



**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA
LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEN ve
ÜRETMEYEN EKSTRA İNTESTİNAL
PATOJENİK *Escherichia coli* SUŞLARINDA
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU, *fimH*
GENOTİPLEMESİ ve FİLOGENETİK
GRUPLAMASI**

Aevan ASHRAF KHORSHED

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

**Aralık-2016
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Aevar ASHRAF KHORSHED tarafından hazırlanan “Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Üreten Ve Üretmeyen Ekstra İntestinal Patojenik *Escherichia coli* suşlarının Moleküler Karakterizasyonu, *fimH* genotiplemesi ve Filogenetik Gruplaması.” adlı tez çalışması 9/12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof.Dr. Leyla AÇIK

Danışman

Doç.Dr. Emine ARSLAN

Üye

Prof.Dr. Uçkun Sait UÇAN

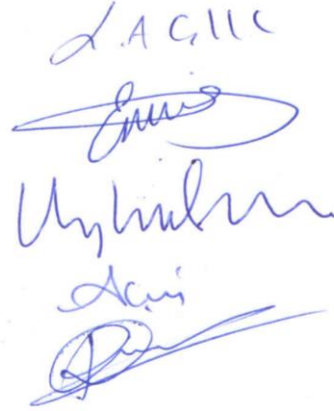
Üye

Doç.Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

Üye

Doç.Dr. Rüstem DUMAN

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) tarafından 15201009 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.



Aevan ASHRAF KHORSHEED

Tarih: 9/12/2016

ÖZET

DOKTORA TEZİ

GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEN VE ÜRETMEYEN EKSTRA İNTESTİNAL PATOJENİK *Escherichia coli* SUŞLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU, *fimH* GENOTİPLEMESİ VE FİLOGENETİK GRUPLAMASI

Aevar ASHRAF KHORSHEED
Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emine ARSLAN
2016, 99 Sayfa

Jüri
Doç.Dr. Emine ARSLAN
Prof.Dr. Leyla AÇIK
Prof.Dr. Uçkun Sait UÇAN
Doç.Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN
Doç.Dr. Rüstem DUMAN

Escherichia coli (*E. coli*) en yaygın çalışılan gram negatif bakterilerden biridir. Bu tür hem insanda hem de çoğu hayvanda intestinal ve ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olmaktadır. Hastane ve toplum kökenli enfeksiyonlarda etken olarak önemli rol oynayan Gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç giderek artmaktadır. Bu direncin en sık nedenlerinden biri de beta-laktamaz (GSBL) enzim üretimidir. Toplum kökenli enfeksiyonların çoğunluğunu da GSBL pozitif *E. coli*'nin etken olduğu üriner sistem enfeksiyonları oluşturmaktadır. Bu çalışmada Konya bölgesindeki hastanelerdeki klinik materyallerden izole edilen 106 GSBL üreten ve üretmeyen ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) suşlarının hem fenotipik olarak hem de genotipik olarak karakterizasyonu, antibiyotik duyarlılıkları, filogenetik gruplarının belirlenmesi ve patojenin kolonizasyonunu sağlayan adeziyon genlerinden *fimH* geninin genotiplemesi amaçlanmıştır. Çift disk sinerji yöntemi ile fenotipik GSBL'ler belirlenirken *blaTEM*, *blaCTX-M*, *blaOXA*, *blaSHV* genlerinin multipleks PZR ile varlığına dayanarak genotipik GSBL'ler tesbit edilmiştir. Filogenetik gruplama *chuA*, *yjaA* ve *TspE4C2* markır genlerinin multipleks PZR'ı ile yapılmıştır. *fimH* genotiplemede PZR ile genin varlığı belirlenerek dizi analizi yapılmıştır. Çalışılan 106 *E. coli* izolatının 22'si fenotipik, 70'i genotipik olarak GSBL pozitif olduğu belirlenmiştir. Antibiyotik duyarlılık testine göre suşlar en çok imipenem (% 99.05) ve piperasilin/tazobaktam'a (% 100) duyarlı iken, en yüksek oranda ampisiline (% 61.32) ve klindamisin'e (% 100) dirençlidirler. Hem GSBL üretenlerde hem de GSBL üretmeyenlerde çoğunun B2 filogenetik grubunda, en azının ise B1 grubunda olduğu görülmüştür. Çalışılan toplam 106 ExPEC izolatlarının 95'inde (% 89.62), üropatojenik *E. coli* (UPEC)'lerin (%90.32) *fimH* varlığı tesbit edilmiştir. Bu sonuçlar basit, hızlı moleküler tekniklerin *E. coli*'lerin etkili tedavisinde ve aşı geliştirme çalışmalarında kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: ExPEC, GSBL, filogruplar, *fimH* genotipleme, multipleks PZR.

ABSTRACT

Ph.D THESIS

MOLECULAR CHARACTERIZATION, *fimH* GENOTYPING AND PHYLOGENETIC GROUPING OF EXTEND SPECTRUM BETA LACTAMASE (ESBL) PRODUCING AND NON PRODUCING EXTRA INTESTINAL PATHOGENIC *Escherichia coli* (EXPEC).

Aevan ASHRAF KHORSHED
THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED OR SCIENCES OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR OF BIOLOGY

Advisor: Doç. Dr. Emine ARSLAN
2016, 99 Pages

Jury

Assoc.Prof.Dr. Emine ARSLAN
Prof.Dr. Leyla AÇIK
Prof.Dr. Uçkun Sait UÇAN
Assoc.Prof.Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN
Assoc.Prof.Dr. Rüstem DUMAN

Escherichia coli (*E. coli*) is one of the most commonly studied gram-negative bacteria. This type of infection is caused both intestinal and extraintestinal infections, both in humans and most animals. Resistance to antibiotics is gradually increasing in Gram-negative bacteria, which play an important role in infections stemmed from hospital and community. One of the most common causes of this resistance is beta-lactamase (ESBL) enzyme production. The majority of community-acquired infections are caused by urinary tract infections, which are caused by ESBL-positive *E. coli*. In this study, it is aimed to identify genotypically the phimotheimic and genotypic characterization of 106 ESBL producing and non-producing extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains isolated from the clinical materials in hospitals in Konya region by determining phylogenetic groups and pathogen colonization. When phenotypic ESBLs are being identified by double disk synergy method, based on the presence of the *blaTEM*, *blaCTX-M*, *blaOXA*, *blaSHV* genes by multiplex PCR, genotypic ESBLs have been identified. Phylogenetic grouping was performed by multiplex PCR of *chuA*, *yjaA* and *TspE4C2* marker genes. In *fimH* genotype, sequence analysis was performed by determining the presence of the gene by PCR. Among the 106 *E. coli* isolates that were studies, 22 were phenotypic, 70 were genotypically determined to be ESBL positive. According to the antibiotic susceptibility test, strains were most susceptible to imipenem (99.05%) and piperacillin / tazobactam (100%) but mostly resistant to ampicillin (61.32%) and clindamycin (100%) resistance. Most ESBL producers and non-ESBL producers were found to be in the B2 phylogenetic group and the least in the B1 group. In 95 of total 106 ExPEC isolates tested (89.62%) the presence of uropathogenic *E. coli* (UPEC) (90.32%) *fimH* was detected. These results have shown that simple, rapid molecular techniques can be used in the effective treatment of *E. coli* and vaccine development studies.

Keywords: ExPEC, ESBL, Phylogroups, *fimH* genotyping, multiplex PCR.

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım süresince değerli vaktini ve bilimsel desteğini esirgemeyen değerli hocam tez danışmanım Doç.Dr. Emine ARSLAN'a, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nın olanaklarından faydalanmamı sağlayan Prof. Dr. Osman ERGANİŞ hocama, doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Prof. Dr. Uçkun Sait UÇAN hocama, tez şekillerimin düzenlenmesin yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Atilla ARSLAN'a, dizi analizi değerlendirilmesinde yardımcı olan Dr. Elif GÜLBAHÇE MUTLU arkadaşşıma, bakterilerin identifikasyonunda yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Zafer SAYIN, Yrd. Doç. Dr. Aslı SAKMANOĞLU ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili annem Sacide CİHAD ve babam Eşref HORŞİT, kardeşim Elif EŞREF, canım eşim Mueyet TÜRKMEN, çok değerli arkadaşlarım Merve KILIÇ, İlkyaz YILMAZ, Emine Gülsün CAN, Zeynep BAYRAKTAR, Jehan KHUDHUR, Sümeyye KILIÇ ve Sinem AKKAYA'ya çok teşekkür ederim.

Ayrıca doktora tez çalışmamı 15201009 nolu tez projesi ile destekleyen S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Aevar ASHRAF KHORSHED
KONYA-2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
ÖNSÖZ	3
1. GİRİŞ.....	8
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	11
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	11
2.2. <i>Escherichia coli</i>	11
2.3. Beta-Laktamazların Genel Özellikleri	12
2.3.1. Beta-laktamazların sentezi.....	13
2.3.2. Beta laktamazların hücredeki yeri	13
2.3.3. Beta-laktamazların antibiyotikler üzerinde etki mekanizması.....	13
2.4. Beta-Laktamazların Sınıflandırılması:.....	14
2.5. Beta-Laktamazların İsimlendirilmesi:	16
2.6. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Genel Özellikleri	17
2.6.1. GSBL tipleri.....	18
2.6.1.1. TEM tipi.....	18
2.6.1.2. SHV tipi	19
2.6.1.3. CTX-M tipi	19
2.6.1.4. OXA tipi	20
2.6.1.5. Diğer GSBL'ler	21
2.6.2. GSBL'lerin tanı yöntemleri	22
2.6.2.1. GSBL tarama testleri.....	22
2.6.2.2. Doğrulama testleri.....	23
2.6.2.2.1. Kombine disk yöntemi.....	23
2.6.2.2.2. Çift disk sinerji yöntemi.....	24
2.6.2.2.3. E-test yöntemi.....	25
2.6.2.3. Moleküler yöntemler.....	25
2.6.3. GSBL'lerin epidemiyolojisi ve prevalansı	26
2.6.4. GSBL sentezleyen bakterilerin klinikte neden olduğu sorunlar	29
2.6.4.1. Direnç.....	29
2.6.4.2. Kolonizasyonu.....	29
2.6.4.3. Laboratuvarı GSBL saptanmasında zorluklar.....	30
2.6.4.4. Morbidite ve mortalite.....	30
2.6.5. GSBL taşıyan bakterilerin tedavisinde kullanılacak antibiyotikler	30
2.6.5.1. Pensillinler.....	31
2.6.5.2. Sefalosporinler.....	33
2.6.5.3. Monobaktamlar.....	34
2.6.5.4. Karbapenemler.....	35
2.7. Beta-Laktam Antibiyotikler	35
2.8. Beta-Laktam/Beta-Laktamaz İnhibitör Kombinasyonları	36
2.9. Beta-Laktam Ajanlara Direnç Mekanizmaları.....	36

2.9.1 Antibiyotikleri inaktive eden beta-laktamazların üretimi.....	36
2.9.2. Hedef PBP moleküllerde değişiklik.....	37
2.9.3. Antibiyotiğin hücre içine ulaşmasının engellenmesi.....	37
2.10. Plazmid Aracılı Beta-Laktamazlar.....	37
2.10.1. Üriner sistem enfeksiyonları.....	38
2.10.2. <i>E. coli</i> 'nin virülans faktörleri.....	39
2.11. <i>E. coli</i> 'de Bakteriyel Adezinler ve <i>fimH</i> Geni.....	40
2.12. <i>E. coli</i> 'de Filogenetik Graplama.....	43
3. MATERYAL VE METOT.....	45
3. 1. Materyal.....	45
3.1.1. Kimyasal maddeler ve besiyerleri.....	45
3.1.1.1. MacConkey agar.....	45
3.1.1.2. Mueller-Hinton agar (MHA).....	45
3.1.1.3. Brain-Heart infusion broth.....	46
3.1.2. Tamponlar ve çözeltiler.....	46
3.1.2.1. TAE-tampon (50X): Agaroz jel elektroforez için kullanıldı.....	46
3.1.2.2. Loading tampon (5X): Agaroz jel elektroforez için kullanıldı.....	46
3.1.2.3. EDTA 0.5M (pH8).....	46
3.1.2.4. Sodium chloride (3M).....	46
3.1.3. Kullanılan antibiyotikler.....	47
3.1.4. Elektroforez için kullanılan çözeltiler ve kimyasallar.....	47
3.1.5. Kullanılan diğer gereçler.....	47
3.2. Metot.....	47
3.2.1. Klinik örneklerden izole edilen <i>E. coli</i> izolatlarının tanımlanması.....	47
3.2.2. Bakteri örneklerinin MacConkey agar plak besiyerine ekimi.....	48
3.2.3. Biyokimyasal testler.....	48
3.2.3.1. Üç şeker besiyerine ekim.....	48
3.2.3.2. İMVİC testleri.....	49
3.2.3.2.1. İndol testi.....	49
3.2.3.2.2. Voges-proskauer testi.....	49
3.2.3.2.3. Metil kırmızı testi.....	49
3.2.3.2.3. Sitrat testi.....	50
3.2.3.4. Üreaz testi.....	50
3.2.3.5. Hareket testi.....	50
3.2.4. GSBL'lerin belirlenmesi için çift disk sinerji yöntemi.....	51
3.2.5. <i>E. coli</i> İzolatlarının antibiyotik duyarlılık testi.....	51
3.2.6. <i>E. coli</i> İzolatlarının DNA izolasyonu.....	52
3.2.7. <i>E. coli</i> izolatlarının multipleks PZR ile GSBL genlerinin belirlenmesi.....	52
3.2.8. <i>E. coli</i> İzolatlarının filogenetik gramlamasının belirlenmesi.....	53
3.2.9. <i>fimH</i> geninin PZR ile belirlenmesi.....	54
3.2.10. <i>fimH</i> geninin dizi analizi.....	55
3.2.11. <i>fimH</i> geninin dizi analizine göre filogenetik ağacın elde edilmesi.....	55
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	55
4.1. <i>E. coli</i> İzolatların Toplanması.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.2. <i>E. coli</i> İzolatlarının İdentifikasyonu.....	56
4.3. <i>E. coli</i> İzolatlarında GSBL Üretenlerin Fenotipik Olarak Belirlenmesi.....	56

4.4. <i>E. coli</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları	58
4.5. <i>E. coli</i> İzolatlarında GSBL üretenlerin Genotipik Olarak Belirlenmesi	61
4.6. GSBL Üreten Olan <i>E. coli</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları	65
4.7. <i>E. coli</i> İzolatlarının Çoklu Antibiyotik Direnç İndeksi (MAR İndeksi)	66
4.8. <i>E. coli</i> İzolatlarının Multipleks PZR ile Filogenetik Gruplama Sonuçları	67
4.9. <i>E. coli</i> İzolatlarında <i>fimH</i> Geninin Belirlenmesi Sonuçları	70
4.10. <i>E. coli</i> İzolatlarının <i>fimH</i> Geninin Dizi Analizi.....	70
4.11. <i>fimH</i> Geninin Dizi Analizine Göre Filogenetik Ağacının Elde Edilmesi.....	72
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	79
5.1. Sonuçlar.....	79

SİMGE VE KISALTMALAR

Simjeler

cm: Santimetre
g: Gram
m: Mililitre
µg: Mikrogram
°C: Santigrat Derece

Kısaltmalar

AMC: Amoksisilin+klavulanik asit
AMP: Ampisilin
ATCC: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATM: Aztreonam
CAZ: Seftazidim
CIP: Siprofloksasin
CN: Gentamisin
CRO: Seftriakson
CTX: Sefotaksim
CXM: Sefuroksim
ÇDS: Çift disk sinerji
DNA: Deoksiribo nükleik asit
dNTP: Deoksi nükleozid trifosfat
EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit
EIEC: Entero invaziv E.coli
ERIC: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
ETEC: Enterohemorajik E.coli
FEP: Sefepim
FOX: Sefoksitin
GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
MHA: Mueller Hinton agar
MİK: Minimal inhibisyon konsantrasyonu
NaCl: Sodyum Klorür
NaOH: Sodyum Hidroksit
NCCLS: National Committee of Control for Laboratory Standarts
OFX: Ofloksasin
OMP: Dış membran proteini
PBP: Penisilin bağlayan protein
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu
PZR-RFLP: Polimeraz zincir reaksiyonu- restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
R: Dirençli
S: Duyarlı
TAE: Tris asetik asit
TBE: Tris borik asit
TE tampon: Tris-EDTA tamponu

1. GİRİŞ

Enterobacteriaceae familyası, gram negatif olan, flajella ile hareketli veya hareketsiz, fakültatif anaerob, sporsuz kısa veya uzun, MacConkey ve Eozin metilen mavisi agarda 37°C'de aerobik şartlar altında iyi üreyen basilleri içermektedir (Nataro ve Kaper, 1998). *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Serratia*, *Morganella*, *Providencia* bu familyada yer alan başlıca cinslerdir (Irving ve ark., 2005; Ahmed, 2012).

