak sefalosporinlere direnç, oksiiimino-sefalosporinlere ise zayıf direnç gösterirler. Diğer GSBL'lerden farklı olarak ayrıca seftazidime yüksek düzeyde dirence neden olurlar (Hall ve ark., 1963). Bu enzim genlerinin büyük bir kısmı transpozon, plazmid ya da integron kontrolündedir (Nordmann ve Guibert, 1998). İlk geniş spektrumlu OXA enzimi ülkemizde izole edilen OXA-11'dir, *P. Aeruginosa* suşunda bulunmuştur (Hall ve ark., 1963). Ülkemizle birlikte Fransa'da da bu enzimler sık bulunmaktadır.

2.3.6. CTX-M Grubu

Plazmid aracılı beta-laktamazlara ait bu yeni aile, substrat olarak sefotaksimi tercih eder ve seftazidimi dirence yol açmayacak şekilde hidroliz ederler. Bu enzimler büyük olasılıkla *Kluyvera ascorbata*'nın kromozomal AmpC beta-laktamazından köken almıştır, başta *E. Coli* ve *Salmonella typhimurium* olmak üzere birçok *Enterobacteriaceae* üyesinde saptanmışlardır (Bradford, 2001). En yaygın olanları CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-2'dir. Sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımının bu enzimlerin ortaya çıkışında rol oynadığı düşünülmektedir (Bonnet, 2004). TEM ve SHV grubu enzimler daha

çok hastane kökenli enfeksiyonlarda tespit edilirken, toplum kökenli GSBL üreten üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan *E. Coli* izolatlarında CTX-M grubu enzim saptanır (Pitout ve ark., 2005).

2.3.7. Diğer GSBL'ler

Herhangi bir beta-laktamazın nokta mutasyonundan oluşmayan, plazmid ve integron aracılı A sınıfı beta laktamazlar bulunmuştur (Bonnet ve ark., 2000; Silva ve ark., 2000). Bunlardan VEB-1; PER-1 ve PER-2 ile belli oranda (%38) homoloji gösterir. Seftazidim, seftaksim ve aztreonama direnç gösterirler, klavulanik asit ile inhibe olurlar. GES, BEL, PER, TLA IBC gibi diğer tipleri dünyanın değişik bölgelerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Castanheira ve ark., 2004; Lebessi ve ark., 2003).

2.3.8. Fosfomisin Direnç Genleri

Plazmidle kodlanmış glutatyon S-transferaz enzimleri olan FosA ve FosB, fosfomisin direncinde rol oynar. *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* spp. uyeleri arasında *fosA* geni, oldukça yaygın olarak bildirilmektedir (Greenwood, 2003, Pastel ve ark., 1997).

FosA3 geni düşük oluşumlu antimikrobiyal direnç genidir. FosA3 geni, Doğu Asya ülkelerinde fosfomisine dirençli izolatlarda sıklıkla tanımlanan bir tür plazmid aracılı fosfomisin direnç (PMFR) genidir (Hou ve diğerleri, 2012; Lee ve diğerleri, 2012).

FosC2 direnç geni de fosA3 direnç geni gibi ilk olarak Japonya'da GSBL üreten klinik *E. Coli* izolatlarında tanımlanmıştır (Wachino ve ark. 2010). Class I integronlarda, farklı direnç genleri ile birlikte fosC2 direnç geni tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda bir plazmid içinde fosC2, dfrA17 ve aadA5 genlerini taşıyan bir class I integronunun ve çoklu ilaç dirençli (MDR) plazmidlerde fosC2 ve *bla*IMP-34 genlerinin varlığı gösterilmiştir (Wachino ve ark. 2010; Wang ve ark., 2015). Bu veriler fosC2 geninin antibiyotiklere karşı yanıt oluşturmak için, integronlar aracılığı ile sonradan kazanıldığını gösterir (Yang ve ark., 2017).

FosX, fosA ve fosB enzimleri ile ilişkili, Mn^{+2} bağımlı bir epoksit hidrolazdır ve oksiran halkasını kırmak için su kullanır. FosX enzimleri *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* ve *Brucella melitensis*'te bulunur (Castaneda-Garcia ve ark. 2013).

Enzimatik inaktivasyon direnç mekanizması, fosfomisinin epoksit halkasının enzimatik bölünmesiyle ya da fosfonat grubunun fosforilasyonu ile etkisizleştirilmesine dayanmaktadır. Kovalent modifikasyonlarla fosfomisini inaktive eden çeşitli metalloenzimler; fosfonat kinazlar (FomA ve FomB), tiyol transferazlar, glutatyon

fosfomisin (FosA), L-sistein-fosfomisin (FosB), ATP fosfomisin (FosC) ve su-fosfomisin (FosX)"dir (Suarez ve ark., 1991, Woodyer ve ark., 2006, Fillgrove ve ark., 2003).

Sınıf-1 ve Sınıf-2 integron İntegronlar, antibiyotik direncini kodlayan gen kasetlerini içeren, hareketli, transpozon benzeri genetik elemanlardır. İntegronların yeni bir bakteriye transferi ya da direnç genlerini kodlayan gen kasetlerinin insersiyonu, çoklu antibiyotik dirençli suşların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Bu gen kasetlerinin insersiyon ya da delesyonu, integras ailesine bağlı bölgeye özel rekombinazlar aracılığıyla olmaktadır (Dolapçı ve Ark., 2010).

2.3.9. Kinolon Grubu Direnç Genler

Kinolon grubu antibiyotiklere yaygın olarak kullanılmaları nedeniyle hastane kaynaklı izolatların yanı sıra toplum kaynaklı izolatlardada direnç oranlarında belirgin artış gözlenmekte, ülkemiz için deneysel tedavide güvenilirliklerini yitirmek üzere oldukları bildirilmektedir (Dündar, Willke ve Sönmez, 2008). *aac(6')-Ib* geni kanamisin, tobramisin ve amikasin direncine neden olan biraminoglikozit asetiltransferazı kodlamaktadır. Bu genin bir varyantı olan *aac(6')-Ib-cr* geni ise, *aac(6')-Ib*'den *Trp102 Arg* ve *Asp179 Tyr* farklılığı göstermektedir. Enzim bu şekilde siprofloksasini asetilleme yetisi kazanmaktadır. *qnr* ve *aac(6')-Ib-cr* aynı hücrede birlikte bulunduklarında *qnr*'nin yalnız başına yaptığından dört kat daha fazla MİK artışı oluşmakta, duyarlılık bakımından klinik direnç sınırına (1 µg/ml) yaklaşılmaktadır. Bunun yanı sıra *aac(6')-Ib-cr*'nin yalnız bulunması, siprofloksasine maruz kalma durumunda oluşacak kromozomal mutasyon sıklığını arttırmaktadır (Robicsek ve ark., 2006).

Avrupa'daki çalışmalarda (Karah, 2008; poirelve ark., 2006; Chenve ark., 2006), genellikle *qnrS* ve *qnrB* genleri baskın görülmekle birlikte, İngiltere'de yapılmış olan bir çalışmada (Corkill ve ark., 2005), *qnrA* geni, İspanya'da yapılmış olan bir çalışmada (Lavilla ve ark.,2005) ise, *qnrA1* geni yüksek oranda belirlenmiştir. Türkiye'de *E. coli* ve *Klebsiella spp.* İzolatlarıyla yapılan çalışmalara bakıldığında, *qnrA*'nın, *qnrS* ve *qnrB* genlerine göre daha yüksek oranda görüldüğü, *qnrS* ve *qnrB* genlerinin ise birbirine yakın oranlarda görüldüğü gözlenmektedir (Pazarlı ve ark., 2017).

3. MATERYAL VE METOT

"*E.Coli* Suşlarında Fosfomisin Direncinin Moleküler Maknizmasının Karakterizasyonu" adlı klinik araştırması Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca alınan 2019-02/16 nolu kararına göre yapılmıştır.

3.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri, Vektörler ve Primerler

İn vitro ortamda *E. coli* izolatın tür izolasyon ayrımını yapabilmek için Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose Agar (EMB) kullanılmıştır.

İzolatların fosfomisine karşı duyarlılığı Kirby – Bauer disk difüzyon yöntemi ile EUCAST önerileri doğrultusunda MHA besiyeri kullanılarak yapıldı. İzolatların DNA ve plazmit izolasyon aşamalarında LB (Luria-Bertani) Broth besiyeri kullanıldı. Konjugasyon deneylerinde gerekli antibiyotikleri içeren EMB ve Minimal Agar besiyerleri kullanılmıştır. Transformasyon deneylerinde 32 µg/ml fosfomisin içeren LB Agar besiyerleri kullanılmıştır. Klonlama deneylerinde 50 µg/ml ampisilin içeren LB Agar besiyeri kullanılmıştır.

Çalışmada Konjugasyon deneylerinde *E. coli* J3-2 (Rif^R) hücresi, Transformasyon deneylerinde ise *E. coli* DH5α hücreleri kullanılmıştır. Klonlama vektörü olarak Thermo Scientific firmasından temin edilen CloneJET PCR ürünü klonlama Kiti ve içerisinde bulunan pJET1.2/blunt vektörü kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan primerler Tablo 2’de verilmiştir.

3.2. Bakterilerin Tanımlanması ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen klinik örnekler rutin olarak %5 koyun kanlı agar (bioMérieux, Fransa) ve EMB (bioMérieux, Fransa) agara ekildi. Ekim yapılan petri plakları 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra üreyen koloniler değerlendirildi. Üreyen kolonilerden *Enterobacteriaceae* ailesi bakterilerinin tür düzeyinde tanımlanması için Vitek MS (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile çalışıldı.

Çalışmaya dâhil edilen izolatlarının fosfomisin direnci ilk olarak Vitek 2 Compact (bioMérieux, Fransa) sistemi ile belirlendi. Ardından disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal direnç durumu doğrulandı.

3.2.1. Vitek 2 Compact (bioMérieux, Fransa) Otomatize Sistemi

Enterobacteriaceae izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri AST N325 kartları kullanarak üretici firma önerileri doğrultusunda Vitek 2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile çalışıldı.