Escherichia coli (*E. coli*), *Enterobacteriaceae* familyası içerisinde yer almaktadır. *E. coli* en yaygın çalışılan gram negatif bakterilerden biridir. Hem insanda hem de çoğu hayvanda intestinal ve ekstraintestinal enfeksiyonlarda etken olarak önemli rol oynayan *E. coli*'nin antibiyotiklere karşı direnci giderek artmaktadır (Kaper ve ark., 2004; Toval ve ark., 2014). Bu direncin en sık nedenlerinden biri de beta-laktamaz enzim üretimidir (Ögedey ve ark., 2016). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ilk kez *Klebsiella* türlerinde 1980'lerde tanımlanmış ve daha sonra da *E. coli* ve diğer *Enterobacteriaceae* ailesinin cinslerinde de tespit edilmiştir. GSBL enzimleri penisilinler, sefalosporinler ve monobaktamları hidroliz etme yeteneğine sahiptir (Bali ve ark., 2010; Kaftandzieva ve ark., 2011). GSBL enzimleri sefamisinler ve karbapenemler dışında, tüm sefalosporinlere ve aztreonama direnç kazandırır ve klavulanik asit tarafından inhibe edilirler (Kapil, 2005; Chandra ve ark., 2014).

GSBL genlerindeki mutasyonlar yeni enzimlerin gelişmesine neden olmaktadır. Yakın zamana kadar 300'den fazla farklı GSBL varyantlarının olduğu bilinmektedir. TEM (Temoniera) ve SHV (sülfidril değişken) GSBL'nin ana tipleridir. Ancak CTX-M (sefotaksimi hidroliz eden) tipi giderek önem kazanmaktadır (Lal ve ark., 2007; Kaftandzieva ve ark., 2011). Son yıllarda yapılan çalışmalar CTX-M tipinin GSBL'lerin *Enterobacteriaceae*'nin çeşitli üyeleri arasında en sık görülen GSBL tipi olarak Avrupa, Kanada ve Asya'da TEM ve SHV-tipi GSBL'lerin yerini aldığını göstermiştir (Canton ve Coque, 2006; Chandramohana ve Revella, 2012). Şimdi 90'dan fazla farklı enzim içeren CTX-M beta-laktamazlar CTX-M-1, -2, -8, -9 ve -25 gruplarını içeren amino asit farklılıklarına dayanarak beş grupta sınıflandırılmaktadır (Shahid ve ark., 2011; Chandramohana ve Revella, 2012). CTX-M enzimlerinin bazıları spesifik coğrafik dağılım göstermektedir. CTX-M-15 dünyada en yaygın bulunan enzim olmasına karşın CTX-M-9 ve CTX-M-14 enzimleri İspanya ve Kuzey Amerika'da, CTX-M-1 İtalya'da dağılım göstermektedir ve bu enzimlerin hastane salgınlarına sebep olduğu rapor

edilmiştir (Livermore ve ark., 2007; Pitout, 2010; Chandramohana ve Revella, 2012; Lascols ve ark., 2012). TEM ve SHV enzimlerinden türemiş varyantlar "klasik GSBL'ler" olarak tanımlanmaktadır. Daha geniş direnç kazandıran çeşitli betalaktamazlardan OXA-tipleri, Oksiminino-sefalosporinlere karşı artan aktiviteleri ile GSBL'lerin önemini artırmaktadır (Lee ve ark., 2010; Kaftandzieva ve ark., 2011).

E. coli'ler klinik ve genetik karakterlerine göre kommensal ve patojenik suşlar olmak üzere 2 grup altında sınıflandırılmaktadır. Patojenik suşlar, intestinal patojenik ve ekstraintestinal patojenik suşlar olmak üzere 2 alt bölüme ayrılmaktadır. *E. coli*'nin intestinal patojenik suşları, sağlıklı konakların barsak florasında nadir olarak bulunmaktadır. Virulans faktörlerinin isimlerine göre enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), diffüz adherent *E. coli* (DAEC) ve enteroinvazif *E. coli* (EIEC) olmak üzere intestinal patojenik gruplar 6 farklı patojenik sınıfta tanımlanmıştır. Ekstraintestinal patojenik *E. coli* suşları (ExPEC), intestinal hastalıklara sebep olmazlar. Ancak sağlıklı konakçılarda %20'sinde diğer suşlara baskın ve barsakta kolonize olabilmektedir. Enfeksiyon için, idrar yolu gibi ekstraintestinal anatomik siteye giriş önemli bir ön koşuldur (Russo ve Johnson, 2000; Ahmed, 2012). Hem insanlarda hem de hayvanlarda enfeksiyona neden olan ExPEC'ler, idrar yolu enfeksiyonuna neden olan üropatojenik *E. coli* (UPEC), yenidoğan meninjitik *E. coli* (NMEC), sepsis ilişkili *E. coli* (SePEC) ve kuşlarda hastalığa neden olan kuş patojenik *E. coli* (APEC) olarak sınıflandırılmaktadırlar (Antao ve ark., 2009).

E. coli suşlarının filogenetik gruplaması için chuA, yjaA ve TspE₄C₂ isimli 3 spesifik markının bir multipleks PZR ile belirlenmesine dayanan basit ve hızlı bir teknik geliştirilmiştir. Bu sayede filogenetik analizler, filogeni ve virulans arasındaki bir ilişki varlığına dayanarak *E. coli* suşlarını A, B1, B2 ve D olmak üzere 4 ana filogenetik grup altında toplamıştır. Virulent ekstraintestinal suşlar B2 ve daha azı D filogenetik grubunda yer alırken çoğu kommensal suşlar A ve B1 gruplarına dahil olmuştur (Desjardins ve ark., 1995; Ahmed, 2012).

E. coli'nin filogenetik tiplerini belirlemek, GSBL'lerin tipleri arasındaki genetik olarak akrabalığın varlığını gösterdiği için büyük epidemiyolojik öneme sahiptir. CTX-M tipinin D filogenetik grup suşları ile ilişkili olduğu, SHV ve daha az TEM tiplerini B2 filogenetik suşlar içinde bulunmuştur (Branger ve ark., 2005; Ahmed, 2012).

Klinik materyallerden izole edilen ExPEC suşları farklı virulans faktörlerin kombinasyonlarını taşımaktadırlar. ExPEC suşları, iki ya da daha fazla virulans geni

içermektedirler (Johnson ve ark., 2003). Bu genler; P fimbriya (papa ve / veya papC P fimbriya montaj), S/F1C fimbriya alt birimleri (SFA / foc), Dr-antijen bağlanma adhezinleri (afa / dra), grup 2 kapsüler polisakkarit birimleri (kpsMT II) ve aerobaktin reseptörü (iutA)'dür (Johnson ve ark., 2005; Abdallah ve ark., 2011). *fimH*, bakterinin hedef hücreye bağlanması için mannoz duyarlı belirteçlere sahip tip 1 fimbriyanın ucunda bulunan spesifik bir adezindir (Srinivas ve ark., 2010; Abdallah ve ark., 2011). Tip 1 piluslar *E. coli* enfeksiyonlarında özellikle UPEC enfeksiyonlarında, bağlanma medyatörleri olarak önemli rol oynamaktadırlar (Langermann ve ark., 1997; Antao ve ark., 2009). *fimH*'ın tip 1 fimbriyada mannoz-spesifik veya reseptörüne özgü adezinden sorumlu gen olduğu bulunmuştur (Krogfelt ve ark., 1990; Antao ve ark., 2009). Moleküler evrim çalışmaları UPEC'lerde *fimH*'ın mesane epitel hücrelerindeki monomannoz reseptörlerine bağlandığını göstermiştir (Weissman ve ark., 2006; Antao ve ark., 2009). İdrar yolu enfeksiyonu kaynaklı klinik izolatlarda, mesane kolonizasyonu için adaptif olan trimannoz reseptörleri kadar monomannoz da bağlanabilen *fimH* varyantı daha yaygın olarak ifade edilmektedirler. Bunun tersine kommensal suşlarda *fimH* varyantı sadece trimannoz reseptörlerini tanımaktadır ve ifade edilmektedir. Bu örnekler ExPEC'lerin virulansının iyi anlaşılmasında, virulans genlerin basit tanımlanmasından daha fazlasını gerektireceği için *fimH* varyantlarının çalışılması önemli olacaktır (Sokurenko ve ark., 1998; Johnson ve Russo, 2002). PZR ile filogenetik gruplama ve *fimH* SNP analizinin kombinasyonunun epidemiyolojik çalışmalar için klinik *E. coli* suşlarının tiplendirilmesinde için faydalı bir metot olabileceği vurgulanmıştır (Rubens ve ark., 2010; Abdallah ve ark., 2011).

GSBL'ler Gram negatif bakterilerde beta-laktam direncinin en önemli sebebidir. GSBL üreten bakteriler, hastanelerde salgınlar oluşturabilmekte, tedavilerin yetersiz kalmasına, hastaların hastanede yatış sürelerinin uzamasına ve ölüm oranlarının yükselmesine yol açabilmektedir. Bu çalışmada Konya bölgesindeki Numune, Beyhekim ve Konya Araştırma hastanelerindeki mikrobiyoloji laboratuvarlarında, hastane ve toplum kökenli enfeksiyonlara ait klinik materyallerden izole edilen GSBL üreten ve üretmeyen ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) suşlarının GSBL genlerinin moleküler karakterizasyonu, patojenin kolonizasyonunu sağlayan adezyon genlerinden *fimH*'ın genotiplendirilmesi ve ExPEC'lerin filogenetik gruplarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae familyası üyeleri fakültatif anaerop veya aeroptur, çok çeşitli karbohidratları fermente eder, karmaşık bir antijenik yapı gösterir ve çeşitli toksin ve diğer virülans faktörlerini üretirler (Jawetz ve ark., 2010).

Enterobacteriaceae kısa, enterik Gram negatif basillerdir, peritrih kirpikler var ise hareketli veya hareketsizdirler, sodyum klorür veya başka bir madde eklenmeden pepton veya et özütü besiyerinde ürerler, MacConkey agarda iyi ürerler, glikozu oksidasyondan çok fermente ederler ve çoğunlukla gaz oluştururlar, katalaz pozitifler, oksidaz negatiftirler, nitrati nitrite dönüştürürler ve %39-59 G+C DNA içeriğine sahiptirler (Jawetz ve ark., 2010). Bu ailedeki bakterilerin birçoğu insan ve hayvanların barsak dışı floralarında, bitkilerde, toprakta, suda bulunurlar. (Irving ve ark., 2005; Ahmed, 2012).

2.2. *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olan *E. coli*, MacConkey ve eozin metilen mavisi agar (EMB) gibi zenginleştirilmemiş besiyerlerinde fakültatif anaerop olarak ürerler. *E. coli*'nin indol, lizin dekarboksilaz ve mannitol fermentasyon testleri pozitif ve glikozdan gaz oluştururlar (Nataro ve Kaper, 1998; Ahmed, 2012).

İnsanın bir günde dışkı yoluyla vücudundan geçen *E. coli* bakteri sayısı 100 milyar ile 10 trilyon arasındadır. Dışkıyı oluşturan bakteriler başlıca anaerobik bakterilerdir, fakültatif anerobik *E. coli* hücrelerinin sayısı diğer bakteri türlerinin binde biri kadardır. Başka hayvanlarda etkisiz olan bazı *E. coli* tipleri insana bulaştıklarında hastalık yapabilirler. Bunların en iyi bilineni O157:H7 adlı serotip kanlı ishale ve ölüme yol açabilir. *E. coli*, normal bağırsak florasına aittir, biyolojik sınıflandırmada da bağırsaklarda yaşayan bakterilerden oluşan enterik bakteriler ailesinde yer alır. Bakteri çubuk şeklinde olup, boyutları 1-2 µm uzunluğunda ve 0.1-0.5 µm çapındadır. *E. coli* Gram-negatif bir bakteri olduğundan endospor oluşturmaz, pastörizasyon veya kaynatma ile ölür. Memeli hayvanların bağırsaklarında büyümeye adapte olmuş olduğu için en iyi vücut sıcaklığında çoğalır (Jawetz ve ark., 2010).

E. coli, pediyatrict ve bakteriyolog olan Theodor *Escherich* tarafından bebek dışkılarında keşfedilmiştir ve adını ondan alır; *coli*, "kalın bağırsaktan" demektir. *E. coli*, genel olarak bakteri biyolojisinin anlaşılması amacıyla üzerinde sıkça çalışılmış bir model organizma olmuştur (Feng ve ark., 2002; Ahmed, 2012).

E. coli oldukça dirençli bir bakteri olup, 60°C ısıda 30 dakika, oda ısısında uygun ortamda olmak koşulu ile uzun süre canlı kalabilir. 80°C ye kadar olan ısılarda da canlılığını koruyabilir (Bilgehan, 2000).

İshalli hastalıklara neden olan *E. coli* tipleri 6 farklı patojenik sınıfta identifiye edilmiştir; enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC). UPEC idrar yolu enfeksiyonlarının %90'ının nedenidir. Bu *E. coli* tipleri idrar yolu epitel hücrelerine özellikle bağlanabilen fimbriumlara sahiptir. Kadınların üretrasının erkeklerinkinden daha kısa olması nedeniyle bu enfeksiyon kadınlarda daha sıkça görülür. Dışkıdan gelen bakteri genelde cinsel ilişki sonucu idrar yoluna bulaşır ve üretrayı aşarak mesaneye ulaşırlar. Mesane enfeksiyonuna sistit denir, tedavi edilmediğinde böbrek yangısına (piyelonefrit) dönüşebilir (Russo ve Johnson, 2000; Ahmed, 2012).

2.3. Beta-Laktamazların Genel Özellikleri

Beta laktamaz enzimlerin hepsindeki ortak özellik özgül oldukları beta-laktam antibiyotikleri hidrolize uğratarak inaktive etmeleridir. Gram negatif bakterilerde beta-laktamaz üretimi beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç sağlamada kullandıkları en önemli mekanizmadır (Bush ve Jacoby, 2010). Bakterilerin antimikrobik ilaçlara karşı gösterdiği dirençte en sık kullandıkları mekanizmalardan birisi, sentezlenen enzimler ile ilacın inaktive edilmesidir. Beta-laktam grubu antibiyotikleri hidroliz eden Beta-laktamaz enzimleri bu tip dirence en iyi örnektir (Livermore, 1995; Gür, 2002). Beta-laktamazlar arasında, TEM ve SHV grubu enzimler, mikrobiyoloji laboratuvarlarında sık soyutlanan türlerde yaygın olmaları ve plazmidlerce taşınmaları nedeniyle klinik önem açısından ön planda jelmektedir (Jacoby, 1994; Livermore, 1995; Yuluğ, 1997). Bu enzimler moleküler sınıf C (AmpC; Grup1)'de yer alırlar. Bu enzimlerin bir kısmı indüklenbilir niteliktedir. İndüklenbilir sefalosporinazların bulunduğu türler arasında *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia spp*, *Pseudomonas aeruginosa* sayılabilir. Bu türlerde, sıklıkları az olduğu için rutin duyarlılık testleri ile saptanamayan

sürekli ve yüksek düzeyde enzim üretebilen (stabil dereprese) mutantlar görülmektedir (Livermore, 1995).

2.3.1. Beta-laktamazların sentezi

Beta-laktamazlar kromozomal genlere veya plazmidlere bağlı olarak sentezlenebilirler. Plazmidler antimikrobiyal direncin dağılmasında en önemli nedenlerinden biridir. Gram negatif bakteriler arasında plazmidler konjugasyon, Gram pozitif bakteriler arasındaysa transdüksiyon ile yayılabilmektedirler (Bush, 2000; Spahi, 2006). *E. coli*'deki enzim sentezi yapılıdır ve miktarı, dar spektrumlu sefalosporinlere direnç oluşturmayacak kadar düşük düzeydedir. Buna karşın, *E. coli* izolatlarının %2'sinde AmpC enzimlerinin aşırı sentezi sonucu yüksek düzeyde direnç oluşabilmektedir (Livermore, 1995; Gür, 2002).