İzolatlar %5 koyun kanlı agarda üredikten sonra 0,5 McFarland standart bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı, üretici firma önerileri doğrultusunda kartlar ve süspansiyonlar cihaza yerleştirildi. Her kart liyofilize olarak antimikrobiyallerin farklı konsantrasyonlarını ve besiyeri olarak da Mueller-Hinton buyyon (MHB) içermekte ve AST N325 kartları mikrodilüsyon tekniğinin kısaltılmış ve küçültülmüş bir şekliyle dilüsyon yaparak MİK değerini belirlemektedir. Tüm kartlar; $35,5 \pm 1$ °C’de cihazın inkübatöründe inkübe edildi. Her kart 15 dakikada bir cihaz tarafından karusel denen inkübatöre alınıp ve reaksiyonların okunması için optik sisteme transfer edildi. Tüm inkübasyon periyodu boyunca 15 dakikada bir cihaz tarafından bilgiler toplandı. Tüm okunan değerler kaydedilerek, en geç 18 saat içinde sonuç alındı. Son olarak da antibiyogram kartlarında saptanan fosfomisin sonuçları disk difüzyon yöntemi ile doğrulandı.

3.2.2. Disk Difüzyon Yöntemi

Bakterilerin fosfomisine karşı duyarlılığı Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile EUCAST önerileri doğrultusunda MHA kullanılarak yapıldı. Steril, 15 cm çaplı petri plaklarına 4 mm kalınlığında besiyeri olacak şekilde MHA döküldü ve kullanılıncaya kadar buzdolabında +4 °C ‘de saklandı.

Kültür plaklarında saf koloni halinde üremiş olan bakteri kolonilerinden steril öze ile bir miktar alınarak steril serum fizyolojik içerisinde 0,5 McFarland bulanıklık sağlanacak şekilde süspanse edildi. Bu süspansiyondan steril eküvyon ile MHA besiyeri üzerine ekim yapıldı. Plakların kurumasından sonra fosfomisin 200 µg (Oxoid, İngiltere) antibiyotik diski petri plağının ortasına gelecek şekilde yerleştirildi. Petri plakları 37 °C ‘de 18-24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra inhibisyon zon çapları ölçüldü. Elde edilen sonuçlar, Tablo 1’ de verilen *E. coli* izolatları için EUCAST tarafından önerilen zon çaplarına göre yorumlandı.

Tablo 1: Fosfomisin Antibiyotik Zon Çapı

Antibiyotik	Duyarlı (S)	Dirençli (R)
Fosfomisin (200 µg)	≥ 24 mm	< 24 mm

3.3. *E. coli* izolatlarından DNA Ekstraksiyonu

Enterobacteriaceae izolatlarından kaynatma yoluyla DNA ekstraksiyonu yapıldı. DNA ekstraksiyonu için ilk olarak LB Agar besiyerine pasajlanan bakteriler, 37°C’de bir gece inkübe edildi. Üreyen bakterilerden bir öze dolusu alınıp, 500 µl steril distile su içeren mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Homojenizasyon için vorteks işlemi yapıldı ve homojen bir süspansiyon elde edildikten sonra, mikro santrifüj tüpleri 15 dk süresince 100°C’ye ayarlı su banyosunda kaynatıldı. Daha sonra tüpler 14.800 rpm’de 10 dk. Santrifüj edildi ve süpernatant kısım yeni bir tüpe aktarıldı. Süpernatant kısım tüm PCR işlemlerinde kalıp DNA olarak kullanıldı. Elde edilen DNA’lar kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı (Sevim, 2005).

3.4. Fosfomisin Dirençli *E. coli* suşlarının Direnç Genlerinin ve İntegron Gen Kasetlerinin Tespiti

Fosfomisin dirençli 24 *E. coli* izolatının taşıdığı direnç genlerinin ve integron gen kasetlerinin belirlenmesi için Tablo 2’de verilen primerler yardımı ile PCR işlemleri gerçekleştirildi.

Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Primerler ve Özellikleri

Hedef Gen	Primer ismi	Sekans (5’-3’)	Fragment (bp)	Tm (°C)	Kaynak
FosA	fosA Fwd	ATCTGTGGGTCTGCCTGTCGT	271	59,5	Li vd., 2015
	fosA Rev	ATGCCCGCATAGGGCTTCT			
FosA3	fosA3 Fwd	GCGTCAAGCCTGGCATT	282	57,5	Li vd., 2015
	fosA3 rev	GCCGTCAGGGTCGAGAAA			
FosB	fosB Fwd	CAGAGATATTTTAGGGGCTGACA	312	51	Fu vd., 2016
	fosB Rev	CTCAATCTATCTTCTAACTTCCTG			
FosC	fosC Fwd	GGGTTACATGCCCTTGCTCA	354	59	Fu vd., 2016
	fosC Rev	AACCCGCACAACGACAGATG			
FosC2	fosC2 fwd	TGGAGGCTACTTGGATTG	217	50,5	Li vd., 2015
	fosC2 Rev	AGGCTACCGCTATGGATT			
FosX	fosX fwd	TGTCCCTCACCTTCGACTCT	131	55	Bi vd., 2017
	fosX Rev	TTGCTGGTCTGTGGATTG			
parA-parB	HI1 Fwd	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471	60	Carattoli vd., 2005
	HI1 Rev	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA			
iterons	HI2 Fwd	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC	644	60	Carattoli vd., 2005
	HI2 Rev	GGTCACTACCGTTGTCTATCCT			
RNAI	I1 Fwd	CGAAAGCCGACGCAGAA	139	60	Carattoli vd., 2005
	I1 Rev	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT			
ori_γ	X Fwd	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376	60	Carattoli vd., 2005
	X Rev	TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTTAGC			
repA,B,C	L/M Fwd	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG	785	60	Carattoli vd., 2005
	L/M Rev	CTGCAGGGGCGATTCTTAGG			
repA	N Fwd	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559	60	Carattoli vd., 2005
	N Rev	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
iterons	FIA Fwd	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462	60	Carattoli vd., 2005
	FIA Rev	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG			
repA	FIB Fwd	GGAGTTCTGACACAGATTTTCTG	702	60	Carattoli vd., 2005
	FIB Rev	CTCCGTCGCTTCAGGGCATT			
repA	W Fwd	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	242	60	Carattoli vd., 2005
	W Rev	GGTGCGGGCATAGAACCGT			
repA	Y Fwd	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	765	60	Carattoli vd., 2005

	Y Rev	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT			
iterons	P Fwd	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534	60	Carattoli vd., 2005
	P Rev	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC			
repA2	FIC Fwd	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262	60	Carattoli vd., 2005
	FIC Rev	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT			
repA	A/C Fwd	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465	60	Carattoli vd., 2005
	A/C Rev	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT			
repA	T Fwd	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750	60	Carattoli vd., 2005
	T Rev	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC			
repA	FII _s Fwd	CTGTCGTAAGCTGATGGC	270	60	Carattoli vd., 2005
	FII _s Rev	CTCTGCCACAACTTCAGC			
RNAI/repA	F _{repB} Fwd	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270	52	Carattoli vd., 2005
	F _{repB} Rev	GAAGATCAGTCACACCATCC			
RNAI	K/B Fwd	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC	160	60	Carattoli vd., 2005
	K Rev	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA			
RNAI	K/B Fwd	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC	159	60	Carattoli vd., 2005
	B/O Rev	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA			
TEM	TEM Fwd	AGTATTCAACATTTTCGTGT	847	50	Iraz vd., 2015
	TEM Rev	TAATCAGTGAGGCACCTATCTC			
SHV	SHV Fwd	ATGCGTTATATTGCGCTGTG	843	56	Hanson vd, 2002
	SHV Rev	TTAGCGTTGCCAGTGCTC			
CTX-M	Fwd	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	544	55	Edelstein vd., 2003
	Rev	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA			
GES	GES Fwd	ATGCGCTTCATTACGCAC	863	57	Iraz vd., 2015
	GES Rev	CTATTGTCCGTGCTCAGGA			
VEB	VEB Fwd	GATAGGAGTACAGACATATG	914	55	Kiratisin vd, 2008
	VEB Rev	TTTATTCAAATAGTAATTCCACG			
OXA-1	OXA-1 Fwd	TTTTCTGTGTTTGGGTTTT	427	50	Coque vd, 2008
	OXA-1 Rev	TTTCTTGGCTTTTATGCTTG			
PER1	PER1 Fwd	ATGAATGTCATCACAAAATG	927	48	Kiratisin vd, 2008
	PER1 Rev	TCAATCCGGACTCACT			
Smf-I İntegron	5'-CS Fwd	GGCATCCAAGCAGCAAG	n	50	Levesque vd, 1995
	3'-CS Rev	AAGCAGACTTGACCTGA			
Smf-II İntegron	hep51	GATGCCATCGCAAGTACGAG	n	58	White vd, 2001
	hep74	GGGATCCCGGACGGATGCACGATTGTGA			
qnrA	qnrA Fwd	AGAGGATTCTCACGCCAGG	580	59	Yang vd., 2013
	qnrA Rev	TGCCAGGCACAGATCTTGAC			
qnrB	qnrB Fwd	GGMATHGAAATTCGCCACTG	264	56	Yang vd., 2013
	qnrB Rev	TTTGCYGYCGCCAGTCGAA			
qnrS	qnrS Fwd	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	56	Yang vd., 2013
	qnrS Rev	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG			
Aminoglikozit asetiltransferaz		TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	59	Park vd., 2006
	aac(6')-Ib-cr F				
	aac(6')-Ib-cr R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT			

PCR reaksiyonları 50 µl son hacimde 1X Taq DNA polimeraz buffer, 1,5 mM MgCl₂, 250 µM dNTPmix, 0,2 pmol/µl her bir primerden, 1U Taq DNA polimeraz olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan PCR reaksiyonları Thermo Cycler Cihazına yerleştirilerek PCR parametreleri belirlenerek PCR işlemi gerçekleştirildi. PCR parametreleri genlerin büyüklüğü ve T_m sıcaklıkları göz önüne alınarak belirlendi (Tablo.3) PCR döngüsü; 95°C'de 3 dk. İlk denetürasyon, daha sonra 36 defa 95 °C'de 45 sn. denatürasyon, T_m sıcaklıklarında 45 sn. bağlanma, 72°C'de fragment uzunlukları kadar süre verilerek uzama basamakları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 72°C'de 5 dk. Son uzama basamağı gerçekleştirilerek PCR reaksiyonları tamamlanmıştır.