2.3.2. Beta laktamazların hücredeki yeri

Beta-laktamazlar Gram pozitif bakterilerde ekzoenzimler olarak hücre membranından dışarıya salgılanırlar ve bu yüzden ilaç inaktivasyonu için lazım olan enzim miktarı fazladır. Gram negatif bakterilerde ise enzim periplazmik yüzeyde bulunur ve bu yüzden az miktarda enzim bile, antibiyotiklerin sitoplazmik membrana bağlı penisilin bağlayan proteinlere ulaşmalarından önce etkisiz hale getirilmesine neden olur (Tanır ve Göl, 1999; Gür, 2002; Akman, 2008)

2.3.3. Beta-laktamazların antibiyotikler üzerinde etki mekanizması

Beta-laktam ajanlar hücre duvar sentezinin transpeptidasyon basamağında görev alan transpeptidaz ve karboksipeptidazlara PBP (Penisilin Bağlayan Proteinler) bağlanarak etki ederler (Jawetz, 1987; Chambers, 2000; Gülay, 2003). Bu bağlanmayı takiben enzim tarafından inhibitör parçalanır. Bundan dolayı biyokimyasal olarak "intihar inhibitörleri" sınıfında yer alırlar. Bu parçalanmadan sonra meydana gelen reaktif gruplar vastasıyla enzim ve inhibitör arasında kovalan tipte bir bağlanma ortaya çıkar ve bu son geri dönüşümsüz (irreversible) olup, bu yüzden beta-laktamaz inaktif hale gelirler (Bush ve Sykes, 1983; Akova, 1992).

Beta-laktam antibiyotiklerin hedeflerine bağlanmaları ve etkinlik göstermeleri için Gram negatif bakterilerde porin (Outer Membrane Protein; OMP) adı verilen içi su dolu protein kanalcıklarından geçmeleri, sitoplazma zarı ile dış zar arasındaki periplazmik boşlukta yer alan beta-laktamazlardan etkilenmemeleri gerekmektedir (Özsoy ve ark., 2001). Gram negatif bakteriler beta- laktam antibiyotiklere karşı başlıca üç şekilde direnç geliştirirler.

Beta-laktam antibiyotikleri parçalayan beta laktamaz enzimlerinin sentezlenmesi, dış membrandan geçmek için gereken kanalların daralması ve bazı kanalların sayılarının azalması, Beta-laktam antibiyotiklerin bağlanarak etkilerini gösterdikleri PBP (Penisilin bağlayan protein) yapısında değişiklik yaparak antibiyotiğin bağlanmasının enjellenmesi, Beta-laktamazlar, antibiyotikleri hedef bölgesine erişmeden beta-laktam halkasını hidrolize ederek etkisiz hale getirirler (Kfoury ve Araj, 2003).

2.4. Beta-Laktamazların Sınıflandırılması

Beta-laktamazlar en yaygın iki genel şemaya göre sınıflandırılır: a) Ambler moleküler sınıflandırma şeması ve b) Bush, Jacoby ve Medeiros fonksiyonel ikinci sınıflandırma şeması. Ambler şeması beta-laktamazlar, enzimleri kodlayan nükleotid dizilerine göre dört sınıfa ayrılır. A, C ve D sınıfı beta-laktamazlar serin beta-laktamazlar; B sınıfı beta- laktamazlar ise metallo beta-laktamazlar olarak adlandırılır (Ambler, 1980; Bush ve ark., 1995; Aktas ve ark., 2005; Paterson ve Bonomo, 2005). Bu sınıflandırma şeması substrat profilleri ve Beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılık gibi biyokimyasal özellikleri esas kriter alınarak mikrobiyoloji tanı laboratuvarlarında klinik olarak önem taşımaktadır. Bu enzimlerin sayısının artmasına bağlı olarak farklı zamanlarda farklı sınıflandırma şemaları kullanılmıştır. Bugün için en yaygın sınıflama olarak kabul edilmektedir (Çizelge 2. 1) (Bush ve ark., 1995; Paterson ve Bonomo, 2005)

Çizelge 2.1. Beta-laktamazların sınıflandırılması (Bush ve ark., 1995; Ahmed, 2012)

Bush-Jacoby Grubu	Moleküler sınıf	Substrat	CA ve TZB	EDTA	Özellikler
1	C	Sefalosprinler	-	-	Gram negatif bakterilerde bulunan çoğunlukla kromozomal, bazen plazmid kaynaklı Amp-C enzimleri
2a	A	Penisilinler	+	-	Stafilokok ve enterokoklara ait penisilinazlar
2b	A	Penisilinler, Sefalosporinler	+	-	Gram negatif bakterilerde bulunan geniş spektrumlu beta laktamazlar: TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Genişletilmiş-Spektrumlu Sefalosporinler, Monobaktamlar	+	-	GSBL: TEM-3, TEM-26, SHV-2, SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	A	Penisilinler	-	-	İnhibitöre dirençli TEM beta laktamazlar: TEM-30, TEM-36
2c	A	Karbenisilin	+	-	Karbenisilini hidrolize eden enzimler PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Kloksasilin	+/-	-	Kloksasilini hidrolize eden enzimler OXA-1, OXA-11
2e	A	Genişletilmiş-Spektrumlu Sefalosporinler	+	-	<i>Proteus vulgaris</i> 'in indüklenebilir sefalosporinazları
2f	A	Karbapenemler	+/-	-	Karbapenemleri hidrolize eden enzimler <i>Serratia marcescens</i> , Sme-1
3a	B(B1)	Karbapenemler	-	+	Monobaktamlar dışındaki beta laktamazları hidrolize eden metallo beta laktamazlar: <i>S. maltophilia</i> L-1
3b	B(B2)	Karbapenemler	-	+	Karbenisilini hidrolize eden enzimler CphA, Sfh-1

2.5. Beta-Laktamazların İsimlendirilmesi

Beta-laktamazların adlandırılmasında bir çok yöntem kullanılmaktadır. Bazı enzimler tercih ettikleri substratlara göre (*CARB*, *FUR*, *IMP*, *OXA*), bazıları biyokimyasal özelliklerine göre (*SHV*, *NBC*) ve içerdikleri genlere göre (*Amp*, *CepA*), bazıları izole edildikleri bakterilere (*AER*, *PSE*), suşlara (*P99*), hasta adlarına (*TEM*, *ROB*), hastaneye (*MIR*, *RHH*), eyaletlere (*OHIO*), bulan kişiye (*HMS*) göre isimlendirilmiştir. *SHV* enziminin açılımı sülfidril hiper variable olmasına rağmen günümüzde *SHV-1* enziminin sanıldığı gibi aktif bölgede sülfidril değil serin hidroksil bulunmaktadır. Ayrıca *TEM* enziminden köken alanlara *TEM-1,2,3,4.....100*, ve *TEM* enzimlerinden türeyen enzimlere ise *CAZ* (seftazidimaz), *CTX* (sefotaksimaz) veya *IRT* (inhibitör rezistan) gibi belirli isimler verilmiş ve bu da karmaşaya yol açmıştır. *SHV* enzimleri ise *SHV-1,2,3,4.....50* gibi isimlerden köken alırlar. *PSE* enzimide ilk kez *Pseudomonas*'tan izole edilmiştir (Çizelge 2. 2) (Helfand ve Bonomo, 2003; Mascaretti, 2003; Jacoby, 2006; Dakh, 2008).

Çizelge 2.2. Beta laktamazların isimlendirilmesi (Jacoby, 2006)

Beta- laktamazlar	İsimlendirilmesi
CARB	substratlara göre (karbenisilin)
OXA	substratlara göre (oksasilin)
IMP	substratlara göre (imipenem)
CTX	substratlara göre (sefotaksim)
IMI	kullanım şekline göre (<i>Enterobacter cloacae</i>)
TEM	hastanın soyadının ilk üç harfine göre (Timoniera)
SHV	biyokimyasal özelliklerine göre (değişken sülfidril)
MIR	hastane adına göre (Miriam hastanesi)
OHO	eyaletlere göre (Cleveland, Ohio keşfetmek)
PSE	izole edildikleri bakteri'lere göre (<i>Pseudomonas</i> -spesifik enzim)

2.6. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Genel Özellikleri

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)'lar sefotaksim, seftazidim, seftriakson gibi oksiimino beta-laktamlara ve aztreonama direnç kazandıran ve genetik şifresi plazmid üzerinden taşınan enzimlerdir. İlk olarak 1983 yılında Avrupa'da *Klebsiella pneumoniae* suşlarına karşı, geniş spektrumlu beta-laktamların kullanılmaya başlanmasından hemen sonra tanımlanan bu enzimler, daha sonra *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer üyelerinde de saptanmıştır (Rahal, 2000; Tükenmez-Tigen ve Mülazımoğlu, 2012).

Yapısal özelliklerine göre GSBL'ler 9 farklı grup içinde sınıflandırılmaktadır. Bu gruplar *TEM*, *SHV*, *CTX-M*, *PER*, *VEB*, *GES/IBC*, *TLA*, *BES*, ve *OXA*'dır. Klasik olarak tanımlanan GSBL'lerin büyük çoğunluğu *TEM-1*, *TEM-2* ve *SHV-1* enzimlerinden köken almışlardır. Köken alınan ana enzimin moleküler yapısındaki aminoasitlerden bir ile dördünün yerine farklı aminoasitlerin jelmesi sonucu GSBL'ler oluşmaktadır. Günümüzde *TEM* türü beta-laktamazların sayısı 130'u, *SHV* türü beta-laktamazlarınki 50'yi geçmiştir. Bu üç enzimin türevleri dışında son yıllarda bunlardan köken almayan *CTX-M*, *PER*, *VEB* gibi genişlemiş spektrumlu enzimlerin sayısında artış olmuştur (Knothe ve ark., 1983; Dağlar ve Öngüt, 2012).

GSBL'ler yoluyla mikrobiyal direnç, ilk kez 1980'de Avrupa'da ve daha sonra ABD'de 3. kuşak sefalosporinlerin klinikte kullanılmaya başlamasından sonra bildirilmiştir (Färber ve ark., 2008; Iraz, 2009). Sonuçta GSBL'ler, köken aldıkları *TEM-1*, *TEM-2*, *SHV-1* enzimlerinden farklı olarak, oksiimino grubu içeren beta-laktamları (seftazidim, sefotaksim, seftriakson, sefuroksim ve aztreonam) hidroliz edebilmektedirler (Gür, 2004; Spahi, 2006)

A ve D moleküler sınıfında Ambler'in moleküler sınıflamasına göre GSBL'lerin büyük çoğunluğu yer alırlar (Kernodle ve ark., 1989; Bush ve Jacoby, 2010). Karbapenemleri hidrolize edebilen, ülkemizde de *K. pneumoniae* suşlarında oldukça sık saptanan enzimlerden biri Sınıf D içerisinde yer alan serin karbapenemaz *OXA-48*'dir (Carrer ve ark., 2008; Bush ve Jacoby, 2010; Azap ve ark., 2013). GSBL' ler başta *K. Pneumoniae* ve *Escherichia coli* olmak üzere, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella morganii*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aureginosa*, *Burkholderia cepacia* gibi birçok gram negatif

bakteride bulunabilmektedir (Bradford, 2001; Gülay, 2001; Irving ve ark., 2005; Ahmed, 2012).

2.6.1. GSBL tipleri

2.6.1.1. TEM tipi

Günümüzde yaklaşık olarak 100'den fazla TEM tipi vardır. TEM tipi GSBL enzimleri TEM-1 ve TEM-2 enzimlerinin türevleridir. TEM-1 ve TEM-2 GSBL tipleri çoğunlukla transpozonlar sayesinde kodlanan dar spektrumlu tiplerdir (Datta ve Kontomichalou, 1965; Paterson ve Bonomo, 2005). Beta-lakamazlardan TEM grubu ilk olarak 1965 yılında Yunanistan'da Temoneira adlı bir hastadan izole edilen *E. coli* kökeninde bulunmuştur (Datta ve Kontomichalou, 1965; Ahmed, 2012). TEM-1 tipi ampisilin, penisilin ve birinci kuşak sefalosporin hidrolize edebilmektedir. İlk TEM varyantının bildirimden günümüze kadar, mutasyonlar sonucu jelişen aminoasit değişikliklerinin kombinasyonları sonucu 150'den fazla bu enzimin yeni türü tanımlanmıştır. Birçoğu GSBL aktivitesine sahip iken, bazı varyantlar inhibitör dirençli beta-laktamaz özelliğindedir (Canton ve ark., 2008; Dağlar ve Öngüt, 2012). TEM enziminde oluşan aminoasit değişiklikleri sonucunda GSBL'lerin fenotiplerinde önemli değişiklikler olmakta, örneğin belirli oksiminio-sefalosporinleri hidroliz etme özellikleri veya izoelektrik noktaları değişebilmektedir (Stürenburg ve Mack, 2003; Dağlar ve Öngüt, 2012). TEM-2 TEM-1 ile aynı hidrolitik profiline sahiptir, fakat TEM-1 daha aktif ana promotörünü ve farklı izoelektrik noktasına (5.6 ila 5.4 karşılaştırıldığında) sahiptirler. TEM-13 ayrıca TEM-1 ve TEM-2 benzer hidrolitik profiline sahiptir (Datta ve Kontomichalou, 1965; Paterson ve Bonomo, 2005). TEM-1 tipi ampisiline dirençli *E. coli*'lerin %90'ında dirençten sorumludur (Gülay, 2001; Dağlar ve Öngüt, 2012). TEM-3 enzimi GSBL fenotipi gösteren ilk TEM türevidir ve 1987 yılında bildirilmiştir (Bradford, 2001; Ahmed, 2012).

GSBL fenotipi oluşturma yönünden bazı aminoasit değişiklikleri daha önemlidir; 104. pozisyonda glutamat yerine lizin, 164. pozisyonda arjinin yerine serin veya histidin, 238. pozisyonda glisin yerine serin girmesi gibi (Perilli ve ark., 1997; Bradford, 2001). TEM tipleri ilk kez *E. coli* ve *K. pneumoniae*'da, daha sonra *E. aerogenes*, *M. morganii*, *P. mirabilis* ve *Salmonella* spp gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde tespit edilmiştir (Stürenburg ve Mack, 2003; Dağlar ve Öngüt, 2012).

2.6.1.2. SHV tipi

GSBL türlerinden SHV tipi en sık klinik izolatlarda bulunmuştur (Jacoby, 1997; Ahmed, 2012). Sefotaksimi ve daha az oranda seftazidimi hidrolize eden SHV türü enzimlerin geniş spektrumlu ilk türevi 1983 yılında Almanya'da *K. pneumoniae*'da bulunmuş ve SHV-2 olarak tanımlanmıştır (Knothe ve ark., 1983; Paterson ve Bonomo, 2005). Ayrıca bu enzim genellikle de kromozomal bir enzimdir. Bu enzimin üretimi ile ampisilin, tikarsilin ve piperasiline karşı direnç oluşturmaktadır. Oksiimino-sefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur (Livermore, 1995; Stürenburg ve Mack, 2003).

SHV kökenli GSBL'lerin sayısı TEM kökenli olanlara kıyasla daha düşüktür, günümüzde yaklaşık SHV kökenli GSBL'lerin sayısı 50 kadardır. SHV-2'nin seftriakson hidrolizi seftazidimden daha fazladır ve SHV-1'in 238. pozisyonundaki glisin yerine serin girmesiyle ortaya çıkmıştır (Paterson ve Bonomo, 2005). SHV kökenli GSBL enzimleri Avrupa ülkelerinde ve ABD olmak üzere dünyanın hemen her tarafında yaygındır. SHV-5 beta laktamaz dünya çapında çok yaygın olduğunu ve en fazla Fransa, Yunanistan, Macaristan, Güney Afrika'da bulunmuştur. SHV-12 Kore'de bulunan en yaygın GSBL enzimlerinden biridir (Bradford, 2001; Ebrahimi, 2016). SHV-5 ve SHV-12 bilinen en yaygın GSBL türleridir. SHV tipi GSBL enzimleri *Enterobacteriaceae* ve SHV üreten *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* ssp. türlerinde tesbit edilmiştir (Poirel ve ark., 2004; Paterson ve Bonomo, 2005; Huang ve ark., 2007).

2.6.1.3. CTX-M tipi

İlk defa CTX-M beta-laktamaz 1989 yılında Almanya'da *E. coli*'de bildirilmiş, daha sonra, *Salmonella typhimurium* ve *E. coli* başta olmak üzere birçok *Enterobacteriaceae* türünde üretimi gösterilmiş olmasına rağmen Son yıllarda GSBL'lerin arasına yeni katılan bir gruptur (Jacoby, 2006; Dağlar ve Öngüt, 2012). Günümüzde yaklaşık 40'den fazla CTX-M enzimi bulunmaktadır. CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-2 bu grup en yaygın olan enzimlerdir (Bradford, 2001; Stürenburg ve Mack, 2003; Akova, 2004; Gür, 2004). Bu grup enzimler substrat olarak seftotaksimi tercih etmektedir. Seftazidimi bir miktar hidroliz etmekle birlikte klinikte dirence yol açacak miktarda değildir (Stürenburg ve Mack, 2003; Dağlar ve Öngüt, 2012). Bu enzimlerin

önemli bir özelliği de bunlara karşı tazobaktamın inhibitör etkisinin klavulonik asit ve sulbaktama göre fazla olmasıdır (Bradford, 2001; Stürenburg ve Mack, 2003; Paterson ve Bonomo, 2005). *Klyuvera georgiana*'nın KLUA olarak tanımlanan yapısal CTX-M enzimleri CTX-M-2 grubunda yer almaktadır (Bonnet, 2004; Akman, 2008).

Böljelere göre tesbit edilen CTX-M tipi GSBL sayısı hızla genişlemektedir (Alobwede ve ark., 2003; Paterson ve Bonomo, 2005). TEM ve SHV kökenli enzimler daha çok hastane kaynaklı enfeksiyonlarda belirlenirken CTX-M enzimi daha çok toplum kaynaklı enfeksiyonlarda tesbit edilmiştir (Pitout ve ark., 2005; Turgut, 2010). Sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımının CTX-M enzimlerinin belirlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. CTX-M kökenli GSBL'ler Çin, Hindistan'da başta olmak üzere bütün dünyada dağılmaktadır (Paterson ve Bonomo, 2005). 2004 yılına kadar sülfidril grubu beta-laktamaz enzimleri Macaristan'da *Klebsiella pneumoniae* suşlarında yaygın görülmekteydi. 2003 yılında Macaristan'da CTX-M-15 salgılayan *K. pneumoniae* klonu ortaya çıktı (Bonnet, 2004; Turgut, 2010).

2.6.1.4. OXA tipi

OXA beta-laktamazlar uzun süre sonra tanınmış olan ve daha az sıklıkla karşılaşılan enzimlerdir. Bu tip enzimler oksasilini hidrolize etme yeteneklerinden dolayı bu ismi almışlardır. Bu beta-laktamazlara sahip bakteriler kloksasilin ve oksasilini benzilpenisilinlere göre %50 daha fazla hidroliz edebilme yeteneğine sahiptirler (Bush ve ark., 1995; Ahmed, 2012).

Bu enzimlerin en yaygın olanı OXA-1 beta-laktamazıdır ve Enterobakteriler'de en sık görülen tiptir (Wu ve ark., 1992; Livermore, 1995). OXA-1 den OXA- 10'a kadar olanları dar spektrumlu olup substrat olarak oksasilin ve kloksasilini tercih ederler (Bush ve ark., 1995; Livermore, 1995; Stürenburg ve Mack, 2003; Walter ve Hoiby, 2006). OXA-11, 14, 15 ve 16 seftazidim direncine yol açarken, OXA-17 sefotaksim direnci oluşturmaktadır. OXA-31 ise sefepime direnç oluştururken seftazidime duyarlıdır (Aubert ve ark., 2001; Dağlar ve Öngüt, 2012).

Enterobacteriaceae'de karbapenemleri hidroliz eden beta-laktamazlar üç farklı (Ambler sınıfı A, B ve D) sınıfa ayrılırlar. Bunlardan sınıf B metallo beta-laktamazlar (MBL) en sık görülen sınıftır. Plazmid aracılı veya kromozomal olarak yayılan sınıf A en yaygın görülen KPC (karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*) ailesi enzimleridir. Sınıf D karbapenemazlar ise oksasilinaz (OXA) tipi beta laktamazlardır

(Quenaan ve Bush, 2007; Nordmann ve ark., 2011; Ciftci ve ark., 2013). Karbapenemleri hidrolize edebilen, ülkemizde de *K. pneumoniae* suşlarında oldukça sık saptanan enzimlerden biri Sınıf D içerisinde yer alan serin karbapenemaz OXA-48'dir (Carrer ve ark., 2008; Maltezou, 2009; Bush ve Jacoby, 2010; Nordmann ve ark., 2011; Ciftci ve ark., 2013).

OXA grubu enzimler beta-laktamaz inhibitörleri tarafından zayıf bir biçimde inhibe edilirler. Bu enzimler Türkiye'de *Pseudomonas aeruginosa*'dan en sık bulunan GSBL'lerdir (Bradford, 2001). Daha sonra Fransa'daki *P. aeruginosa* izolatlarında da görüldüğü bildirilmiştir (Philippon ve ark., 1997; Paterson ve Bonomo, 2005). Bu tür enzimler *P. aeruginosa* dışında *A. baumannii* izolatlarında da tanımlanmıştır (Vila ve ark., 1997; Bradford, 2001).

2.6.1.5. Diğer GSBL'ler

Son yıllarda genişlemiş spektrumlu enzimlerden olup TEM, SHV, OXA veya CTX-M beta laktamazlardan köken almamış bazı enzimler bildirilmeye başlanmıştır. PER-1, PER-2, VEB-1, CME-1, TLA-1 enzimleri %50 homoloji göstermektedir ve oksiminino-sefalosporinlere özellikle seftazidime ve aztreonama etkilidirler. PER-1 enzimi diğer *Enterobacteriaceae*'lar gibi Türkiye'deki *S. typhimurium* suşlarından izole edilmiştir ve PER-2 sadece Güney Amerika'da bulunmuştur (Bradford, 2001; Ahmed, 2012).

PER enzimleri ile TEM ve SHV tipi GSBL'ler DNA baz dizileri bakımından %25-27 oranında homoloji gösterirler (Nordmann ve Naas, 1994; Bauernfeind ve ark., 1996; Paterson ve Bonomo, 2005). Daha sonra Almanya'da tanımlanan PER-2, PER-1 ile %86'lık, Japonya'da tanımlanan TOHO-1 TEM türevleri ile %60'lık, vietnamlı bir hastada tanımlanan VEB-1, PER-1 ile %40'lık aminoasit benzerliği göstermektedir (Özsoy ve ark., 2001; Orak, 2005). VEB-1 enzimi; PER-1 ve PER-2 enzimleriyle %38 oranında homoloji göstermektedirler (Poirel ve ark., 1999; Paterson ve Bonomo, 2005). GES-1 ilk olarak Fransa'da *K. pneumoniae* suşunda saptanmıştır (Poirel ve ark., 2000; Bradford, 2001).

Geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize etme yeteneğine sahip BES-1, TLA-1, TOHO-1-2, BES, SFO, TLA ve IBC gibi GSBL'ler bildirilmiştir (Naas ve ark., 2008; Dağlar ve Öngüt, 2012).

2.6.2. GSBL'lerin tanı yöntemleri

GSBL üreten bir mikroorganizma ile enfekte olan hastalarda geniş spektrumlu bir beta-laktam ile tedavi risklidir, bu nedenle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının bu tip enzimleri saptamak için geliştirilmiş standart tarama ve doğrulama testlerini uygulanması ve sonuçları doğru yorumlaması gerekmektedir. GSBL üreten bakteri, antibiyotik duyarlılık test sonucu ne olursa olsun, tüm geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere dirençli olarak bildirilmelidir (Bradford, 2001). Bir *E. coli* antibiyotik duyarlılık testinde tüm geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli çıkarsa bu bakterideki enzimin araştırılması çok büyük bir önem taşımaz, çünkü tedavide zaten bu antibiyotikler tercih edilmeyecektir (Bradford, 2001; Stürenburg ve Mack, 2003). GSBL üreten bazı mikroorganizmalar rutin duyarlılık testlerinde kullanılan 10^5 “colony forming unit (cfu)"/mL bakteri yoğunluğunda duyarlı görülmelerine karşın inokulum 10^7 cfu /mL veya 10^8 cfu/mL'ye çıktığındaki birçok enfeksiyonda bakteri yoğunluğu bu düzeye çıkabilmektedir (Medeiros, 1997; Stürenburg ve Mack, 2003). Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI=eski NCCLS), GSBL üreten suşların rutin antibiyotik duyarlılık testlerinde sefalosporinlere duyarlı görünseler bile bütün sefalosporinler, penisilinler ve aztreonama dirençli olarak bildirilmesini önermektedir (NCCLS, 2003; Stürenburg ve Mack, 2003). GSBL'si bulunan ve bulunmayan bakterilerle gelişen enfeksiyonlar mortalite, morbidite ve sağlık giderleri açısından karşılaştırıldığında, günümüzde en etkili ve en önemli tedavi seçeneği olan karbapenemlere karşı direnç gelişimine ve maliyet artışına, yanlış negatif bildirimler ise tedavi başarısızlığına yol açacaktır (Stürenburg ve Mack, 2003).

2.6.2.1. GSBL tarama testleri

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), *E. coli* izolatında GSBL üretiminin taranması ve doğrulanması için standartlar geliştirmiştir. Disk difüzyon veya dilüsyon testi ile GSBL varlığının saptanmasında *E. coli*'den birkaç koloni alınıp 0.5 McFarland eşdeğerine göre hazırlanır. *E. coli* süspansiyonundan Mueller Hinton agar (MHA) besiyerine sürüntü ekimi yapılır ve sefpodoksim (30 µg), seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftriakson (30 µg) veya aztreonam (30 µg) diskleri yerleştirilir. 35°C'de bir gece inkübasyondan sonra antibiyotik zon çapları ölçülür. *E. coli* için seftazidim ≤ 22 mm, seftriakson ≤ 25 mm, sefotaksim ≤ 27 mm, sefpodoksim ≤ 17 mm,

aztreonam ≤ 27 mm olması (Çizelge 2. 3) durumunda GSBL tarama testi pozitif kabul edilerek doğrulama testi uygulanır (Öcal, 2012).

Çizelge 2.3. Antibiyotiklerin zon çapları

Antibiyotik	İnhibisyon zonu (mm)	MİK (µg/ml)
Sefotaksim	≤ 27	≥ 2
Seftriakson	≤ 25	≥ 2
Seftazidim	≤ 22	≥ 2
Sefpodoksim	≤ 17	≥ 2
Aztreonam	≤ 27	≥ 2

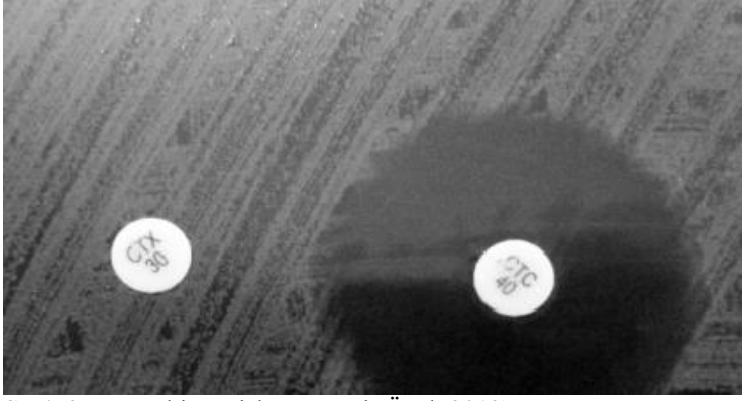
2.6.2.2. Doğrulama testleri

Enterobacteriaceae türlerinin GSBL üretim prevalansında artış, klinik izolatlarda yaygın olmaları, plazmid aracılığı ile kolay yayılmaları, salgın, sağaltım başarısızlığı, mortalite artması gibi ciddi klinik problemlere neden olmaları, rutin duyarlılık testleri ile tanımlanmalarının güç olması nedeniyle özel yöntemler ile doğru saptanmaları gerekmektedir. Sık olarak kullanılan yöntemler şunlardır (Ahmed, 2012).

1. Kombine disk yöntemi
2. Çift disk sinerji yöntemi
3. E test yöntemi

2.6.2.2.1. Kombine disk yöntemi

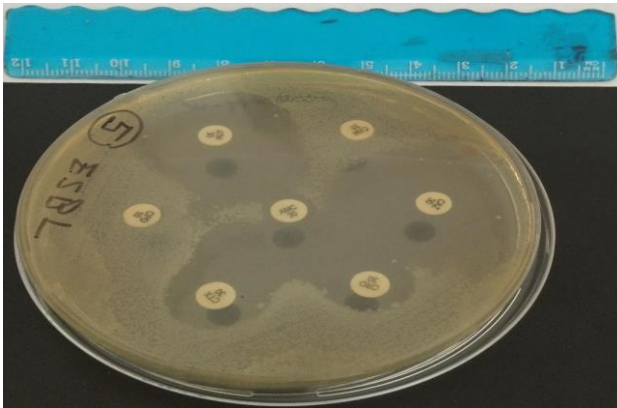
CLSI önerilerine göre 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonları hazırlandıktan sonra petri kutularına 4 mm kalınlığında dökülmüş Mueller-Hinton agar (GBL, Türkiye) yüzeyine inoküle edilmiştir (Gür, 2008; Öztürk ve ark., 2010). Aralarında 2 cm olacak şekilde klavulanik asit (10 µg) içeren seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg) ve sefpodoksim (30µg) diskleri yerleştirilir. Kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulonik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla 5 mm daha genişse, izolat GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilmektedir (Şekil 2. 1) (Carter ve ark., 2000; M'Zali ve ark., 2000; Ahmed, 2012).



Şekil 2.1. Kombine Disk Yöntemi (Öcal, 2012)

2.6.2.2.2. Çift disk sinerji yöntemi

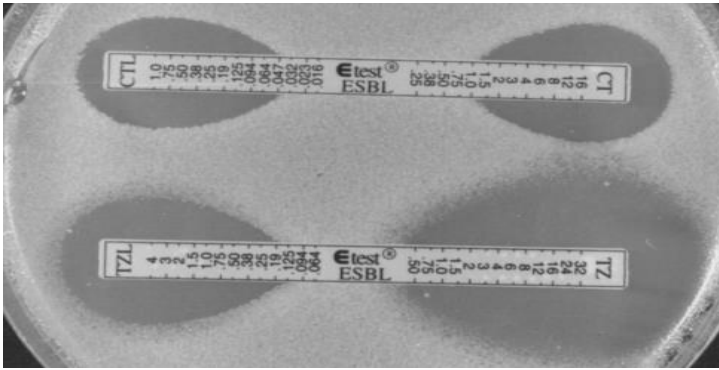
Çift disk sinerji testi (ÇDST) için suşlar, standart disk difüzyon yöntemi kurallarına uyularak Mueller-Hinton agar besiyerine yayılmıştır (Öztürk ve ark., 2010). Plâğın merkezine bir amoksisilin-klavulanik asit diski (AMC 20/10µg) ile disk merkezleri arasındaki uzaklık 30 mm olacak şekilde seftazidim (CAZ), seftriakson (CRO) veya sefotaksim (CTX), aztreonam (ATM) veya sefpodoksim (POD) diskleri yerleştirilir. antibiyotik disklerine ait inhibisyon zonlarının, amoksisilin/klavulanik asit yönünde genişleme göstermesi veya diskler arasındaki bölgede bir inhibisyon alanının gözlenmesi, GSBL varlığı açısından pozitif olarak kabul edilmektedir (Şekil 2.2) (Drieux ve ark., 2008; Ahmed, 2012).



Şekil 2.2. Çift Disk Sinerji Yöntemi

2.6.2.2.3. E-Test yöntemi

Klavulonik asit varlığında MİK değerlerinde azalmayı gösteren diğer bir yöntem de GSBL E-test stripleridir. Striplerin bir ucunda seftazidim (TZ), diğer ucunda seftazidim ve klavulanik asit (TZL) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Disk difüzyon için bildirilen standartlarda hazırlanan plaklarda inkübasyondan sonra, eliptik inhibisyon zonunun stribi kestiği değer MİK değerini vermektedir. TZ ve TZL MİK değerleri birbirine oranlandığında MİK değerinde ≥ 8 kat fazla azalma olması GSBL varlığını gösterir. Benzer şekilde sefotaksim ve sefotaksim-klavulanik asit (CT-CTL) içeren E-test stripleri de bulunmaktadır (Şekil 2. 3) (Cormican ve ark., 1996; Leverstein-van Hall ve ark., 2002; Ahmed, 2012).



Şekil 2.3. E-Testi'nde inhibisyon zonunun şeritle ölçüm görünümü (Demir, 2006)

2.6.2.3. Moleküler yöntemler

Moleküler yöntemler, geleneksel yöntemler kullanarak bulunması ve belirlenmesi zor veya imkansız olan enfeksiyöz ajanların ve enzimlerin tanımlanmasında araştırma amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla, DNA problemleri, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), oligotiplendirme, ligaz zincir reaksiyonu (LCR), PZR-RFLP, PZR-SSCP izoelektrik odaklama ve nükleik asit dizi analizi gibi yöntemler kullanılmaktadır (Bradford, 2001; Stürenburg ve Mack, 2003). Bu yöntemlerin çoğunda sadece enzim ailesi gösterilebilmektedir. Bu yöntemler modern seroloji, akım sitometrisi, elektron mikroskopi ve kütle spektrometri gibi güçlü araçlar ile birleştirildiğinde medikal uygulamada sık sık karşımıza çıkan patojenlerle birlikte, birçok yeni ortaya çıkan veya tekrar ortaya çıkan patojenlerin de hızlı bir şekilde ortaya çıkması olanaklı kılmaktadır (Alvarez ve ark., 2004; Gülamber, 2009).