Tablo 3: Çalışmada Kullanılan Genlerin Büyüklükleri, Tm'leri ve Uzama Süreleri

	Tm	Gen büyüklüğü (bp)	Uzama basamağı süresi
FosA	59	271	30 sn.
FosA3	56	282	30 sn.
FosB	59	312	45 sn.
FosC	59	354	45 sn.
FosC2	55	217	30 sn.
FosX	58	131	30 sn.
TEM	50	847	1 dk.
OXA-1	50	519	45 sn.
SHV	56	843	1 dk.
GES	57	863	1 dk.
PER	48	927	1 dk.
CTX-M	55	544	45 sn.
VEB	55	542	45 sn.
Sınıf-I integron	50	N	7 dk.
Sınıf-II integron	57	N	7 dk.
qnrA	56	580	50 sn.
qnrB	56	264	50 sn.
qnrS	56	428	50 sn.
aac(6')-Ib-cr	56	482	50 sn.
REP-PCR	48	N	5 dk.
parA-parB (HI1)	60	471	30 sn.
İterons (HI2)	60	644	30 sn.
RNAI (I1-I4)	60	139	30 sn.
ori _γ (X)	60	376	30 sn.
repA,B,C (L/M)	60	785	30 sn.
RepA (N)	60	559	30 sn.
İterons (FIA)	60	462	30 sn.
RepA (FIB)	60	702	30 sn.
RepA (W)	60	242	30 sn.
repA (Y)	60	765	30 sn.
İterons (P)	60	534	30 sn.
repA2 (FIC)	60	262	30 sn.
repA (A/C)	60	465	30 sn.
repA (T)	60	750	30 sn.
repA (FII _s)	60	270	30 sn.
RNAI/repA (F)	52	270	30 sn.
RNAI (K)	60	160	30 sn.
RNAI (BIO)	60	159	30 sn.

PCR işlemi sonrasında PCR ürünleri etidyum bromür içeren %1'lik agaroz (fos genleri için %2'lik agaroz jeli kullanılmıştır) jeline yüklenmişlerdir. 1X TAE buffer içerisinde 130 V'da 30'dk elektroforez işlemine tabi tutulmuş ve çoğaltılan fragmentler U.V ışığı altında görüntülenmişlerdir.

Çalışmada fosfomisin dirençli *E. coli* izolatlarında PCR yardımı ile belirlenen CTX-M geninin DNA dizi analizinin gerçekleştirilmesi için PCR ürünleri CloneJet PCR

ürünü klonlama kiti (Thermo Scientific) kullanılarak pJET1.2/blunt vektörüne üretici firmanın önerileri doğrultusunda klonlanmıştır. Oluşturulan rekombinant vektör CaCl_2 metodu ile kompetent hale getirilmiş *E. coli* DH5 α hücrelerinin içerisine transformasyon yolu ile aktarılmıştır. Hücreler 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampisilin içeren LB agar petrilere yayılarak ve 37°C’de bir gece inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında petrilere oluşan kolonilerden 10 tane seçilip 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampisilin içeren LB broth besiyerlerinde çalkalamalı inkübatörde inkübasyona tabi tutulmuştur. Üremenin olduğu örneklerden gene spesifik primerler vasıtasıyla yapılan Koloni PCR sonrasında doğru klonlar tespit edilmiştir. *E. coli* DH5 α hücresi negatif kontrol olarak kullanılmış ve tespit edilen doğru klonlardan Plazmit miniprep kiti kullanılarak rekombinant plazmitler elde edilerek ve DNA dizilerinin tespiti için MacroGen firmasına gönderilmiştir.

3.5. Bakteriyal Genotipleme

3.5.1. REP-PCR

Fosfomisin dirençli 24 *E.coli* izolatının genotipik çeşitliliğini belirlemek için DNA finger printing yöntemlerinden REP-PCR analizi kullanılmıştır. Rep1 ve Rep2 primerleri ile gerçekleştirilen PCR işlemi son hacim 50 μL ‘de olacak şekilde; 1X Taq DNA polimeraz buffer, 1.5 μM MgCl_2 , 250 μM dNTP mix, 1 pmol/ml herbir primerden, 2.5 U Taq DNA polimeraz olacak şekilde hazırlandı. İzolatların kaynatma DNA’larından reaksiyonlara 5 μL eklenerek reaksiyonlar hazırlanmıştır. Reaksiyonlar Thermo Cycler cihazına yerleştirilerek Tablo 3’de verilen TM ve uzama süreleri kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi sonrasında PCR ürünleri etidyum bromür içeren %1’lik agaroz jeline yüklenmişlerdir. 1X TAE buffer içerisinde 130 V’da 30 dk elektroforez işlemine tabi tutulmuş ve çoğaltılan fragmentler U.V ışığı altında görüntülenmişlerdir. İzolatların çoğaltılan fragmentleri incelenerek, izolatlar arasındaki var olan ve olmayan fragmentlerden bir matrix oluşturulmuştur. Oluşturulan matrix MEGA 6.0 programında UPGAMA metodu kullanılarak dendograma dönüştürülmüştür.

3.6. Plazmit Aracılı Fosfomisin Direncinin Belirlenmesi

3.6.1. Konjugasyon

Plazmit aracılı fosfomisin direnç genlerinin konjugatif bir plazmit üzerinde olup olmadığı broth mating procedürüne göre gerçekleştirilen konjugasyon deneyleri ile belirlenmiştir. PCR işlemleri sonucunda Fos genlerinden birini veya birkaçını içeren

izolatlar verici hücre (dönor) olarak ve rifampisin dirençli *E. coli* J53-2 izolatı ise alıcı hücre (recipient) olarak kullanılmıştır (Sevim, 2005).

Verici ve alıcı hücreler antibiyotik içermeyen 3ml LB buyyona ekimleri yapılarak çalkalayıcı bir inkübatörde 37 °C’de bir gece inkübe edilmişlerdir. Verici ve alıcı hücreleri içeren kültürler eşit hacimde (1:1) karıştırdıktan sonra 37 °C’ bir gece sallanmadan inkübe edilmişlerdir (Sevim, 2005).

Transkonjugantların seleksiyonu için alıcı hücre *E.coli* J53-2’nin dirençli olduğu rifampisin (150µl/ml) ve verici hücrenin dirençli olduğu 32 µg/ ml fosfomisin antibiyotiği eklenmiş EMB agar yüzeyine konjugasyon karışımının 10^{-1} dilüsyonundan otomatik pipet yardımıyla 100 µl damlatılmış ve streil cam baget ile agar yüzeyine yayılarak 18-24 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Metalik mavi-yeşil röfleli koloniler fenotipik olarak transkonjugant olarak varsayıp, transkojugantların seçilimi için 4 farklı içeriğe sahip EMB ve Minimal Agara replika ekimleri gerçekleştirilmiştir (Sevim, 2005).

Agar 1 : Alıcı hücre olan *E.coli* J53-2 ‘nin oksotrof olduğu methionin ve prolin amino asitlerinden sadece birini içeren minimal agar.

Agar 2 : 150µl/ml rifampisin (resipientin dirençli olduğu antibiyotik) +32 µg/ml fosfomisin (dönörün dirençli olduğu antibiyotik) içeren EMB agar plağı.

Agar 3: 150 µl/ml rifampisin içeren EMB agar plağı.

Agar 4: 32 µg/ml fosfomisin içeren EMB agar plağı.

Dört farklı agara yapılan replika ekimler 37°C’de 1 gece inkübe edilemiş ve Agar 1’ de üremeyen, Agar 2,3 ve 4’te üreyen fenotipik olarak metalik yeşil röfleli kolonilerin transkonjugant olduklarına karar verilmiştir. Transkonjugantlardan tekrar plazmid DNA’ ları izole edilerek plazmit transferleri doğrulanmıştır. Konjugasyon etkinliğinin hesap edilmesinde gereken canlı verici hücre sayısının bulunması için önceden 10^{-5} 10^{-6} ve 10^{-7} dilüsyonları yapılarak 100 µl’si LB agar yüzeyine damlatıldı ve steril cam baget yardımıyla yayılarak ekildi. Üreyen bakteri kolonileri sayılarak bulunan değer, ekilen miktar (ml) ile sulandırım katsayısı çarpımına aşağıdaki formül kullanılarak oranlandı ve canlı bakteri sayısı belirlenmiştir (Sevim, 2005).

- **Canlı Bakteri Sayısı (ml’de) = Agardaki Koloni Sayısı / Ekilen Miktar (ml) X Sulandırım Katsayısı**

Verici izolatların konjugasyon etkinliğinin hesabı için ilk izolasyon plaklarındaki transkonjugant kolonileri sayıldı ve mililitredeki transkonjugant sayısı hesaplanarak verici hücre kültürlerinin mililitresindeki hücre sayısına, aşağıdaki formül kullanılarak oranlanmıştır (Sevim, 2005).

- **Konjugasyon Etkinliği = Transkonjugant Sayısı (ml'de) / Verici Hücre Sayısı**

3.6.2. Plazmit izolasyon kiti

Transkonjugant *E.coli* izolatlarının plazmit izolasyonları GeneJET plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, K0502) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İzole edilen plazmitlerin taşıdığı fosfomisin ve diğer direnç genlerinin tespiti Bölüm 3.4 te verilen “Fosfomisin dirençli *E.coli* izolatlarının Direnç Genlerinin ve İntegron Gen Kasetlerinin Tespiti” başlığı altında verilen primerler ve PCR reaksiyonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.7. PCR Tabanlı Plazmit Replikasyon Orjini Belirleme

Transkonjugant hücrelerdeki plazmitlerin tiplendirilmesi PCR-tabanlı replikon tipi prosedürü kullanılarak gerçekleştirildi (Carattoli vd., 2005). Bu metotta var olan 18 çift primer, 5 multipleks ve 3 simpleks PCR kullanılarak, ana uyumsuzluk grubu olan FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-I₇, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F ve FIIA replikonları tanımlanmıştır. Plazmit gruplarının belirlenmesi için kullanılacak primerler Tablo 2’de verilmiştir. Çalışmada bu spesifik primerler kullanılarak 5 multipleks ve 3 simpleks PCR gerçekleştirilmiştir. Birinci multipleks PCR’da HI1, HI2 ve I1-I₇ replikonları, ikinci multipleks PCR’da X, L/M ve N, üçüncü multipleks PCR’da W, FIA ve FIB replikonları, dördüncü multipleks PCR’da P, Y ve FIC replikonları ve beşinci multipleks PCR’da ise T, A/C ve FIIA replikonları çoğaltılmaya çalışılmıştır. Multipleks PCR’lar haricinde K, B/O ve FIIA replikonları gene spesifik dizayn edilen simpleks PCR’lar ile çoğaltılmıştır.