Ancak bu yöntemlerin çoğunda sadece enzim ailesi gösterilebilmektedir. Enzimin kesin olarak tanımlanması nükleik asit dizi analizi ile odaklıdır ve mikroorganizma, klinik materyalden nükleik asitin izole edilmesi gerekir ve sınırlayıcı endonükleaz enziminin, jel elektroforez ve nükleik asit hibridizasyon tekniklerinin kullanımına dayanır. Bu yöntemle farklı enzim tipleri ve mutasyonlar saptanabilmektedir (Bradford, 2001; Stürenburg ve Mack, 2003; Ahmed, 2012).

2.6.3. GSBL'lerin epidemiyolojisi ve prevalansı

GSBL halen hastanede yatan hastalarda ve toplumsal ortamlarda evrensel bir sorun teşkil etmektedir. Klinik izolatlar arasında GSBL yayılımı özellikle genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerin klinik tedaviye girme zamanı ve yaygın kullanımı ile ilişkili olduğu için GSBL üreten suş sayısı ülkeden ülkeye, şehirden şehire, hastaneden hastaneye hatta aynı hastanedeki servisler arasında değişmektedir (Bradford, 2001; Al-Jasser, 2006; Ahmed, 2012). TEM ve SHV grubu GSBL enzimler 1990'lı yılların başında tüm dünyada dominant iken CTX-M tipi GSBL'lere çok az rastlanmaktaydı. Bu yıllarda TEM ve SHV enzimleri en büyük tehdit olarak algılanmaktaydı ve çoğu epidemilerle bu 2 enzim grubu ilişkilendirilmekteydi (Mirelis ve ark., 2003; Pitout ve Laupland, 2008; Ahmed, 2012).

1990 yılı başında SHV ve TEM genlerinin IncM, IncA/C, IncFI ve IncHI2 plazmidleriyle yayılımı gösterilmiştir (Jacoby ve Medeiros, 1991; Tükenmez-Tigen ve Mülazımoğlu, 2012). Uluslararası dağılıma bakıldığında IncFII plazmidlerinin CTX-M-15 yayılmasında, IncN plazmidlerinin CTX-M-32 yayılmasında, IncHI2 plazmidlerinin CTX-M-9 yayılmasında etkili oldukları tesbit edilmiştir (Novais ve ark., 2007; Tükenmez-Tigen ve Mülazımoğlu, 2012).

GSBL üreten bakteri ilk olarak 1983 yılında Almanya'dan, ilk hastane kaynaklı salgın da 1985 yılında Fransa'dan bildirilmiştir. Daha sonra Amerika Birleşik Devletleri'nden ve tüm dünyadan GSBL üreten suşlarla oluşan enfeksiyonlar ve salgınlar rapor edilmiştir (Stürenburg ve Mack, 2003; Colodner ve ark., 2004; Gür, 2004; Colodner, 2005; Akman, 2008).

Ülkemizde ise en sık CTX-M-15 görülürken (Naas ve ark., 2008; Dağlar ve Öngüt, 2012). OXA-48 karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatlarının ve SHV-12

enziminin de sıklığının arttığı da bildirilmektedir (Tzouvelekis ve ark., 2000; Dağlar ve Öngüt, 2012).

1960'lerden sonra semisentetik penisilinler, metisilin ve ampicilin, 1. kuşak sefalosporinlerden sefaloridin ve sefalotin jeliştirilmesiyle Gram negatif basillerde bulunan beta-laktamazlar önemli bir direnç mekanizması haline jelmıştır. Gram negatif bakterilerde çok daha fazla çeşitte beta-laktamaz bulunduğundan ve plazmid kontrolünde sentezlenebildiğinden çok kısa sürede dirençte artış gözlenmiştir (Jacoby ve Medeiros, 1991; Dağlar ve Öngüt, 2012).

GSBL'ler yoluyla mikrobiyal direnç ilk kez 1980 yılında Avrupa ve daha sonra ABD'de 3. kuşak sefalosporinlerin klinikte kullanılmaya başlamasından sonra bildirilmiştir. Bazı bakteriler GSBL'yi plazmidler ile de aktarabilirler; bu nedenle enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanması zorunlu hale jelmektedir (Paterson ve Bonomo, 2005). GSBL taşıyan plazmidler 100 kb veya daha büyük plazmidlerdir. GSBL genleri taşıyan genler aynı zamanda aminoglikozid, kloramfenikol, tetrasiklin ve sülfonamid direnç genlerini de taşıyabilir (Bush ve ark., 1995; Livermore, 1995; Stürenburg ve Mack, 2003).

Birçok merkezde bu plazmidlerin yayılması veya klonun yayılması ile oluşan GSBL salgınları bildirilmiştir. GSBL'yi kodlayan genler bazen de transpozon ve integronlara yerleşip bakteriler arasında kolayca yayılabilirler. Bazen bu yayılma o kadar yoğun olabilir ki hastanede yatan hastaların üçte biri GSBL üreten suşlarla enfekte veya kolonize olurlar (Gülay, 2001; Stürenburg ve Mack, 2003; Colodner ve ark., 2004; Colodner, 2005; Akman, 2008).

Günümüzde GSBL üreten mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar, özellikle yoğun bakım ünitelerinde yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır. Dağlar ve Öngüt 2012 yılında yaptıkları çalışmada *E. coli* suşlarında GSBL prevalansını %54.4 olarak saptarken, mortalite oranını GSBL üretmeyen *E. coli* enfeksiyonlarında %8, GSBL üreten *E. coli* enfeksiyonlarında ise %24.3 olarak bildirmişlerdir (Çelebi ve ark., 2009; Dağlar ve Öngüt, 2012). *Enterobacteriaceae*'da GSBL prevalansı dünyada %74, ülkemizde ise oran *E. coli*'de %14,7, *Klebsiella*'da %53,3 türdür (Durupınar, 2001; Arslan, 2010). Avrupa ülkelerinde ise GSBL oranları açısından farklılıklar görülmektedir. Örneğin kuzey ülkelerinde GSBL prevalansı %1,5 civarında iken, Polonya, Rusya ve Türkiye gibi ülkelerde ise bu oran %39-47 civarındadır

(Leblebicioğlu ve ark., 1999; Durmaz ve ark., 2001; Bell ve ark., 2002; Du ve ark., 2002; Oteo ve ark., 2002; Ozakın ve ark., 2003; Ece, 2005). 1985-1987 yılları arasında Fransa'da TEM-3 beta-laktamazı üreten izolatların neden olduğu bir salgın baş göstermiştir. GSBL üreten mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların bağımsız risk faktörlerini öne çıkarmak için birçok çalışma yapılmıştır. En çok belirlenmiş olan risk faktörleri uzun süreli hastanede kalma, yoğun bakım ünitesinde yatma veya daha önceden de hastanede kalma ve uzun süreli 3. kuşak sefalosprin kullanımıdır (Stürenburg ve Mack, 2003; Colodner ve ark., 2004; Gür, 2004; Colodner, 2005; Akman, 2008). Yapılan çalışmalarda bölgeye ve ülkeye göre GSBL oranları değişmektedir. Değişik ülkelerde yapılmış çalışmalar incelendiğinde *Klebsiella* türlerinde % 8 ile % 61 arasında değişen oranlarda GSBL varlığı tespit edilmiştir. *E. coli* izolatlarında ise bu oran %1,5 ile % 26,3 arasında değişmektedir (Livermore ve Yuan, 1996; Babini ve Livermore, 2000; Ho ve ark., 2000; Oteo ve ark., 2002; Bishara ve ark., 2005; Ece, 2005; Kader ve Angamuthu, 2005; Matar ve ark., 2005; Seid ve Asrat, 2005). Özellikle son zamanlarda toplumsal sağlık merkezleri ve günlük bakım evlerinin GSBL salgılayan *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşları açısından potansiyel bir tehlike oluşturabildiği ortaya konmuştur (Çizelge 2. 4, 2. 5, 2. 6) (Wiener ve ark., 1999; Golabi, 2011).

Çizelge 2.4. Bazı ülkelerde *E. coli* 'de GSBL prevalansı (Stürenburg ve Mack, 2003; Colodner ve ark., 2004; Gür, 2004; Colodner, 2005; Ece, 2005)

Ülke	Çalışma/yılı	<i>E.coli</i> GSBL(%)
Avrupa	SENTRY 1997, 1999	5.3
İtalya	2002	1.2
İspanya	EARSS 2001	1.5
Fransa	1996, 2000	-
Hollanda	1997	<1
Uzakdoğu	2002	10,1
Türkiye	Leblebicioğlu 1999	15.5
	Durmaz 2001	1.1
	Özakın 2003	12.4

Çizelge 2.5. GSBL enzimlerinin coğrafi dağılımı (Stürenburg ve Mack, 2003; Colodner ve ark., 2004; Gür, 2004; Colodner, 2005; Ece, 2005)

GSBL türleri	Coğrafi yayılımı
TEM, SHV ve CTX-M	Tüm dünyada yaygın
İnhibitör dirençli TEM	Tüm dünyada yaygın
PER	Türkiye, Güney Amerika
OXA	Türkiye

Çizelge 2.6. GSBL üreten bakteri ile enfeksiyon riski (Stürenburg ve Mack, 2003; Colodner ve ark., 2004; Gür, 2004; Colodner, 2005; Ece, 2005)

Risk Faktörleri

<u>Hastanın vattığı bölüm</u>	<u>yabancı materyal ve invaziv girişimler</u>
Yoğun bakım, Cerrahi bölüm, Pediatrik ve yenidoğan bölümleri, Rehabilitasyon bölümleri, Bakım evleri ve Onkoloji bölümü.	Santral venöz, katater Sonda, Entübasyon ve mekanik ventilasyon, Trakeostomi, Gastrostomi, jejunostomi tüpü, Nazogastrik tüp.
<u>Aldığı tedavi ve süre</u>	<u>Hasta ve altta yatan hastalık</u>
Uzun süreli antibiyotik 3.kuşak sefalosporin kullanımı, Aminoglikozid kullanımı, Uzun süreli hastanede kalış, Uzun süreli yoğun bakımda kalış.	İleri yaş; Yaş 12 haftadan küçük olması, Düşük doğum ağırlığı, Malign hastalık, Kalp yetmezliği, Diabet, Acil abdominal cerrahi girişim, Bağırsak Kolonizasyonu, Safra yolu hastalığı.

2.6.4. GSBL sentezleyen bakterilerin klinikte neden olduğu sorunlar

2.6.4.1. Direnç

GSBL sentezleyen bakterilerin klinikte sebep olduğu problemlerin başında beta laktamlara karşı geliştirdikleri direnç mekanizmasıdır. Örneğin bu enzimleri taşıyan bakterilerin aztreonam ve seftazidime karşı dirençli olduğu bilinmelidir (Bradford, 2001; Akova, 2004; Mehli ve ark., 2007; Arslan, 2010). Ayrıca beta-laktamaz enzimlerini kodlayan plazmidler pek çok beta-laktam dışı antibiyotiği'de kodlamaktadır. Bu yüzden GSBL taşıyan bakterilerde aminoglikozitler başta olmak üzere kinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim-sulfametoksazol direnci de aynı zamanda bulunabilmektedir (Akova, 2004; Arslan, 2010).

2.6.4.2. Kolonizasyonu

Hastanede yatan hastalarda GSBL sentezleyen bakterilerin kolonizasyon riskini artıran çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır (Lautenbach ve ark., 2001; Akova, 2004; Arslan, 2010). Bunlar arasında, hastanede yatan hastaların arasında uzun süreli antibiyotik kullanımı, yoğun bakımda yatış süresinin uzaması, huzurevinde kalıyor olmaları, hastane içinde geniş spektrumlu sefalosporinlerin fazla miktarda kullanımı, acil abdominal cerrahi, nazogastrik, gastrostomi veya jejunostomi tüpü kullanımı, intravasküler kateter kullanımı ve düşük doğum ağırlığı sayılabilir (Akova, 2004; Arslan, 2010).

2.6.4.3. Laboratuvarda GSBL saptanmasında zorluklar

GSBL sentezleyen bir bakteri, sentezlediği enzimin sefoksitin, beta-laktamaz inhibitörleri ve imipeneme karşı duyarlılıklarını genellikle devam ettirirler. Ayrıca bu bakterilerin sefotaksime direnci daha düşük olabilmektedir. İnokulum etkisi, GSBL üreten mikroorganizmaların ve inokulum miktarı arttıkça genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerin MIC değeri de artmaktadır (Akova, 2004; Arslan, 2010). Seftazidime yüksek afinite gösteren GSBL'ler, sefotaksim veya seftriaksonu rutin duyarlılık testlerinde kullanılan 3. kuşak sefalosporin olarak tercih etmesi GSBL saptanmasını önemli nitelikte güçleştirmektedir (Vahaboglu ve ark., 2001; Akova, 2004; Arslan, 2010).

2.6.4.4. Morbidite ve mortalite

GSBL sentezleyen bakteri enfeksiyonlarının tedavisi konusunda yapılmış prospektif kontrollü çalışma bulunmamaktadır. Ancak, pek çok retrospektif çalışmada GSBL varlığının mortalite ve morbiditeyi olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (Vahaboglu ve ark., 2001; Akova, 2004; Arslan, 2010).

2.6.5. GSBL taşıyan bakterilerin tedavisinde kullanılacak antibiyotikler

Çok fazla sayıda beta-laktam antibiyotiği olmasına rağmen, ancak bunlardan birkaçı GSBL taşıyan bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde

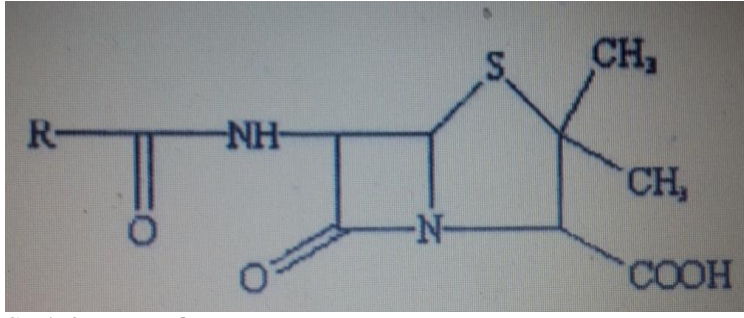
kullanılmaktadır (Stürenburg ve Mack, 2003). GSBL üreten *Klebsiella* ve *E. coli* izolatları, penisilinler, sefalosporinler veya aztreonama in vitro olarak duyarlı görünmelerine karşın, klinik olarak bu ilaçlarla tedaviye dirençli olabilmektedirler (Bush ve ark., 1995; Arslan, 2010) . Ayrıca sefoksitin, sefmetazol, sefotetan ve latomoksef gibi sefamisinler, TEM ve SHV tiplerini üreten *Klebsiella*’lerin tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır. Sefotetan ve latomoksef in en etkili antibiyotiklerdir (Yıldırım, 1999; Orak, 2005). GSBL üreten *Klebsiella*, *E. coli* izolatların bir kaçında genişlemiş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonam için inhibisyon zonları normal duyarlı popülasyonun altında fakat standart sınır değerlerin üzerinde olabilmektedir. Bu tür izolatlar penisilinler, sefalosporinler veya aztreonam için sonuç bildirilmeden önce tarama sınır değerleri kullanılarak olası GSBL üretimi için taranması gerekmektedir. Tüm GSBL üreten bakterilerde test sonucu, tüm penisilinlere, sefalosporinlere ve aztreonama dirençli şeklinde verilmesi gerekmektedir (Bush ve ark., 1995; Arslan, 2010). Günümüzde amoksisilin/klavulanik asit, sefoperazon/sulbaktam, ampisilin/sulbaktam, tikarsilin/klavulanik asit kombinasyonları bulunmaktadır. Bütün sefalosporinlerin aktivitesi GSBL üreten suşlara karşı gittikçe azalmaktadır (Özsoy ve ark., 2001; Orak, 2005).

2.6.5.1. Penisilinler

Penisilin, ilk kez 1928’de Fleming tarafından *Penicillium notatum* kültürlerinde *staphylococların* üremesini enjelleleyen bir madde olarak keşfedilmiştir. Daha sonra 1940’ta Florey ve Chain’in çalışmaları ile saflaştırılarak klinik kullanıma girmiştir (Ulusoy, 2002; Gülay, 2003) (Çizelge 2. 7).