Reaksiyonlar 25 µl son hacimde gerçekleştirilmiştir. İzolatlardan plasmid FIIA-simpleks PCR hariç, tüm PCR fragmentlerinin çoğaltılması için gereken amplifikasyon döngüsü; 1 defa 94°C’de 5 dk., 30 defa 94°C’de 1dk., 60°C’de (FIIA için 52°C) 30sn., 72°C’de 1dk., son uzama basamağı ise 1 defa 72°C’de 5 dk. Olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri %1 ‘lik etidyum bromür içeren agaroz jelde 1XTAE buffer içerisinde elektroforez yardımı ile yürütülmüş ve U.V ışığı altında görüntülenmiştir. İstenilen büyüklükteki bantların varlığına göre pozitif veya negatif sonuçlar elde edilmiştir.

3.8. Veri Analizi

Çalışmada elde edilen CTX-M geni DNA sekansları Bioedit programında işlenmiş ve yakın ilişkili olduğu sekanslar ile benzerlik yüzdeleri NCBI GenBank veri tabanından BLAST yapılarak gerçekleştirilmiştir (Altschul et al. 1990). Rep-PCR verileri fasta formatında bantların varlığına ve yokluğunu göre bir matriks şeklinde yapılmıştır. Oluşturulan matrix MEGA-X programında UPGAMA metodu kullanılarak analizi gerçekleştirilmiştir (Kumar ve ark. 2018).



4. BULGULAR

Bu Çalışmada, Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen idrar örneklerinden izole edilen 24 fosfomisin dirençli *E.coli* izolatların farklı grup antibiyotiklere karşı direnç profilleri belirlenerek, fosfomisin antibiyotiğinin direncinin aktarılabilirliğine izolatların Klonal ilişkileri rep-PCR yardımı ile çalışılmıştır. İzolatlardan elde edilen konjugatif ve transformant plazmitlerin replikasyon orijinleri PCR-temelli replikasyon orijini belirleme yöntemine göre gerçekleştirilmiştir.

4.1. İdrar Örneklerinin Toplandığı Servisler

Ahi Evran Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli servis hastalarından gönderilen idrar örneklerinde fosfomisin dirençli olan 24 *E.coli* izolatı çalışmaya dâhil edilmiştir. Bu izolatların 9'u üroloji, 6'sı 3. Basamak yoğun bakım ünitesi, 5'i nefroloji, 3'ü dahiliye, 1'i ise acil servis ünitelerinden izole edilmiştir. Fosfomisin dirençli *E.coli* izole edilen idrar örneklerinin 10'u kadın, 14 ise erkek hastalardan alınmıştır (Tablo 4).

Tablo 4: Fosfomisin dirençli *E.coli* izolatların toplandığı servis ve özellikleri

	Klinik	Örnek	Yaş	Cinsiyet	rep-PCR grup
FF1	Üroloji Servisi	İdrar	55	Erkek	2
FF2	Üroloji Servisi	İdrar	53	Erkek	1A
FF3	Üroloji Servisi	İdrar	50	Erkek	4A
FF4	Üroloji Servisi	İdrar	54	Erkek	4A
FF5	Üroloji Servisi	İdrar	49	Erkek	4B
FF6	Üroloji Servisi	İdrar	53	Erkek	4B
FF7	Üroloji Servisi	İdrar	59	Kadın	2
FF8	Üroloji Servisi	İdrar	60	Kadın	4B
FF9	Üroloji Servisi	İdrar	58	Kadın	5
FF10	3.Basamak YBÜ	İdrar	62	Kadın	1A
FF11	3.Basamak YBÜ	İdrar	61	Kadın	3
FF12	3.Basamak YBÜ	İdrar	66	Kadın	5
FF13	3.Basamak YBÜ	İdrar	72	Kadın	2B
FF14	3.Basamak YBÜ	İdrar	71	Erkek	2B
FF15	3.Basamak YBÜ	İdrar	73	Erkek	3
FF17	Nefroloji Servisi	İdrar	59	Erkek	4B
FF18	Nefroloji Servisi	İdrar	49	Erkek	3
FF19	Nefroloji Servisi	İdrar	58	Erkek	4B

FF20	Nefroloji Servisi	İdrar	60	Kadın	2
FF21	Nefroloji Servisi	İdrar	61	Kadın	1A
FF22	Dahiliye Servisi	İdrar	54	Erkek	1A
FF23	Dahiliye Servisi	İdrar	53	Erkek	1A
FF24	Dahiliye Servisi	İdrar	58	Kadın	1B
FF25	Acil Servisi	İdrar	63	Erkek	1B

4.2. İzole Edilen *E. coli*'lerin Antibiyotik Duyarlılıkları

İdentifikasyonları yapılan toplam fosfomisin dirençli 24 *E.coli* izolatı 17 farklı antibiyotik maddeye karşı hassasiyetleri disk diffüzyon metodu kullanılarak belirlenmiştir. İzole edilen *E.coli* izolatlarından 22 tanesi (% 92) üç ve üzeri antibiyotiğe karşı dirençli olup çoklu ilaç direnci taşımaktadır. İzolatlardan FF3 11 antibiyotiğe, FF15 ise 13 antibiyotiğe karşı gösterdikleri direnç oranları ile en fazla direnç taşıyan izolatlardır. Fosfomisine dirençli olan 24 izolatdan 21 (% 87.5) tanesi ampisiline (AM), 15 (%62.5) tanesi Trimethoprim Sülfametaksazole (SXT), 12 (% 50) tanesi Gentamisine (GN), 10 (41.6) tanesi Amoksisilin Klavunolik Asite (AMC) ve Seftriaksona (CRO), 9 tanesi (%37.5) Siproflaksasine (CİP), 8 (% 33.3) tanesi Sefuroksime (CXM), 7 (%29) tanesi Tazobaktam Piperilik Asite (TPZ) ve Seftazidime (CAZ), 6 (%25) tanesi Sefiksime (CFM), 3 (%12.5) tanesi Sefoksitin (FOX) ve Amikasin (AK) ve 2 (% 8) tanesi Netilmisin (N) antibiyotiğine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzolatlardan hepsinin karbapenem grubu antibiyotiklerden Ertapeneme (ERT), Meropeneme (MEM) ve İmipeneme (İMP) karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *E.coli* izolatlarının standart disk diffüzyon testleri ile elde edilen antimikrobiyal test sonuçları ve direnç yüzdeleri Tablo 5 (a,b)'de verilmiştir.

Tablo 5a: Antibiyotik Direnç Yüzdeleri.

	AM	AMC	TPZ	CXM	CFM	FOX	CAZ	CRO	SXT	FF	N	AK	GN	CİP	ERT	İMP	MEM
R %	87,5	41,6	29	33,3	25	12,5	29	41,6	62,5	100	8	12,5	50	37,5	0	0	0

Tablo 5b: *E.coli* İzolatlarının Standart Disk Diffüzyon Testleri İle Elde Edilen Antimikrobiyal Test Sonuçları (İzolatlar FF ve sıralı rakamlar kullanılarak kodlanmıştır).

İzolat	AM	AMC	TPZ	CXM	CFM	FOX	CAZ	CRO	SXT	FF	N	AK	GN	CIP	ERT	IMP	MEM
FF1	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
FF2	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
FF3	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S
FF4	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
FF5	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S
FF6	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
FF7	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
FF8	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S
FF9	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
FF10	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S
FF11	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S
FF12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
FF13	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S
FF14	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S
FF15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S
FF17	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
FF18	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S
FF19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
FF20	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S

FF21	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
FF22	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S
FF23	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S
FF24	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S
FF25	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	S	S	S

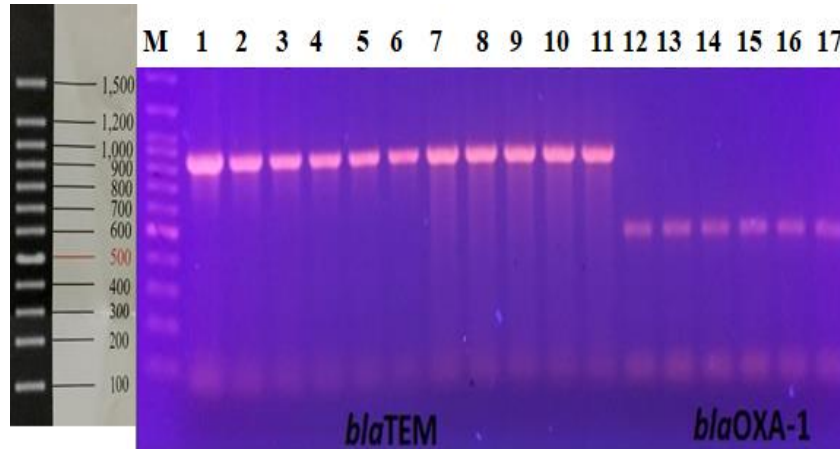
4.3. Fosfomisin dirençli *E. coli* izolatlarının Antibiyotik Direnç Genlerinin belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen *E.coli* izolatlarında fosfomisin direncinden sorumlu olduğu bilinen plazmit kaynaklı *fosA*, *fosA3*, *fosB*, *fosC*, *fosC2*, *fosX* genleri spesifik primerler kullanılarak PCR yardımı ile taranmıştır. Fosfomisin direncini belirlemek için yapılan PCR işlemi sonucunda 24 örnekten 1 (FF25)'i *fosA3* geni bakımından pozitif bulunmuştur(Şekil 2) (Tablo 6).

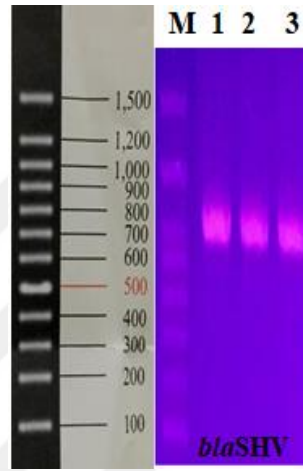


Şekil 2. *fosA3* geni PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: DNA markır (Trans, 100 bp plus DNA ladder), 1: FF25 izolatı *fosA3* geni.