Penisilin kullanımını izleyen yıllarda jelişen direnç 1960’lı yıllarda beta-laktamaza dirençli yarı sentetik penisilinleri (metisilin, oksasilin, nafsilin) gündeme getirmiştir. Kısa bir süre sonra bu antibiyotiklere dirençli suşların olduğu saptanmıştır (Topçu ve ark., 2002; Arıdoğan ve ark., 2004).

Tüm penisilinlerin temel yapısını 6 aminopenisilanik asit (6- APA) oluşturur (Ulusoy, 2002; Gülay, 2003) (Şekil 2. 4).



Şekil 2.4. Penisilinin yapısı

Çizelge 2.7. Penisilinler ve kullanım şekilleri

Grup	İlaçlar	Uygulama yolu
Doğal penisilinler	Pen G kristalize Pen G prokain Pen G benzatin Pen V	IV IM IM PO
Aminopenisilinler	Ampisilin Amoksisilin Bakampisilin	PO, IV, IM PO PO
Penisilinaza dirençli Penisilinler	Nafsilin Metisilin Oksasilin Kloksasilin	IM, IV IM, IV PO, IM, IV PO
Karboksipenisilinler	Karbenisilin Tikarsilin	IM, IV IM, IV
Üredopenisilinler	Piperasilin Mezlosilin	IM, IV IM, IV

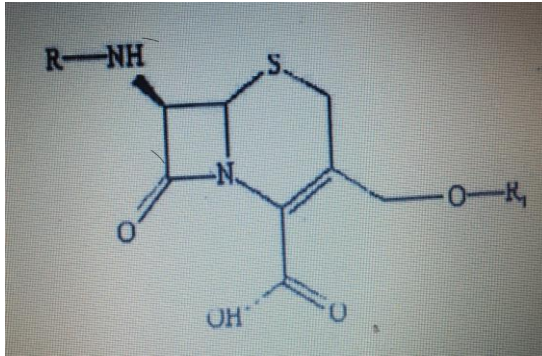
Geniş spektrumlu penisilinler grubunda ise amimnopenisilinler (ampisilin, amoksisilin, bakampisin) üredopenisilinler (azlosilin, mezlosilin, piperasilin) karboksipenisilinler (indanikarbenisilin, karbenisilin, tikarsilin) yer almaktadır (Craig ve ark., 1998; Çolak, 2011).

Klasik doğal penisilinler penisilin G ve penisilin V(fenoksimetil penisilin)'dir. Penisilin G mide asidinde inaktivite olduğundan sadece parenteral yolla kullanılır. Penisilin V oral yolla kullanılabilen tek doğal penisilindir. Doğal penisilinler başlıca Gram pozitif bakterilere etkilidir (Ulusoy, 2002; Gülay, 2003). Penisilin G'nin amino penisinoleik asit çekirdeğine farklı grupların (serbest radikallerin R) bağlanmasıyla

birçok semisentetik penisilin elde edilmiştir (Craig ve ark., 1998; Çolak, 2011). Ayrıca Ampisilin hem oral hem de parenteral kullanılabilir. Diğer antibiyotikler sadece oral kullanımları vardır. P-hidroksi grubu nedeniyle, amoksisilinin biyoyararlanımı ampisiline göre daha yüksektir. Karboksipenisilinler grubunda tikarsilin ve karbenisilin bulunmaktadır. Tikarsilin Türkiye’de yoktur. Karbenisilin çok miktarda tuz içermesi nedeniyle pratikte kullanımı bulunmamaktadır. Antipödomonal penisilinler grubunda bulunan antibiyotikler; azlosilin, piperasilin ve mezlosilinlerdir. En çok etkinlik piperasilinde, daha sonra mezlosilindedir (Ulusoy, 2002; Gülay, 2003).

2.6.5.2. Sefalosporinler

1945 yılında *Cephalosporium acremonium*’dan elde edilen Sefalosporin C, bu grubun ilk örneği olarak bilinir. Sefalosporinlerin ana yapısını 7-amino sefalosporanik asiddir (7-ACA) (Şekil 2. 5).



Şekil 2.5. Sefalosporin yapısı

Sefalosporinler dört kuşağa ayrılırlar:

- 1. Kuşak sefalosporinler
- 2. Kuşak sefalosporinler
- 3. Kuşak sefalosporinler
- 4. Kuşak sefalosporinler

1. kuşak sefalosporinler grubunda sefalotin, sefazolin gibi parenteral, sefalekssin, sefadroksil gibi oral ve sefradin gibi hem parenteral, hem de oral kullanılabilen bileşikler bulunmaktadır. Gram pozitif koklara karşı en etkili sefalosporinlerdir.

Enterokoklara ve metisiline dirençli olmayan *Stafilokoklara* etki ederler (Greenwood ve ark., 2006; Ahmed, 2012).

2. kuşak sefalosporinler grubunda sefaklor, sefuroksim, sefuroksim aksetil, sefproziller bulunmaktadır. İkinci kuşak sefalosporinler, birinci kuşak sefalosporinlere yakın bir Gram pozitif etkinliğe sahiptir. Ayrıca Gram negatif etkinlikleri daha fazladır (Greenwood ve ark., 2006; Ahmed, 2012).

3. kuşak sefalosporinler grubunda sefoperazon, sefotaksim, seftriakson, seftizoksim, seftazidim ve sefodizim sadece parenteral olarak kullanılan ve ülkemizde bulunmaktadırlar. Gram negatif çomaklar bu gruptaki sefalosporinlere en etkili olduğu bakterilerdir. Seftazidim, sefoperazon ve sefepim *Pseudomonas aeruginosa*'ya etkilidir. Beyin omurilik sıvısına iyi geçtiklerinden ve menajit etkenlerinin tümüne etkili oldukları için akut bakteriyel menenjitlerde (Gram negatif çomak menenjitleri dahil) kullanılır (Greenwood ve ark., 2006; Ahmed, 2012).

4. kuşak sefalosporinler grubunda sefepim ve sefpiron bulunmaktadır. Sefepim klinik olarak yalnız ülkemizde kullanımdadır (Greenwood ve ark., 2006; Ahmed, 2012). Sefepim, üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli olan *P. aeruginosa*'ya, *Enterobacter* türlerine karşı da etkilidir. Ayrıca sefepim kullanımı sonucu GSBL pozitif mikroorganizmalarla jelişen enfeksiyonlarda tedavi başarısızlığı görülebilir (Paterson, 2000; Stürenburg ve Mack, 2003; Akova, 2004; Spahi, 2006). Metisiline duyarlı *Stafilokoklara* ve *Enterokoklara* karşı etkilidirler. Sadece parenteral kullanılır. Bu grup antibiyotikler günümüzde febril nöropenik hastaların başlangıç tedavisinde de önerilmektedir (Ulusoy, 2002; Gülay, 2003).

2.6.5.3. Monobaktamlar

Monobaktam grubu içinde klinik kullanımda olan tek antibiyotik aztreonamdır. Yapısında beta-laktam halkasına ekli başka bir halka bulunmaması ile diğer beta-laktamlardan ayrılır. Aztreonam Gram pozitif bakterilerin PBP'sine (Penisilin Bağlayan Proteinler) bağlanamaz. Özellikle Gram negatif bakterilerin PBP3'üne bağlanarak hücre duvar sentezini inhibe eder. Ayrıca *Enterobacteriaceae* ailesine, *P. aeruginosa*'ya ve birçok Gram negatif bakterilere karşı iyi etkilidir. Gram pozitif bakteriler ve anaerob

bakterilere karşı etkisizdir. Aztreonam, paranteral uygulamadan sonra dokulara ve vücut sıvılarına çok iyi dağılır (Bodey, 1990; Ahmed, 2012).

2.6.5.4. Karbapenemler

Günümüzde bilinen mevcut antibiyotikler içinde en geniş etki alanına sahip olan gruptur. Bu grupta imipenem ve meropenem yer almaktadır. Ertapenem, faropenem, doripenem ise yeni geliştirilen karbapenemlerdir (Bodey, 1990; Ahmed, 2012). Karbapenemler geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye karşı stabiliteye sahip ve beta-laktamaz enzimlerine son derece dayanıklıdır. Karbapenem grubu antibiyotiklerinden imipenem ve meropenem *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*'nin dahil olduğu birçok gram negatif basil, ertapenem ise *P. aeruginosa* haricindeki gram negatif basillerde etki göstermektedirler. Ayrıca imipenem böbreklerden salgılanan dehidropeptidaz enzimi ile inaktif olmaktadır. Karbapenemlerin yan etkileri bulantı ve kusmadır. Ayrıca penisilinlerin etkilerine benzer benzer şekilde lökopeni, eozinofili ve pozitif Coombs testi görülebilir (MacKenzie ve ark., 1997; Stürenburg ve Mack, 2003).

2.7. Beta-Laktam Antibiyotikler

Farklı yapı ve özellikte pek çok Beta-Laktamaz enzim bulunmaktadır. Bu enzimlerin hepsindeki ortak özellik, özgül oldukları beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif etmeleridir (Livemore, 1987; Jacoby ve Medeiros, 1991; Akova, 1992).

Beta-laktamlar, beta-laktam halkasına bağlı yan zincirler ve diğer halkalara göre penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve beta-laktamaz inhibitörler olmak üzere beş temel sınıfa ayrılır (Ahmed, 2012).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten suşlar seftazidim başta olmak üzere bütün üçüncü kuşak sefalosporinler ve aztreonama karşı direnç kazanırlar. Bu suşlar piperasilin, mezlosilin, aminoglikozit ve kinolonlara karşı da değişik mekanizmalarla direnç geliştirebilirler, ancak karbapenem türevlerine karşı genellikle duyarlı kabul edilirler (Özsoy ve ark., 2001; Geyik ve ark., 2002).

Bakterilerde antibiyotiklere direnç gelişmesi ile antibiyotik kullanımı arasında doğrudan bir ilişki vardır. Geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerin aşırı kullanılmasının genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten gram negatif basil

epidemileri için önemli risk faktörü olduğu bildirilmektedir (Bush ve ark., 1995; Livermore, 1995; Ahmed, 2012).

Antibiyotik yokken çok düşük düzeyde olan enzim sentezi beta-laktam bir antibiyotiğin varlığında yükselmektedir. İndüksiyonun geçici bir olay olmasına karşın, klinikte önemli olan suşlar, mutasyon sonucu devamlı yüksek düzeyde enzim sentezi yapanlardır (Knothe ve ark., 1983; Stürenburg ve Mack, 2003).

2.8. Beta-Laktam/Beta-Laktamaz İnhibitör Kombinasyonları

Beta-laktamaz inhibitörleri yapısal olarak beta-laktam antibiyotiklere benzerler. Bu antibiyotikleri inaktive eden beta-laktamaz enzimlerinin üretimidir. Bu enzimler penisilin, sefalosporin, monobaktam veya karbapenem grubundan biri veya birkaçı hidrolize uğrarlar ve intihar inhibitörleri olarak işlev görürler (Drawz ve Bonomo, 2010; Sood, 2013). Klinik olarak kullanılan üç tane beta-laktamaz inhibitörü vardır. Bunlar: Ampisilin+sulbaktam, amoksisilin+klavulanik asit ve piperasilin+tazobaktamdır (Lee ve ark., 2003; Sood, 2013). Klavulanik asit, Stafilokokların plazmid kökenli beta-laktamazlarına *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* gibi Gram negatif bakterilerin plazmid kaynaklı beta-laktamazlarına ve tüm anaerop bakterilerin enzimlerine karşı etkili olmasına rağmen. Ayrıca *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* ve *Morganella* cinslerine karşı etkili değildir. Sulbaktam etki alanı da klavulanik asidinki gibidir. Piperasilin+tazobaktam ise *M. morganii* ve *C. ferundii* gibi bakterilere etkilidir (Ulusoy, 2002; Gülay, 2003).

2.9. Beta-Laktam Ajanlara Direnç Mekanizmaları

Bakteriler beta-laktam antibiyotiklere üç genel mekanizma ile dirençli hale gelirler.

2.9.1 Antibiyotikleri inaktive eden beta-laktamazların üretimi

Beta-laktamazlar penisilinleri ve sefalosporinleri hidrolizle parçalamakta ve bu antibiyotiklere karşı klinikte en sık gözlenen direnç mekanizmasını oluşturmaktadır (Gür, 1996; Orak, 2005). Beta-laktam antibiyotikleri sentezleyen Gram pozitif

bakteriler içinde en önemli patojen *Staphylococcus aureus*'dur. *S. aureus* enzimleri bakteriyofajlar aracılığı ile duyarlı hücrelere geçebilmektedir. Beta-laktamazlar Gram negatif bakterilerde dış zar ile sitoplazma zarı arasındaki periplazmik boşlukta yer alırlar. Beta-laktamaz enzimleri plazmid ya da kromozom kontrolünde sentezlenmektedir (Sanders ve Sanders, 1992; Orak, 2005).

2.9.2. Hedef PBP moleküllerde değişiklik

Bakteri hücre duvarında bulunur sentezde görev alan penisilin bağlayan proteinlerindeki (PBP) de değişiklikler; PBP'nin beta-laktam antibiyotiğe affinitesinin azalması, PBP sayısında azalma olması veya beta-laktam antibiyotiklere düşük affinite gösteren yeni PBP'lerin sentezlenmesi sonucu oluşabilmektedir. PBP proteindeki mutasyonel değişiklikler gibi mekanizmalarla direnç jelişebilmektedir. PBP'lerdeki değişiklikler ile oluşan direnç en çok Gram pozitif koklarda ve *Pseudomonas*'da gözlenmiştir. Gram negatif bakterilerdeki her üç mekanizma dirençten sorumlu olabilir. Buna karşılık Gram pozitif bakterilerde dış membran olmadığından ilk mekanizma ile direnç jelişmesi söz konusu değildir (Sanders ve Sanders, 1992; Orak, 2005).

2.9.3. Antibiyotiğin hücre içine ulaşmasının engellenmesi

Gram negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotikler dış membranda bulunan porinlerin özellikleri ve sayıları ile yük, çözünürlük ve büyüklük hücre içine giriş hızını belirlemektedir. *Enterobacteriaceae* ailesinde meydana gelen porin eksikliği mutantları klinikte nadirdir, büyük olasılıkla bunların besinleri almasında ya da yüzeylerinin değişmesi sonucu memeli hücrelere tutunmalarında da bozukluk olmaktadır. Porin F ve Porin C proteinleri Gram negatif bakterilerde mutasyona uğrayarak tüm beta-laktamlara direnç jeliştirebilirken imipenem duyarlı kalmaktadır (Sanders ve Sanders, 1992; Orak, 2005).

2.10. Plazmid Aracılı Beta-Laktamazlar

Plazmid aracılığı ile sentezlenen birçok beta-laktamaz mevcuttur. Bunlar arasında 1960 yılların'da başta *E. coli* olmak üzere bütün Gram negatif bakterilerde sentezleri plazmid kontrolünde olan birçok beta-laktamaz tanımlanmıştır ve bunlardan

en sık olarak bulunan TEM-1 beta-laktamazlardır. Beta-laktam antibiyotiklere karşı Gram negatif bakterilerde oluşan direnç birçok zaman plazmid kontrolünde sentezlenen beta-laktamazlar ile oluşur (Datta ve Kontomichalou, 1965; Bradford, 2001). Beta-laktamaz genlerini taşıyan plazmid ya da transpozonlar bir bakteride bulunan beta-laktamazın diğer bakteriye geçişine kolaylık sağlar. Böylece genetik elementleri üzerinde bulunan direnç genlerinin direncin daha kolay ve hızlı bir şekilde dağılmasını sağlar (Medeiros, 1984; Bradford, 2001).

Moleküler sınıf A ve D içinde yer alan en geniş spekturuma sahip enzimlerdir. Ayrıca bakterilerin plazmid kaynaklı AmpC geni taşıdıkları belirlenmiştir. Daha sonra, indüklenabilen AmpC tipi enzimi bulunmayan bakteri üzerinde (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella*, *Proteus*) ortaya çıkan bu direncin, plazmidler tarafından kodlanan geniş spektrumlu beta laktamazlar vasıtasıyla oluştuğu bulunmuştur (Bradford, 2001; Barnaud ve ark., 1998; Pérez-Pérez ve Hanson, 2002).

Plazmid bağımlı beta-laktamazlar beş başlık altında toplanabilir:

1. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri
2. Klasik OXA ve PSE enzimleri ve daha nadir dar spektrumlu enzimler
3. TEM ve SHV tipleri GSBL'ler
4. TEM ve SHV'den kaynaklanmayan GSBL'ler
5. İnhibitör dirençli TEM mutantları (Yapar, 2007; Arslan, 2010).