E.coli izolatlarının beta-laktam ve antibiyotiklerine karşı dirençten sorumlu olan *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1} ve *bla*_{PER-1} varlığı spesifik primerler kullanılarak PCR yardımı ile taranmıştır. Örneklerin 11'inde *bla*_{TEM}, 6'sında *bla*_{OXA-1}, 3'ünde *bla*_{SHV} geni varlığı tespit edilmiştir(Şekil 3a. Ve 3b.) (Tablo 6).



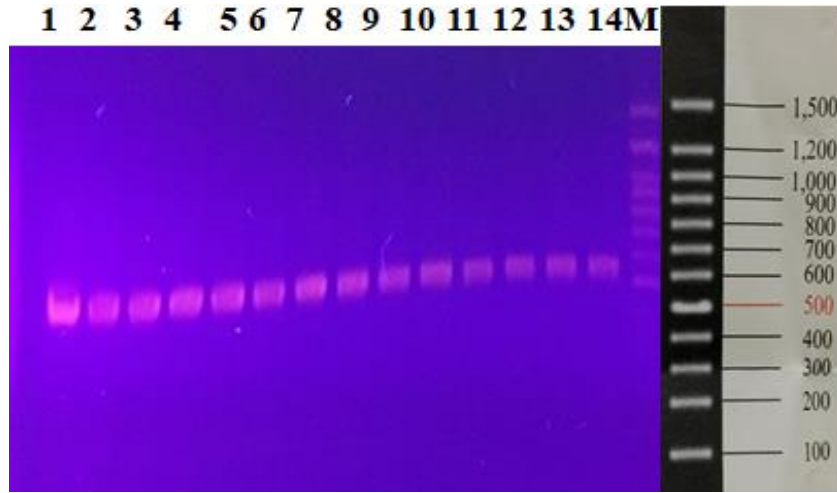
(Şekil 3a.)



(Şekil 3b.)

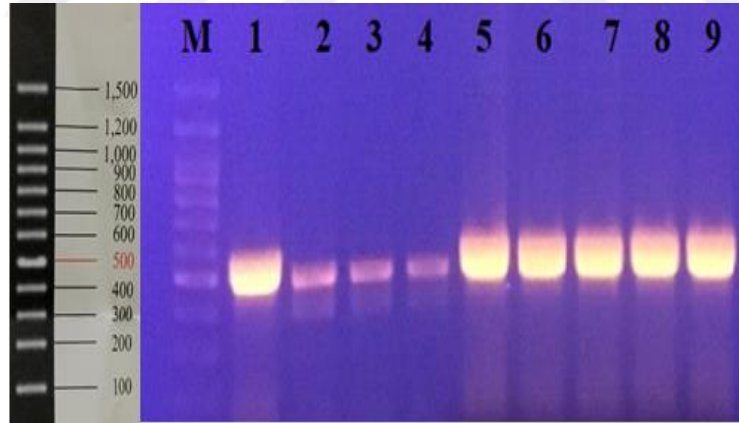
Şekil 3 (a, b). *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{SHV} genleri PCR ürünü agaroz jel elektrofez görüntüleri. M: DNA markır (Trans, 100 bp plus DNA ladder), *bla*_{TEM} geni görüntüleri (1-11); 1: FF2, 2: FF4, 3: FF5, 4: FF8, 5: FF10, 6: FF11, 7: FF15, 8: FF22, 9: FF23, 10: FF24, 11: FF25, *bla*_{OXA-1} genleri görüntüleri (12-17); 12: FF6, 13: FF9, 14: FF13, 15: FF14, 16: FF15, 17: FF18, *bla*_{SHV} genleri görüntüleri (1-3); 1: FF2, 2: FF15, 3: FF21.

Örneklerde diğer *bla*_{CTX-M} gen içeriklerinin tespiti için yapılan PCR sonucunda ürünler dizin analizine gönderilmiş ve 14 pozitif sonucun hepsinin CTX-M15 grubuna ait olduğu tespit edilmiştir. İzolatların hiçbirinde *bla*_{PER-1} genleri tespit edilememiştir. (Tablo 6).

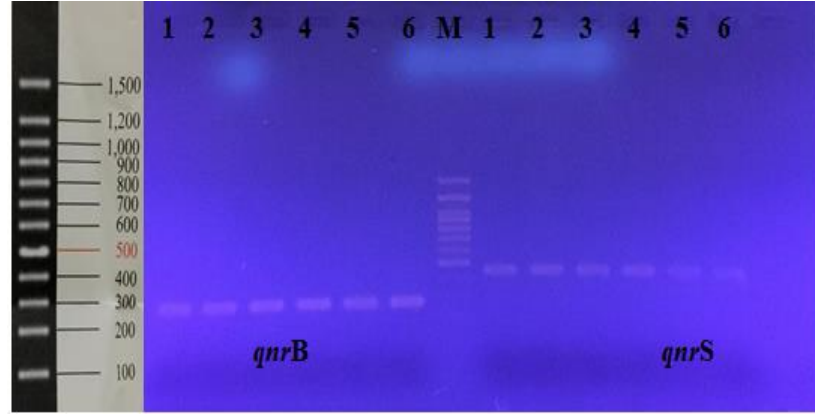


Şekil 4: *bla*_{CTX-M} geni PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: DNA markır (Trans, 100 bp plus DNA ladder). *bla*_{CTX-M} geni görüntüleri (1-14) ; 1:FF3, 2:FF6, 3:FF8, 4:FF9, 5:FF10, 6:FF13, 7:FF14, 8:FF15, 9:FF18, 10:FF20, 11:FF21, 12:FF22, 13:FF23, 14:FF25

Kinolon grubu antibiyotiklerine karşı plazmit aracılı dirençten sorumlu olan *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac*-(6')-*ib-cr* genlerin varlığı spesifik primerler yardımı ile taranmıştır. . *E.coli* izolatlarının 6'sı *qnrB* ve *qnrS*, 9'u *aac*-(6')-*ib-cr* geni içerdiği tespit edilmiştir. İzolatların hiçbirisi *qnrA* geni içermemektedir. (şekil 5), (şekil 6), (Tablo 6).

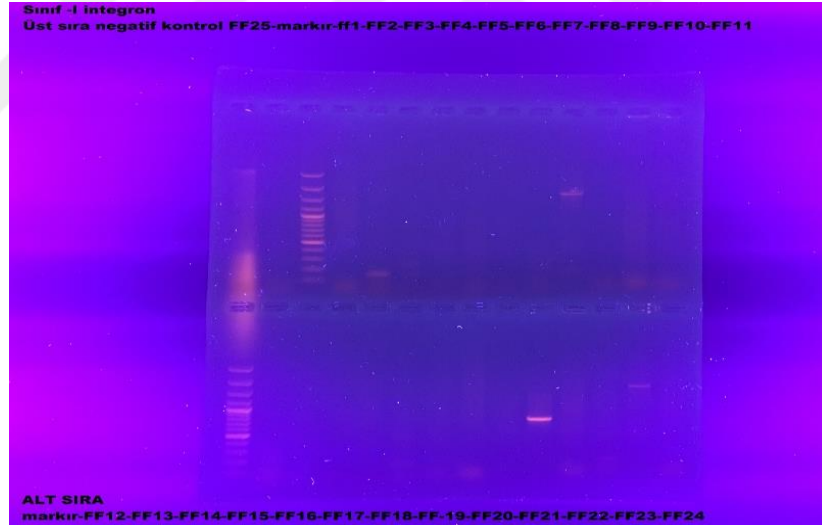


Şekil 5 : *aac*-(6')-*ib-cr* geninin PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: DNA markır (Trans, 100 bp plus DNA ladder). *aac*-(6')-*ib-cr* genleri (1-9) ; 1:FF2, 2:FF3, 3:FF10, 4: FF13, 5:FF14, 6:FF15, 7:FF18, 8:FF21, 9:FF25.



Şekil 6: *qnrB* ve *qnrS* genlerinin PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: DNA markır (Trans, 100 bp plus DNA ladder). *qnrB* genleri (1-6); 1:FF2, 2:FF3, 3:FF10, 4:FF15, 5:FF18, 6:FF21, *qnrS* genleri (7-12); 7:FF2, 8:FF3, 9:FF10, 10:FF15, 11:FF18, 12: FF21.

Sınıf-1 ve Sınıf-2 integronların varlığı spesifik primerler kullanılarak PCR yardımı ile taranmıştır. Sınıf-1 ve Sınıf-2 integron içerikleri araştırıldığında; izolatların 3'ünde (FF8, FF20, FF23) Sınıf-1 integron tespit edilmiştir. Sınıf-2 integron içeriği hiçbir izolatta tespit edilememiştir. (şekil 7), (tablo 6).



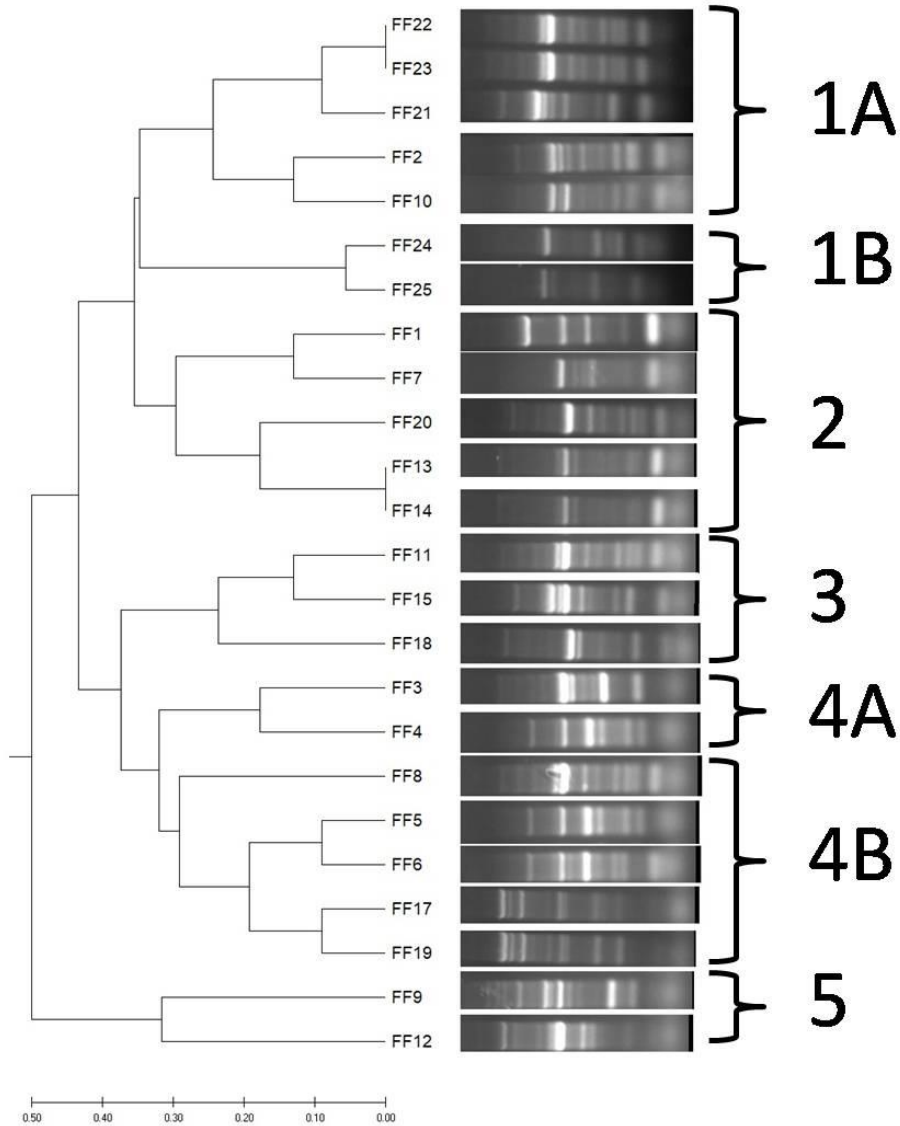
Şekil 7: Sınıf-1 integronların genlerinin PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü. Markır O'GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus

Tablo 6:Fosfomisin Dirençli *E. coli* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Genleri

İzolatların Adı	<i>fosA</i>	<i>fosB</i>	<i>fosC</i>	<i>fosC2</i>	<i>fosA3</i>	<i>fosX</i>	TEM	OXA-1	SHV	PER	CTX-M	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	İntegron-1	İntegron-2
FF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FF2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
FF3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CTX-M15	-	+	+	+	-	-
FF4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FF5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FF6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	CTX-M15	-	-	-	-	-	-
FF7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FF8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	CTX-M15	-	-	-	-	+	-
FF9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	CTX-M15	-	-	-	-	-	-
FF10	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	CTX-M15	-	+	+	+	-	-
FF11	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FF12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FF13	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	CTX-M15	-	-	-	+	-	-
FF14	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	CTX-M15	-	-	-	+	-	-
FF15	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	CTX-M15	-	+	+	+	-	-
FF17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FF18	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	CTX-M15	-	+	+	+	-	-
FF19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FF20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CTX-M15	-	-	-	-	+	-
FF21	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	CTX-M15	-	+	+	+	-	-
FF22	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	CTX-M15	-	-	-	-	-	-

4.5. Rep-PCR

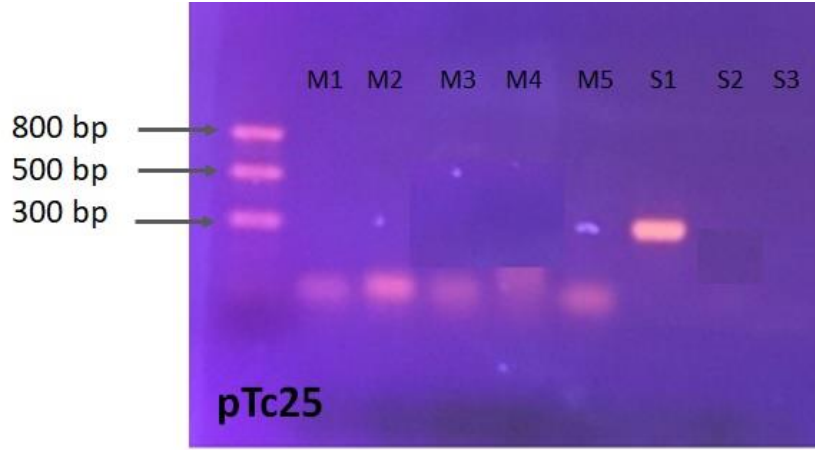
İzolatların Klonal ilişkileri rep-PCR yardımı ile çalışılmıştır. Yapılan dendrogram sonucunda fosfomisin dirençli *E. coli* izolatlarının 5 grupta toplandığı görülmektedir. Özellikle Grup 1A'da yer alan F22 ve F23 izolatları ve Grup 2'de yer alan F13 ve F14 izolatlarının aynı klonal benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. İzolatların klonal ilişkileri Şekil 8'de yer alan dendrogramda gösterilmektedir. Klonal ilişkileri belirlenen fosfomisin dirençli *E. coli* izolatlarının hangi servislerden izole edildiği Tablo 4'de verilmiştir.



Şekil 8 : İzolatların rep-PCR analizi

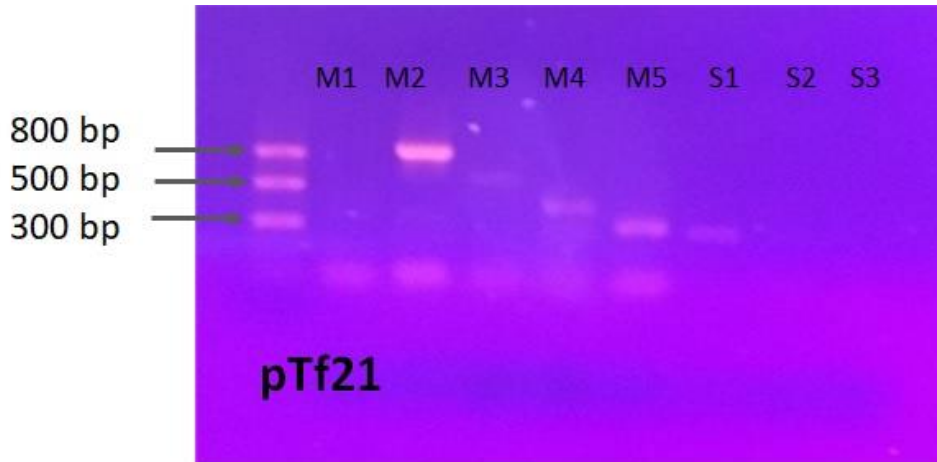
4.6. Pcr Tabanlı Replikasyon Orjini Belirleme

İzolatlardan elde edilen konjugatif pFF25 ve transformant pFF21 plazmitlerinin replikasyon orijinleri PCR-temelli replikasyon orijini belirleme yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Yapılan PCR işlemi sonucunda pFF25 plazmitinin IncF replikasyon orijinine sahip olduğu tespit edildi (Şekil 9).



Şekil 9: Konjugatif pTc25'in PCR-tabanlı replikasyon orijini. M1: multipleks 1. reaksiyon (HI1, HI2, I1), M2: multipleks 2. reaksiyon (X, L/M, N), M3: multipleks 3. reaksiyon (FIA, FIB, W), M4: multipleks 4. reaksiyon (Y, P, FIC), M5: multipleks 5. reaksiyon (A/C, T, FIAs), S1: F simpleks reaksiyon, S2: K simpleks reaksiyon, S3: B/O simpleks reaksiyon.

Transformasyon deneyleri sonucunda fosfomisin direnci taşıdığını belirlediğimiz diğer bir plazmit olan pTf21'in replikasyon orijini IncL/M olarak tespit edilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10: Transformant pTf21'in PCR-tabanlı replikasyon orijini. M1: multipleks 1. reaksiyon (HI1, HI2, I1), M2: multipleks 2. reaksiyon (X, L/M, N), M3: multipleks 3. reaksiyon (FIA, FIB, W), M4: multipleks 4. reaksiyon (Y, P, FIC), M5: multipleks 5. reaksiyon (A/C, T, FIAs), S1: F simpleks reaksiyon, S2: K simpleks reaksiyon, S3: B/O simpleks reaksiyon.

5. TARTIŞMA

Enterobacteriaceae izolatlarının antibiyotik direncinde dünya çapında bildirilen ciddi bir artış söz konusudur (Falagas ve ark., 2016). Bu dirençli, GSBL üreten ve karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* (CRE) izolatları, mortalite oranlarının yüksek olduğu ciddi enfeksiyonlara sebep olmakta ve tedaviyi güçleştirilmiştir (Lee ve ark., 2012; Liu ve ark., 2012). Antibiyotik dirençlerindeki artış ve kullanılabilecek yeni aktif bileşiklerin olmayışı, eski antibiyotikleri bir alternatif tedavi aracı olarak kullanmaya neden olmuştur (Falagas ve ark., 2016). MDR *Enterobacteriaceae* izolatlarının neden olduğu, tedavi edilmesi zor üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde fosfomisin kullanımı, kanıtlanmış etkinliği nedeniyle tekrar gündeme gelmiştir (Veve ve ark., 2016; Zhanel ve ark., 2016).

Fosfomisin dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarıyla son 10 yılda yapılan çalışmalarda en sık izole edilen *fosA* alt tipi *fosA3* geni olarak raporlanmıştır (Yang ve ark., 2017). İlk olarak Wachino ve ark. (2010)'nın Japonya'da GSBL üreten klinik *E. coli* izolatlarıyla yaptıkları çalışmada % 1,04 oranında *fosA3* pozitifliği bildirilmiştir. Daha sonra fosfomisin dirençli izolatlar ile yapılan çalışmalar incelendiğinde Hou ve ark. (2012)'nin Çin'de hasta ve sağlıklı evcil hayvanlardan izole ettikleri *E. coli* izolatlarında % 9; Lee ve ark. (2012)'nin Güney Kore'de GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarıyla yaptıkları çalışmada GSBL üreten *E. coli* izolatlarında % 3,03 ve GSBL üreten *K. pneumoniae* izolatlarında %1,1; Ho ve ark. (2013)'nin Hong Kong'ta klinik örneklerden izole ettikleri *E. coli* izolatlarında %33,3; Jiang ve ark. (2015)'nin Çin'de KPC veya GSBL üreten *K. pneumoniae* izolatları ile yaptıkları çalışmada KPC üreten izolatlarda %33,8 ve GSBL üreten izolatlarda %8,8; Tseng ve ark. (2015)'nin Tayvan'da GSBL üreten *E. coli* izolatları ile yaptıkları çalışmada %2,75; Xiang ve ark. (2015)'nin Çin'de KPC üreten *K.pneumoniae* izolatlarıyla yaptıkları çalışmada %77 ve Mendes ve ark. (2016)'nin Portekiz'de *E. coli* izolatları ile yaptıkları çalışmada %2,3; Cao ve ark. (2017)'nin Çin'de üriner *E. coli* izolatları ile yaptıkları çalışmada %89,5; yine Tseng ve ark. (2017)'nin Tayvan'da CR-KP izolatlarıyla yaptıkları çalışmada %71,4 oranında *fosA3* pozitifliği saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise fosfomisin dirençli izolatların %4,8 *fosA3* yönünden pozitif olarak belirlenmiştir. Çalışmamızın sonucu Doğu Asya ülkeleri ile kıyaslandığında, bulduğumuz *fosA3* geni pozitifliği oranının düşük olduğu görülmüştür. Bunun nedeni Doğu Asya ülkelerinde çiftlik hayvanları ile evcil hayvanların *fosA3* geni taşıyan *Enterobacteriaceae* izolatları için rezervuar haline gelmiş olmasıdır. (Yao ve ark., 2016). Doğu Asya ülkelerindeki beslenme alışkanlıkları ve sokaklarda satılan et ürünleri bu ülkelerde *fosA3* genini taşıyan plazmidlerin evcil hayvanlar ve insanlar arasındaki iletimini kolaylaştırmış ve direnç yayılımını hızlandırmış olabilir.