2.10.1. Üriner sistem enfeksiyonları

Üriner sistem enfeksiyonları (ÜSİ)'nda en sık rastlanılan etken *E. coli*'dir, insanların bağırsak florasında bulunan kommensal *E. coli* 'lerden farklı olduğu düşünülmektedir. *E. coli* 'ler aynı zamanda değişik enfeksiyonlara da neden olurlar. Bu enfeksiyonların büyük çoğunluğunu sistit ve piyelonefrit enfeksiyonları oluşturmaktadır. Bu enfeksiyonlara çoğu zaman da az sayıda O sero grubundan (O2,O4,O8,O75,O150 vb) suş etkindir. Bu suşlar üropatojen *E. coli* olarak adlandırılmaktadır ve gastrointestinal kanalda yaygındırlar (Kayser, 2002).

E. coli'ler daha çok konağın bağırsaklarında kolonize olurlar. Oluşturdukları enfeksiyonlar sıklıkla üriner sistem, safra kesesi ve yolları, periton, akciğerler, kemikler, meninksler, prostat, yumuşak doku ve kan dolaşımı gibi başka doku ve organlarda ortaya çıkabilir. Hastane otamında üriner, katater gibi yabancı cisim girişimler *E. coli* ile enfeksiyon gelişmesine neden olurlar. Hastane kaynaklı *E. coli* suşlarında günümüzde antibiyotik direnci giderek artmaktadır. Üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan *E. coli*'nin en önemli virülans faktörü, P fimbriyadır. ÜSİ'na neden olan *E. coli*, Tip I fimbriya, P fimbriya, S fimbriya, FIC fimbriya ve Dr adezinlerle karakterizedir (Guyer ve ark., 2001; Mulvey, 2002; Chromek ve Brauner, 2007).

Bağırsak dışındaki dokularda hastalık yapma yeteneğine katkıda bulunan adezinler (pili), konağın savunma mekanizmalarından kaçış (kapsül), demir sağlama mekanizmaları (aerobaktin), toksin üretimi (hemolizin) gibi virülans faktörleri sayesinde çeşitli enfeksiyonlara neden olurlar (Erayman ve ark., 2001; Turan, 2011).

E. coli ÜSİ'na %50-90' ından sorumlu olup, en sık rastlanılan mikroorganizmadır (Johnson ve Stamm, 1989; Marrs ve ark., 2005).

2.10.2. *E. coli*'nin virülans faktörleri

Virülans, mikroorganizmanın hastalık oluşturma yeteneğidir. Enfekte edici bakterinin sayısını, konağa giriş yolunu ve konağın savunma mekanizmalarından kaçışını, konak hücrelerine tutunmasını (adezyon), mikroorganizmaların çoğalmasını ve yayılmasını, konak hücreye toksinlerle zarar vermesini, etkileyen virülans faktörler bakteriyel patogenezi oluştururlar. ÜSİ'na neden olan *E. coli* (UPEC) suşları, insanların intestinal sisteminde de bulunmasına rağmen, intestinal sistemden üriner sisteme geçişini sağlayan virülans faktörlere sahip olmaları ile diyarejenik ve kommensal suşlarından ayrılırlar. UPEC suşlarının bilinen virülans faktörleri, kapsül oluşturma, fimbriyal adezinler (tip I, P, S/FIC), üroepitelyal hücrelere yapışma yeteneği (adezyon), toksinler [sitotoksik nekrotizan faktör (cnf), hemolizin varlığı, salgılanan ototransporter toksin], idrarda üreme hızı, konuk savunmasından kaçış mekanizmaları (O-spesifik antijen), kolisin V üretimi, antimikrobiyallere direnç gibi biyolojik özellikler sayılabilir (Çizelge 2. 8) (Johnson, 1991; Donnenberg ve Welch, 1995; Morin ve Hopkins, 2002).

Çizelge 2.8. *E. coli* adezinlerinin idrar, insan böbrek ve mesane epitel hücrelerine bağlanmaları

	S fimbriyae	P fimbriyae	Type 1 fimbriyae
Böbrek			
Bowman Kapsülü	güçlü bağlanma	güçlü bağlanma	saptanamadı
Glomerul	güçlü bağlanma	güçlü bağlanma	saptanamadı
Proksimal Tubulus	orta	orta	güçlü bağlanma
Distal Tubulus	orta	orta	zayıf
Toplayıcı kanal	orta	zayıf	zayıf
Damar duvarı	güçlü bağlanma	güçlü bağlanma	güçlü bağlanma
Mesane			
Epitel	orta	zayıf	saptanamadı
Damar duvarı	güçlü bağlanma	güçlü bağlanma	orta
Kas tabakası	zayıf	zayıf	güçlü bağlanma
Bağlayıcı doku	orta	saptanamadı	saptanamadı
İdrar			
Epitel Hücreleri	zayıf	zayıf	zayıf

2.11. *E. coli*'de Bakteriyel Adezinler ve *fimH* Geni

E. coli, UTI'nin% 80'inden sorumlu en sık karşılaşılan patojendir (Wojnicz, 2007; Hojati ve ark., 2015) Bu bakteri, toplum ve hastaneye yatırılan UTI'lerin sırasıyla % 85 ve % 50'sinden sorumludur (Su, 2008; Hojati ve ark., 2015). Üropatojenik *E. coli* (UPEC) suşları, üroepitelyal ve vajinal hücrelere bağlanmaya aracılık eden pili veya fimbriyaları, insan serum bakterisidal aktiviteye dirençi, hemolizin üretimini ve K kapsüler antijenin artan miktarlarını içeren özel virülans faktörlerine sahiptir (Emody ve ark., 2003; Hojati ve ark., 2015). Ayrıca, UPEC suşlarının virülans faktörleri UTI gelişimi açısından önemli bir role sahiptir. UPEC'e bağlı en virülans faktörler arasında adezinler (tip 1 fimbriyalar, p fimbriyalar, curli fimbriyalar, afimbriyal adezyon ve flajellum), aerobaktinler, hemolizinler ve sitotoksik nekrotizan faktör 1 bulunur. Belirtilen virülans faktörler UPEC'in kolonizasyonunda, ekstra- Barsak sağkalımı ve sitopatik etkilerin yaratılmasında önemlidirler. Buna ek olarak, UPEC'in özel virülans faktörlerinin ekspresyonu, UTI'lerin kötüleşmesi için üropatojeniteye katkı sağlayabilir (Soutourina ve Bertin, 2003; Mladin ve ark., 2009; Agarwal ve ark., 2012; Hojati ve ark., 2015). UTI'nin başlangıcı ve gelişimi için önemli bir adım, üroepitelyal hücrelere bakterinin tutunmasıdır. *E. coli* bağlanması, konakçı reseptör olarak çalışan hücre duvarı karbonhidrat rezidülerine bağlanan, bakterilerin ligandları (genellikle bakteriyel fimbriyanın ucuna yerleştirilen küçük proteinler) aracılığındadır (Mladin ve ark., 2009; Hojati ve ark., 2015). Bu nedenle, *E. coli*'nin konakçı alıcı reseptörlerine yapışması,

genellikle konakçı hücre reseptörlerine bakterilerin adezinleri tarafından gerçekleştirilen bir işlemdir (Le Bouguenec, 2005; Hojati ve ark., 2015). Bakteriyel bağlanma bakterilerin, idrar akışı ve mesane boşalması ile mekanik eliminasyona direnmesine ve *E. coli*'nin kalıcılığının artmasına izin verir. *E. coli* UPEC suşları üriner sistem reseptörlerinin tanımlanması ve bağlanması için gerekli olan tip 1 fimbriyalar da dahil olmak üzere farklı adezinler üretirler (Oliveira ve ark., 2011; Hojati ve ark., 2015). Fimbriya'lar adezyondan sorumlu en önemli bakteri yüzey adezinleri olarak tanımlanmaktadır. Genellikle, adezinler fimbriya ve pili olarak adlandırılan çeşitli boyutlarda saç-benzeri yüzey yapıları ile birlikte bulunmaktadır (Soto ve Hultgren, 1999; Mougeot ve ark., 2002; Giray, 2011). Fimbriyalar, 2-7 nm büyüklüğünde, her bakteri ucunda adezin bulunan 100-200 fimbriya taşıyabilir. Fimbriya, ilk olarak 1960 yılında Prof. JP Duguid tarafından tanımlanmıştır ve gram negatif bakterilerle (*E. coli*, *Salmonella* gibi türlerle) ilişkili olarak bulunmuştur (Winberg, 1984; Mougeot ve ark., 2002; Giray, 2011). Üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan *E. coli*'ler, en yaygın olarak Tip 1, P,S/F1C, Dr adhezin familyasına ait fimbriya ile karakterize edilirler (Johnson, 1991; Donnenberg ve Welch, 1995; Morin ve Hopkins, 2002). Fimbriyalar eritrositleri hemaglutine etme yeteneklerine göre mannoz duyarlı hemaglutinasyon (MSHA) ve mannoz dirençli hemaglutinasyon (MRHA) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. P, S, F1 ve Dr fimbriya MRHA fenotipine sahipken, Tip 1 (mannoz duyarlı fimbriya) fimbriya MSHA fenotipine sahiptir (Duguid ve ark., 1978; Maiti ve ark., 1993; Mougeot ve ark., 2002; İnan ve Gürlü, 2004; Giray, 2011). Bu fimbriya enfeksiyonların başlangıç aşamasında çok önemlidir (Synder ve ark., 2005; Turan, 2011). Bu yüzden Tip 1 fimbriya "mannoz duyarlı fimbriya" adı da verilmektedir. Ayrıca bu fimbriya *fim* geni tarafından kodlanmıştır (Yavuzdemir ve ark., 2003; Turan, 2011). Tip 1 fimbriya *E. coli*'nin insan üreteral mukoza epitel hücrelerine ve idrarda normalde bulunan Tamm-Horsfall proteini ya da üro-mukoide tutunmasını da sağlamaktadır. Bu fimbriya ekspresyonunun üriner sistemde bakteriyel adezyonda da esas rol oynadığı düşünülmektedir. *E. coli* suşlarında bulunan Tip 1 fimbriya üro-mukoide kuvvetle adere olmasında bu maddenin mannozdaki zengin oluşu rol oynamaktadır (Tunçkanat, 1993; Turan, 2011).

UPEC'in adezinleri arasında tip 1 fimbriyanın yapışkan altbirimi olan *fimH*, üriner sistem reseptörleri için yüksek tropizm gösteren önemli bir belirteçtir; Böylece, *fimH* yapışma *E. coli*'nin farklı nişlere (uygun yerlere) kolonize edilmesinde önemlidir (Sokurenko ve ark., 2004; Hojati ve ark., 2015). Buna ek olarak, FimH'nin tek nükleotid

polimorfizm (SNP) analizi, UPEC'nin epidemiyolojik tiplemesi için bir tarama aracıdır (Tartof ve ark., 2007; Dias ve ark., 2010; Hojati ve ark., 2015). Bu nedenle, bakteri virulans faktörleri üzerine yapılan araştırmalar, UTI'nin tanı ve önlenmesinde yeni yöntemlerin yaygınlaşmasına ve geliştirilmesine neden olabilir (Hojati ve ark., 2015).

UPEC suşlarının kolonileşme kapasitelerini arttıran birçok virülans faktörü vardır. Ürotelyal hücre yüzeyine yapışma, idrar akışı ile bakteriyel yıkanmayı önleyen ve bakterinin invazyonunu başlatan tip 1 fimbriyanın ucuna yerleşmiş *fimH* yapışması aracılığıyla (Finer ve Landau, 2004; Su, 2008; Hojati ve ark., 2015). *fimH* SNP analizi, toplum ve hastane bağlantılı *E. coli* izolatlarının epidemiyolojik olarak incelenmesi için bir tiplendirme aracıdır ve UPEC'in genotipik analizleri için kolay ve ucuz bir tarama testi olarak kullanılabilir (Tartof ve ark., 2007; Dias ve ark., 2010; Hojati ve ark., 2015).

Hojati ve ark. (2015) *fimH* geninin *E. coli* suşlarının % 90'ından fazlasında tespit edildiği ölçüde, tip 1 fimbriyaların diğer *E. coli* suşları kadar UPEC'ler arasında da mevcut olduğu sonucuna varmışlardır. *fimH*'nin yüksek bağlanma kabiliyeti, hedef hücrelere bakteriyel bağlanmanın artmasına ve *E. coli*'nin patojenisitesinin artmasına neden olmaktadır; Dolayısıyla *fimH*, bakteri yapışmasını ve kolonizasyonunu bloke ederek *E. coli* enfeksiyonlarının önlenmesi için aşı tasarlamak için kullanılabilir. Buna ek olarak, *fimH*, hızlı tespit tabanlı tahlillerin genişletilmesi için bir araç olarak kullanılabilir (Hojati ve ark., 2015).

E. coli 'ler çeşitli fimbriyalar kodlayabilmesine rağmen, *E. coli* bakterisi sadece tek bir fimbriya üretir. Üropatojenik *E. coli*'de (UPEC) bulunan P veya Pap fimbriya, adhezin aracılı doku tropizminin en güçlü örneklerden biridir. P fimbriya olarak isimlendirilmesinin nedeni, özgül olarak eritrosit ve üroepitelyal hücrelerdeki P kan grubu antijenlerine bağlanmasıdır (Tunçkanat, 1993; Turan, 2011). P fimbriya, pap (piyelonefrit ile ilişkili pilus) olarak kodlanmıştır (Synder ve ark., 2005; Turan, 2011) ve bu pilus bir veya daha çok PAIs isimli mobil genetik elementler taşımaktadır. Bu P fimbriya yapısı iki tip ilişkili protein Pap (E, F) gerektirir ve üroepitelyal hücrelerdeki Gal α (1-4) Gal reseptörlerine bağlanan bir reseptör üretirler (Drews ve ark., 2005; Turan, 2011). Pap geni tarafından kodlanan P fimbriya virülans faktörleri olarak değerlendirilirken mekanizması ise daha tartışmalı bir konudur (Wullt, 2003; Turan, 2011). Bu tip fimbriya insan eritrositlerini aglutine etme özelliğine sahip "mannoza

dirençli'dir". Üriner sistem enfeksiyonun'dan izole edilen *E. coli* suşları arasında, sistit izolatlarının %60'ı ve piyelonefritli yetişkinlerden elde edilen izolatların %50 ile 90'ı P fimbriya üretir (Svanborg-Eden ve ark., 1978; Kallenius ve ark., 1981; Latham ve Stamm, 1984; O'Hanley ve ark., 1985; Turan, 2011). Ayrıca bir diğer çalışmalarda ise piyelonefrit ve bakteriyemili hastalardan elde edilen izolatların %100'ü P fimbriya açısından pozitif (Brauner ve ark., 1985; Johnson ve ark., 1987; Otto ve ark., 1993; Turan, 2011). Pap ve Tip 1 geni arasında ters bir ilişki vardır. Tip 1 fimbriya in vivo üriner sistem enfeksiyonu sırasında önemli dercede üst düzenleyici iken, Pap ise alt düzenleyici olarak rol oynar (Synder ve ark., 2005; Turan, 2011).

S fimbriya, tip 1 ve P fimbriya benzer bir yapıya sahiptir. Bu fimbriya üyeleri sıklıkla ekstraintestinal *E. coli* suşlarında erkeklerde görülür. 1-2 mikrometre uzunluğunda, 5-7 nm çapında ve bu S fimbriya denen adezyon üç minör alt tipi SfaG, SfaH ve SfaS'ye ek olarak bir ana alt tipi olarak SfaA'dan oluşmaktadır. SfaS alt tipi S fimbriya'nın ucunda bulunmaktadır (Mulvey, 2002; Antao ve ark., 2009; Giray, 2011). S fimbriya bu protein ile bakteriyel etkileşimi sağlanmaktadır. Ayrıca SfaA alt tipi adezin özeliğindedir ve endotelial hücrelere glikolipidlerine ve plazminojenlere adere olabilmektedir (Mulvey, 2002; Giray, 2011). S fimbriya, konuk dokular içine erişimi kolaylaştırabilir ve piyelonefrit, menenjit, ve sepsis gibi ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olur (Mulvey, 2002; Antao ve ark., 2009; Giray, 2011). Sfa'nın ifadesi sıcaklık, osmolarite, glukoz çevresel koşullara bağlı olarak gibi SfaA ve SfaB olmak üzere iki düzenleyici protein tarafından gerçekleştirilmektedir. S fimbriya; terminal sialyl-galactosid kalıntılarına bağlanması sepesifik olduğu için bu isim verilmiştir (Johnson, 1991; Arslan, 2010). UPEC suşlarında öncelikle Tip 1 fimbriya, P fimbriya ve S fimbriya fimbriyal adezinleri görülür (Dobrindt ve ark., 2001; Arslan, 2010).