Konjugasyon deneyleri sonucunda negatif çıkan fosfomisin dirençli 23 izolatın fosfomisin direncini plazmit üzerinde taşıyıp taşımadığı transformasyon deneyleri ile belirlenmişti. Yapılan transformasyon deneyleri sonucunda *E. coli* FF21 izolatının fosfomisin direncini plazmit üzerinde taşıdığı tespit edilmiştir. Fakat hem yabantip hücrede hemde transformant hücrede taranılan hiçbir fosfomisin direnç geni tespit edilememiştir. Bu izolatların transformant hücrede çıkmaması sonucu plazmitlerin hepsinin sekans analizi yapılarak izolatın hangi fosfomisin genine direncinin olduğu bulunabilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- *E.coli* izolatlarında Fosfomisin direncini belirlemek için yapılan PCR işlemi sonucunda 24 örnekten 1 (FF25)'i *fosA3* geni bakımından pozitif bulunurken , hiçbirinde *fosA* , *fosB* , *fosC* , *fosC2* ve *fosX* genlerinin pozitifliği saptanmamıştır.
- Örneklerin 11'inde *bla_{TEM}*, 6'sında *bla_{OXA-1}*, 3'ünde *bla_{SHV}* geni varlığı tespit edilmiştir. *bla_{CTX-M}* geni için yapılan PCR sonucunda ürünler dizin analizine gönderilmiş ve 14 pozitif sonucun hepsinin CTX-M15 grubuna ait olduğu tespit edilmiştir (Makrogen, Hollanda). İzolatların hiçbirinde *bla_{PER-1}*, *bla_{GES}*, *bla_{VEB}* genleri tespit edilememiştir.
- *E.coli* izolatlarının 6'sı *qnrB* ve *qnrS*, 9'u *aac-(6')-Ib-cr* genlerini içerdiği tespit edilmiştir. İzolatların hiçbir *qnrA* geni içermemektedir.
- Sınıf-1 ve Sınıf-2 integron içerikleri araştırıldığında; izolatların 3'ünün Sınıf-1, Sınıf-2 integron içeriği hiçbir izolatta tespit edilememiştir.
- Yapılan konjugasyon çalışmaları sonucunda 24 bakteri izolatının 1'inin konjugatif plazmit taşıdığı tespit edilmiştir. Transformasyon deneyleri sonucunda da fosfomisin direncinin plazmit üzerinde taşıdığı tespit edilmiştir. Transformant plazmitlerin fosfomisin direnç genleri tanımlanamamıştır.
- Çalışmada elde edilen epidemiyolojik veriler ve literatür araştırmaları sonucu fosfomisin antibiyotiği alternatif ajan olarak kullanılma girmesi ile direnç oranı yükselmeye başlamıştır.
- Bu çalışma direncin hem ülkemizde hem de dünyada yayılımının belirlenmesinde oldukça önemli ipuçları verecektir. Aynı zamanda bundan sonra yapılacak olan çalışmalar için çok önemli bir veri tabanı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Afşar I, Gonul B, Şener AG, Turker M. In-vitro susceptibility of clinical isolates of *Escherichia coli* to fosfomycin trometamol and other antibiotics. ANKEM 2005; 19: 77-9.
- Akalın H. (1999). Yoğun bakım ünitelerinde *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. ve diğer tedavisi zor gram negatif bakteriler. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 1999; 3:202-211.
- Akata F. (2001). Üriner sistem enfeksiyonlarında uygun antibiyotik kullanımı. Klinik Derg. 2001; 14: 114-123.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol, 215: 403–410.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1992). Shot Protocols In Molecular Biology. Greene Publishing Associates And John Wiley & Sons, New York.
- Bacius V, Verrier-Jones K. (2002). Urinary tract infection. In: Cochat P (ed). European Society for Pediatric Nephrology Handbook. Medcom, Lyon 2002: 153-57.
- Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. (1994). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology [First ed.]. Baltimore: Mosby Publications, 1994: 362-387.
- Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. (1994). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology [First ed.]. Baltimore: Mosby Publications, 1994: 362-387. 18)
- Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, et al. Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 616–620.
- Baylan, O. (2010). Fosfomisin: Dünü, Bugünü ve Geleceği. Gulhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul.
- Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, et al. (2006). Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. *Clin Infect Dis* 2006; 42(7): 925-34.
- Bilgehan H. (1992). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 1. Baskı, Ankara: Fakülteler Kitabevi, 1992: 387-411.

- Bilgehan H. (1994). *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 1. Baskı, Ankara: Fakülteler Kitabevi, 1992: 387-411.
- Black JA, Moland ES, Thomson KS. (2005). AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3110-3.
- Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, et al. (2000). A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(11): 3061-68.
- Bonnet R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1-14.
- Bradford PA. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-51.
- Brooks Gf, Carroll Kc, Butel Js, Morse Sa (2010). Jawetz, Melnick ve Adelberg's Tıbbi Mikrobiyoloji. 24. Baskı. Çeviri Editörü: Yenen OŞ, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul, 253-4.
- Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, et al. (2004). Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2344-45.
- Chen YT, Shu HY, Li LH, et al. (2006). Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-kilobase plasmid conferring quinolone resistance and extended-spectrum- β -Lactamase activity in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3861-6. <https://doi.org/10.1128/AAC.00456-06>
- Corkill JE, Anson JJ, Hart CA. (2005). High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:1115-7. <https://doi.org/10.1093/jac/dki388>
- Datta N, Kontomichas P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infective factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* 1965; 208: 239-241.

- Dolapçı, İ., Karahan, Z. C. Mumcuoğlu, İ. Çöloğlu, D. Us, E. Ulusoy, M., Tekeli, A. (2010). Klinik Örneklerden İzole Edilen Karbapeneme Dirençli *Acinetobacter Baumannii* Suşlarında Sınıf 1 İntegron Taşıyıcılığının Araştırılması. Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Downs SM. (1999). Technical Report: urinary tract infections in febrile infants and young children. Pediatrics 1999; 103: 1-60.
- Dündar D, Willke A, Sonmez G. İdrar yolu infeksiyonu etkenleri ve antimikrobiyal duyarlılıkları. *Klinik Derg* 2008; 21:7-11.
- Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., Stratchounski, L. 2003. "Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47, 3724-32.
- Eisenstein BI, Zaleznik DF. (2000). Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000: 2294-2310.
- Elif, S.(2005). Rize İli Ve Çevresinde İçme Sularından İzole Edilen *Escherichia Coli* Suşlarında Aktarılabılır Direnç Ve TEM-TİPİ B- Laktamaz Genlerinin Araştırılması. Karadeniz Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. 2005
- El Zoeiby A, Sanschagrin F, Levesque RC. Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol Microbiol* 2003; 47: 1-12.
- Erdem, B. (1999). Enterobacteriaceae. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji (Ed:Ustaçelebi Ş). Güneş tıp kitabevi, Ankara; 471-515.
- Evans DA, Williams DN, Laughlin LW, et al.(1978). Bacteriuria in a population-based cohort of women. *J Infect Dis.* 1978; 768-773.
- Falagas ME, Kopterides P. (2007). Old antibiotics for infections in critically ill patients. *Curr Opin Crit Care* 2007; 13: 592-7. urinary tract infections. *Drugs* 1997; 53: 637-56.
- Fillgrove KL, Pakhomova S, Newcomer ME, Armstrong RN. Mechanistic diversity of fosfomicin resistance in pathogenic microorganisms. *J Am Chem Soc.* 2003;125(51):15730-1.

- Gales AC, Sader HS, Jones RN. (2002) Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997–2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44(3): 289-299.
- Greenwood D. (2003). Fosfomycin and fosmidomycin, pp: 294-6. In: Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ (eds), *Antibiotic and Chemotherapy*. Churchill Livingstone, Toronto.
- Gür D.(2000). Hastane infeksiyonları ve antimikrobiyal ajanlara çoğul dirençli gram negatif bakteriler. *Hastane İnfeks Derg* 2000; 4: 218-25.
- Hall LM, Livermore DM, Gür D, Akova M, Akalın HE. (1993). OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1637-44.
- Hansson S, Jodal ULF. (1999). Urinary tract infection. In: Barratt TM, Avner ED, Harmon WE (eds). *Pediatric Nephrology*. Lippincott Williams&Wilkins, Baltimore 1999: 835-50.
- Hellerstein S. (1995). Urinary Tract Infection:old and new concepts. *Pediatr Clin North Am* 1995; 42: 1433-57
- Hoberman A, Wald ER, Reynolds EA, et al. (1994). Pyuria and bacteriuria in urine specimens obtained by catheter from young children with fever. *J Pediatr* 1994; 124:513.
- Hoepelman AIM, Meiland R, Geerlings SE. (2003). Pathogenesis and management of bacterial urinary tract infections in adult patients with diabetes mellitus. *Int J Antimicrob Agents*. 2003; 22:35-43.
- Hooton TM, Scholes D, Hughes JP, Winter C, Roberts PL, Stapleton QE, et al. (1996). A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women. *N Engl J Med*. 1996; 335:468-74
- Hooton TM. (2000). Pathogenesis of urinary tract infections; an update. *J Antimicrob Chemother*. 2000; 46(1):1-7.
- Hoşgör M, Coşar G, Ermertcan Ş, Çarıkçı AY. (2000). Üropatojen *Escherichia coli* kökenlerinin bazı virulans özellikleri. *İnfeksiyon Dergisi* 2000;14: 225-228.
- Hou J, Huang X, Deng Y, et al. (2012). Dissemination of the fosfomycin resistance genes *fosA3* with CTX-M β -lactamase genes and *rmtB* carried on IncFII plasmids among

- Escherichia coli* isolates from pets in China. *Antimicrob Agents Ch* 2012;**56**:2135–8.
- J. Jang, H.-G. Hur, M.J. Sadowsky, M.N. Byappanahalli, T. Yan⁵ and S. Ishii. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications a review. Satoshi Ishii, BioTechnology Institute, University of Minnesota, 1479 Gortner Ave., 140 rtner Labs, St. Paul, MN, USA.
- Jack D. Sobel, Donald Kaye. (2010). Urinary Tract Infections: Section D, Chapter 69; Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2010; p:957-985.
- Johnson JR, Scheutz F, Ulleryd P, et al.(2005). Host-pathogen relationships among *Escherichia coli* isolates recovered from men with febrile urinary tract infection. *Clin Infect Dis*.2005; 40:813-822
- Joklik WK. Willet HP, Amos B, Wilferd GM. (1984). Microbiology [18 th ed.]. Prentice-Hall International Inc, 1984: 603-60.
- Jones KV, Asscher AW. (1992). Urinary tract infection and vesicoureteral reflux. In Edelmann CM (ed). Pediatric Kidney Disease Second edition. Volume II Little, Brown and Company. Boston, Toronto, London 1992: 1943-91.
- Karah N. (2008). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in Norwegian and Swedish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. [Master's Thesis in Medical Microbiology] Tromsø, Norveç: Department of Microbiology and Virology Institute of Medical Biology University of Tromsø, 2008.
- Kayser Fh, Bienz Ka, Eckert J, Zinkernagel Rm (2005). Medical Microbiology. Stuttgart, Germany, 292-6.
- Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, et al. (1985). Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chem* 1985; 28 (2): 302- 307.
- Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, et al. (1985). Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chem* 1985; 28 (2): 302- 307.
- Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and ceforoxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11(6): 315-317.

- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. (1999). Enterobacteriaceae, Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology [5th ed.]. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1999: 171-174.
- Köksal İ. (1999). Nozokomiyal üriner sistem infeksiyonlarında tanımlar ve patogenez. Hastane İnfeksiyonları Derg 1999; 3: 65-69.
- Kumar S, Parvathi A, Hernandez RL, Cadle KM, Varela MF. (2009). Identification of a novel UDPN-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) from *Vibrio fischeri* that confers high fosfomycin resistance in *Escherichiacoli*. Arch Microbiol 2009; 191: 425-9.
- Lavilla S, González-López JJ, Sabaté M, et al. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum β -lactamase producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:291-5. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm448>
- Lebessi E, Stamos G, Foustoukou M, et al. (2003). Performance of methods for detection of extended-spectrum beta-lactamases applied to clinical enterobacterial strains producing IBC-type beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 912.
- Livermore DM (1995). Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995;8(4):557-84.
- Livermore DM. (1995). Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4): 557-584. <http://www.lahey.org/studies/web.htm>
- Mamikoğlu L, İnan D. (2010). İdrar yolu enfeksiyonları: Bölüm XVIII; Ayşe Willke, Güner Söyletir, Mehmet Doğanay. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. s:1487-1501. 2010.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, Alberti S, et al. (1996). In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(2): 342-348.
- Mert D. Nonkomplike üriner infeksiyonlu hastalarda fosfomisin trometamol ve siprofloksasinin klinik etkinliğinin karşılaştırılması. T.C. Sağlık Bakanlığı

- Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, 2006.
- Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, et al. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *J American Med Ass* 2003; 289(7): 885–888.
- Nicolas-Chanoine MH. (1997). Inhibitor resistant, beta lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 1-3.
- Nordmann P, Guibert M. (1998). Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 128-31.
- Nordmann P, Ronco E, Naas T, et al. (1993). Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 962-9.
- Norris DL, Young JD. (2008). Urinary tract infections: diagnosis and management in the emergency department. *Emerg Med Clin N Am*. 2008; 26:4133
- Oya PAZARLI, Füsün CÖMERT, Canan KÜLAH, Elif AKTAŞ, Füzünan KÖKTÜRK (2017). Kinolon Dirençli Escherichia Coli Ve Klebsiella Spp. İzolatlarında Direnç Sağlayan Gen Mutasyonlarının Ve Direnç Genlerinin Araştırılması. *Türk Mikrobiyolojisi Cem Dergisi* 47(4). Bülent Ecevir Üniversitesi Tıp Fakültesi. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Zonguldak.
- Panos Gz, Betsı G1, Falagas Me. (2006). Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with Escherichia coli O157:H7 infection?. *Aliment Pharmacol Ther*;24(5): 731-742.
- Paradisi F, Corti G, Mangani V. (1998). Urosepsis in the critical care unit. *Crit Care Clin* 1998; 14: 165-180.
- Patel SS, Balfour JA, Bryson HM. (1997). Fosfomycin tromethamine. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections. *Drugs* 1997; 53: 637-56.
- Paterson DL, Bonomo RA. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 657-86.

- Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel, L. (2005). Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56 (1): 52-59.
- Poirel L, Leviandier C, Nordmann P. (2006). Prevalence and genetic analysis of plasmid mediated quinolone resistance determinants *QnrA* and *QnrS* in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3992-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.00597-06>
- Rice, L.B. et al., 1990. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum beta-lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother*, 34 (11): 2193-9.
- Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, et al. (2006). Fluoroquinolone modifying enzyme: a novel adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; 12:83-8.
- Rozenberg AM, Visser MR. (1999). *Infectious Diseases* [2nd ed.]. London: Mosby Publication, 1999: 1-12.
- Ryan KJ. (1994). *Sherris medical Microbiology*. [First ed.]. Montreal: Prentice-Hall International, 1994: 323-329.
- Salysers AA, Whitt DD. (1994). *Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach*. Washington: ASM Press, 1994: 190-212.
- Sanders CC. (1992). Beta-lactamases of gram-negative bacteria: New challenges for new drugs. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 1089-99.
- Schappert SM. (1999). Ambulatory care visits to physician offices, hospital outpatient departments, and emergency departments. *Vital Health Stat.* 1–39. 1999.
- Sedor J, Mulholland SG. (1999). Hospital-acquired urinary tract infections associated with the indwelling catheter. *Urol Clin North Am.* 1999; 26 (4):821-828.
- Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, et al. (2000). TLA-1: A new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 44: 997–1003.
- Sirot D. (1995). Extended- spectrum plasmid-mediated beta-lactamases, *J Antimicrob Chemother* 1995; 36: 19-34.

- Sobel J.D. and Kaye D. (2015). Urinary Tract Infections, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th Edition., Chapter 74, p:886-913. 2015.
- Somer A. (2010) Antibiyotiklerde direnç sorunu. Türk Ped ArG. 2010;45: 80. Yıl:45-9
- Stapleton A. (2005). Novel mechanism of P-fimbriated *Escherichia coli* virulence in pyelonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:3458-60.
- Sturenburg E, Mack D. (2003). Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect* 2003; 47(4): 273-95.
- Suarez JE, Mendoza MC. Plasmid-encoded fosfomycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(5):791-5.
- Tambyah PA. (2004). Catheter-associated urinary tract infections; diagnosis and prophylaxis. *Int J Antimicrob Agents*. 2004; 24:44-8.
- Vahaboğlu H, Öztürk R, Aygün G, et al.(1997). Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2265-9.
- Velasco M, Horcajada JP, Mensa J, et al. (2001). Decreased invasive capacity of quinolone resistant *Escherichia coli* in patients with urinary tract infections. *Clin Infect Dis*. 2001; 33:1682-1686.
- Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R., (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19: 6823-6831.
- Vila J, Simon K, Ruiz J, et al. (2002). Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? *J Infect Dis*. 2002; 186:1039-1042.
- Wagenlehner FME, Naber KG. (2000). Hospital-acquired urinary tract infections. *J Hosp Infect* 2000; 46: 171-181. 29)
- Weldhagen G, Poirel FL, Nordmann P. (2003). Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2385–92.
- Wettergren B, Jodal U, Jonasson G. (1985). Epidemiology of bacteriuria during the first year of life. *Acta Pediatr Scand* 1985; 74: 925-33.

- Woodyer RD, Shao Z, Thomas PM, Kelleher NL, Blodgett JA, Metcalf WW, et al. Heterologous production of fosfomycin and identification of the minimal biosynthetic gene cluster. *Chem Biol.* 2006;13(11):1171-82.
- Yao JDC, Moellering RC Jr. Antibacterial agents, pp: 1077-113. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2007, 9th ed. ASM Press, Washington, DC.
- Yücesoy M, Yuluğ N, Kocagöz S, et al. (2000). Surveillance of antimicrobial resistance among Gram-negative isolates from intensive care units in 8 hospital in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45 (5): 695-699.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı soyadı	Funda YAĞ
Doğum yeri	
Doğum tarihi	
Uyruğu	
Telefon numarası	
E-posta	

Eğitim bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Ankara Üniversitesi
Fakülte	Sağlık Bilimleri Fakültesi
Bölüm	Hemşirelik
Mezuniyet Yılı	2012

Yüksek lisans	
Üniversite	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Enstitü Adı	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Tıp
Programı	Moleküler Tıp
Mezuniyet Tarihi	2021

Makale ve bildiriler
<i>Uluslararası Hekimli Dergilerde Makaleler</i> Ülken Tunga BABAOĞLU, Fikriye Milletli SEZGİN, Funda YAĞ (2019). Sick Building Symptoms Among Hospital Workers Associated With Indoor Air Quality And Personal Factors. <i>Uluslararası Konferans Ve Sempozyumlar</i> Funda YAĞ, Fikriye Milletli SEZGİN (2020). Üriner Sistem İdrar Yolu Enfeksiyon Ketkeni E. coli İzolatlarında Fosfomisin Direnç Genlerinin Molekiler Karakterizasyonu, 5th international Gevher nesibe health sciences congress, 25-25 Nisan 2020 ankara.