2.12. *E. coli*'de Filogenetik Gruplama

Filogenetik gruplandırma için referans teknikler, multilokus enzim elektroforezi ve ribotiplemedir. Ancak bu metodlar karmaşık ve zaman alıcıdır (Selander ve ark., 1986; Desjardins ve ark., 1995a; Ahmed, 2012; Bingen ve ark., 1994). Bu enjellerin üstesinden gelebilmek için, Clermont ve ark (2000) filogenetik grubu belirlemek için *E. coli* zincirini temel alan PZR'a dayalı 3 spesifik filogenetik grup markırı *chuA*, *yjaA* ve *TspE4C2* kullanarak basit ve hızlı bir teknik tanımlamıştır. *chuA* heme transportu için

bir gendir, *yjaA* *E. coli* K12'nın tüm genom dizisinden sonra bir gendir ve onun fonksiyonu hala bilinmemektedir. TspE4C2 DNA fragmentinin anonimidir (Clermont ve ark., 2000; Ahmed, 2012).

E.coli'nin filogenetik tipinin belirlenmesinin genetik geçmiş ve genişletilmiş spektrum betalaktamaz tipi arasında ilişki olduğu için epidemiyolojik önemi büyüktür. Branger ve ark. 2005'te *bla_{SHV}* ve daha az genişletilmiş *bla_{TEM}* tipi tercihen B2 filogenetik grupta bulunurken, *bla_{CTX-M}* tipi filogenetik D grubu ile ilişkili olduğunu rapor edilmiştir (Branger ve ark., 2005; Ahmed, 2012).

Filogenetik analizler ile *E. coli* 4 ana filogenetik gruba (grup A, B1, B2 ve D) ayrılmış ve bakterilerin filogenisi ve virülanslıkları arasında bir ilişki tesbit edilmiştir. Virülant ekstraintestinal suşlar çoğunlukla B2' ye ve daha azı D grubuna ait iken, çoğu kommensal (ortakçı) suş grup A ve B1' e ait olduğu bulunmuştur (Desjardins ve ark., 1995a; Ahmed, 2012).

3. MATERYAL VE METOT

3. 1. Materyal

Numune ve Beyhekim Hastanelerinin Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında, Ocak-Aralık 2014 tarihleri arasında, çeşitli klinik örneklerden (idrar, kan, yara ve yumuşak doku, steril vücut sıvıları) elde edilen toplam 106 *E. coli* izolatın doğrulama testleri yapılarak çalışmaya dahil edilmiştir. *E. coli* izolatları kullanılıncaya kadar Brain Heart infüzyon besiyerinde -80°C‘ de saklanmıştır.

3.1.1. Kimyasal maddeler ve besiyerleri

3.1.1.1. MacConkey agar

Escherichia coli 'nin jeliştirilmesi ve sayılması için selektif katı besiyeri kullanılır. MacConkey agar besiyeri, 50 g/L olacak şekilde ısıtılarak saf su içinde eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir ve 45-50 °C'ye soğutulup petri kutularına 12,5 mL olacak şekilde dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı kahve renkli olup, 25 °C'de pH'sı 7,1±0,2'dir.

3.1.1.2. Mueller-Hinton agar (MHA)

Bu besiyer antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılır.

Beef dehydrated infusion	300g
Casein hydrolysate	17.5g
Nişasta	1.5g
H ₂ O	1000 ml

Ticari olarak sağlanan toz agar, üreticinin önerileri doğrultusunda ve oranlarda dH₂O içerisinde 5-10 dakika çalkalanarak eritilmiş, pH'ı 7,3'e sabitlenmiş ve tamamen çözülme sağlanıncaya kadar kaynatılıp, otoklav ile 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Daha sonra, hazırlanılan erimiş besiyeri 42°C'ye soğutulmuş ve steril plaklara dökülmüştür (Ahmed, 2012).

3.1.1.3. Brain-Heart infusion broth

Beyin, kalp ve pepton özütü	27.5g
(D) Glukoz	2g
Sodyum Klorit	5g
Di-Sodyum Hidrojen Fosfat	2.5g
H ₂ O	1000 ml

3.1.2. Tamponlar ve çözeltiler

3.1.2.1. TAE-tamponu (50X): agaroz jel elektroforez için kullanıldı

Tris	242.3 g
Asetik asit	96% [v/v] 57.1 ml
EDTA	0.5 M (pH 8, 0) 100 ml
H ₂ O	1000 ml (Ahmed 2012)

3.1.2.2. Loading tamponu (5X): agaroz jel elektroforez için kullanıldı

Ficoll Tipi	400 25.0% [w/v]
Bromophenol-mavisi	0.25% [w/v]
TE tamponu içinde çözüldü	

3.1.2.3. EDTA 0.5 M (pH 8)

EDTA	186.12g
H ₂ O	1000 ml

3.1.2.4. Sodyum klorür (3M)

Sodyum klorür	175.3 g
H ₂ O	1000 ml

3.1.3. Kullanılan antibiyotikler

Çalışmada hem çift disk sinerji yöntemi için hemde antibiyotik duyarlılık testi için amoksisilin+klavulanik asit (AMC) (30 µg), azteronam (ATM) (30 µg), sefpodoksim (CPD) (10 µg), seftazidim (CAZ) (30 µg), sefuroksim (CXM) (30 µg), seftriakson (CRO) (30 µg), sefotaksim (CTX) (30 µg), ampisilin (AM) (10 µg), klindamisin (DA) (2 µg), sefepim (FEB) (30 µg), siprofloksasin (CIP) (5 µg), gentamisin (CN) (10 µg), imipenem (IPM) (10 µg), piperasilin/ tazobaktam (TPZ) (110 µg) antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

3.1.4. Elektroforez için kullanılan çözeltiler ve kimyasallar

4 µl 6X yükleme boyası solüsyonu, 2 µl PZR ürünü (DNA), 10 µl DNA ladder, 2 gr agaroz, sırasıyla agaroz jel ve elektroforez tankında yürütme yapmak için; 100 ml ve 500 ml TE (Tris-Asetik – asit-EDTA) tamponu.

3.1.5. Kullanılan diğer gereçler

Steril eküvyon, bek alevi, iğne öze, tek kullanımlık plastik steril öze, gram boyama seti (kristal viyole, lügol, denatüre alkol, sulandırılmış fuksin), hassas terazi, etüv, ışık mikroskobu, 2 ve 0,2 ml.'lik steril tek kullanımlık kapaklı ependorf tüpleri, pipet ve pipet uçları, soğutucu, dondurucu, steril pudrasız tek kullanımlık eldiven.

3.2. Metot

3.2.1. Klinik örneklerden izole edilen *E. coli* izolatlarının tanımlanması

Konya bölgesindeki bazı hastanelerin laboratuvarlarındaki klinik örneklerden elde edilen *E. coli* izolatlarının doğrulanmasının yapılabilmesi için MacConkey agar besiyerine ekimleri yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İzolatlar önce teşhis amacıyla klasik biyokimyasal yöntemlerden İMVİC yöntemi kullanılarak, üre, indol, glikoz, laktoz, sükroz fermentasyonu özellikleri belirlenmiş ve hareket manitol agar besiyerinde belirlenmiştir.

3.2.2. Bakteri örneklerinin MacConkey agar plak besiyerine ekimi

Enterobacteria 'lardan *E. coli* 'ler fakültatif anaerobtur. En iyi 35 - 37° C' de ve CO₂ 'siz ortamda ürerler. Koloniler 18-24 saat sonra görünür hale gelirler. Yara, balgam, idrar, kan, boğaz sürüntüsü gibi klinik örnekler öze aracılığıyla EMB agar besiyerine ekilmiştir. Petriler 37°C de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra laktozu fermente eden izolatlar, laktoz fermentasyonu sonucu oluşan asit nedeniyle düz, parlak, kabarık, pembe-kırmızı koloniler oluşturmuşlardır. Daha sonra bu izolatlarda biyokimyasal testler yapılmıştır (Bilgehan, 2004).

3.2.3. Biyokimyasal testler

Kültürden alınan *E. coli* izolatları Gram boyama yapılarak doğrulama yapılmıştır. Sonra kültürden TSI besiyerine yatay ve dikey ekim yapılmıştır. 4-5 saat sonra kontaminasyon kontrolü, glukoz kullanımı, gaz oluşumu, H₂S reaksiyonu yapılarak gözlenmiştir. Ayrıca indol, sitrat ve Voges-Proskauer reaksiyonlarına bakılarak 24 saat sonra değerlendirilmiştir. Tanımlanan bu izolatlar Tryptic Soy Broth (%20 Gliserol içeren) besiyerine inokule edilerek 24 saat 37° C'de inkübasyon sonrası - 80° C'de dondurulmuştur (Bilgehan, 2004).

3.2.3.1. Üç şeker besiyerine ekim

Tri şeker iron (TSI) agara iğne öze yardımıyla alınan saf koloni besiyerinin dik şekilde batırılmak suretiyle ekilmiş yatık kısmının yüzeyine de zik zaklar çizilerek ekim tamamlanmıştır. Sonuçlar 37°C'de bir gün inkübasyon süresi sonunda değerlendirilmiştir. Bu besiyeri bakterilerin glikoz, laktoz ve sükroz üzerindeki etkilerini ve H₂S oluşturup oluşturmadıklarını gözlemlemek için kullanılmıştır. Glikozu fermente edip, laktozu ve sükrozu parçalayamayan bakteriler dipte sarı, yatık alanda ise kırmızı renk oluştururlar. Dipte ve yatık alanda sarı renk oluşmuşsa, bakterinin laktozu veya sükrozu ya da ikisini birden fermente edebildiği anlaşılmaktadır. Fermantasyon esnasında gaz oluşturması besiyerinin içinde gaz kabarcıkları ya da besiyerinin parçalanmasının görülmesi ile anlaşılmaktadır (Bilgehan, 2004). Böylece şüpheli *E. coli* varsa (Çizelge 3. 1)'a göre değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.1. TSI agar besiyerinde bakterilerin reaksiyon sonuçları

Bakteri	Glikoz	Laktoz	Sükroz	Gaz	H ₂ S
<i>E.coli</i>	+	+	+	+	-

3.2.3.2. İMVİC testleri

3.2.3.2.1. İndol testi

Şüphe edilen *E. coli* kolonisi iğne öze yardımıyla triptofanlı besiyerine ekimi yapılmış ve bir gece 37°C'deki inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri triptofonaz enzim aktivitesine sahipse Kovaks ayırıcı damlatıldığında (2 ml'ye 5 damla) indol halkası oluşur. Halka kırmızı renkteyse indol testi pozitif olanlar *E. coli* olarak değerlendirilmiştir, sarı renkteyse negatif olarak değerlendirilmiştir (Bilgehan, 2004).

3.2.3.2.2. Voges - proskauer testi

Bazı bakteriler, glikozu parçalayarak nötral bir ürün olan asetoin (asetil metil karbinol) oluşturur. Asetoin, potasyum hidroksid (KOH) varlığında okside olarak diasetil meydana getirir. Bu ürün ise alfa naftol ile reaksiyona girdiğinde kırmızı renk oluşturur. *E. coli*'de negatiftir. Şüphe edilen *E. coli* kolonisi iğne öze yardımıyla Glukoz-Fosfat Broth besiyerine ekimi yapılmıştır. Etüvde, 37°C'de 2-7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra üzerine, 1ml % 40'lık KOH, daha sonra 3ml % 5'lik alfa naftol ilave edilmiştir. Besiyerinin hava ile temas etmesi için kuvvetli çalkalandıktan sonra 2-5 dakika içinde kırmızı renk oluşması testin pozitif olduğunu göstermiştir (Bilgehan, 2004).

3.2.3.2.3. Metil kırmızı testi

Şüphe edilen *E. coli* kolonisi iğne öze yardımıyla alınıp glukoz fosfatlı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonunda glukozu kullanarak, karışık asit fermentasyon son ürünleri nedeniyle pH 4.5'un altında asit oluşturduysa besiyerine metil kırmızısı damlatarak (2,5 ml'ye 5 damla) besiyeri kırmızıya dönmektedir. Besiyeri

kırmızı ise pozitif olarak değerlendirilmiş ve *E. coli* oldukları tesbit edilmiştir, sarı kalmışsa negatif olarak değerlendirilmiştir (Bilgehan, 2004).

3.2.3.2.3. Sitrat testi

Şüphe edilen *E. coli* kolonisi iğne öze yardımıyla alınıp Sitrat besiyerine ekimi yapılmıştır. Sitrat testinde bakterinin karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadığına bakılmaktadır. Besiyeri içinde bromtimal mavisi içerdiğinden dolayı besiyeri yeşilden maviye dönüyorsa bakteri sitratı kullanıyor demektir ve test pozitifdir. Renk değişimi olmazsa test negatiftir ve bu izolatlar *E. coli* olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3. 2) (Bilgehan, 2004).

Çizelge 3.2. *E. coli* türü için İMVİC test sonuçları

Bakteri	İndol	Metil kırmızısı	Sitrat	Voges-Proskauer
<i>E.coli</i>	+	+	-	-

3.2.3.4. Üreaz testi

Şüphe edilen *E. coli* kolonisi iğne öze yardımıyla alınıp üre besiyerine ekimi yapılmıştır. Besiyeri 35°C'de 18-24 saat inkübasyon sonucunda değerlendirilerek besiyerinin rengi sarıdan kırmızıya dönüşürse üre pozitif olarak kabul edilir, dönüşmediğinde ise negatif olarak kabul edilmiştir, ve bu koloninin *E. coli* olduğunu düşünülmüştür (Bilgehan, 2004).

3.2.3.5. Hareket testi

Şüphe edilen *E. coli* kolonisi iğne öze yardımıyla alınıp Mio medium besiyerine ekilmiştir. İğne öze yardımıyla alınan saf koloni besiyerine dik bir şekilde tek bir hatta batırılıp çekilmiş 37°C'de bir günlük inkübasyon sonucunda besiyeri değerlendirilmiştir. Değerlendirmede eğer özenin ekim hattı boyunca üreme varsa bakteri hareketsiz (negatif), ama yaygın üreme olduysa dağınık bir şekilde olduysa bakteri hareketli test (pozitif) olarak kabul edilmiştir. Hareket testi pozitif olanlar *E. coli* olarak değerlendirilmiştir (Bilgehan, 2004).

3.2.4. GSBL'lerin belirlenmesi için çift disk sinerji yöntemi

GSBL varlığının gösterilmesi için, çift disk sinerji yöntemi uygulanmıştır. Bunun için, 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer hazırlanan bakteri süspansiyonları, 4 mm kalınlığındaki Mueller Hinton agar yüzeyine yayılarak ekilmiştir. Agarın merkezine amoksisilin + klavulanik asit (AMC) (30 µg) yerleştirilmiş, etrafına 2-3 cm aralıklarla seftriakson (CRO) (30 µg), sefotaksim (CTX) (30 µg), seftazidim (CAZ) (30 µg), aztreonam (ATM) (30 µg), sefuroksim (CXM) (30 µg), sefpodoksim (CPD) (30 µg), diskleri yerleştirilmiştir. Plaklar bir gece 35°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, antibiyotik disklerine ait inhibisyon zonlarının, amoksisilin/klavulanik asit yönünde genişleme göstermesi veya diskler arasındaki bölgede bir inhibisyon alanının gözlenmesi, GSBL varlığı açısından pozitiflik olarak kabul edilmiştir (Drieux ve ark., 2008).

3.2.5. *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi

Elde edilen 102 *E. coli* izolatının antibiyotik duyarlılık testleri CLSI önerileri doğrultusunda, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri için hazırlanan Muller-Hinton besiyeri 90 mm çabındaki petrilere 4 mm kalınlığında olacak şekilde döküldükten sonra donmaya bırakılmıştır. Saf *E. coli* kültürlerinden 1-2 koloni alınarak steril bir tüp içinde serum fizyolojik ile 0.5 McFarland eşdeğere göre süspansiyon hazırlanmıştır. Her bir *E. coli* suşuna ait hazırlanan süspansiyonlardan silgeçlerle alınarak Muller-Hinton agarın yüzeyine her tarafa yaydırılacak şekilde ekimleri yapılmıştır. Ucu geçirilerek steril edilmiş pensetle kenardan 2 cm, birbirlerinden 2 cm aralık olacak şekilde antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Plaklar 15 dk oda ısısında bekletildikten sonra, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir, her bir disk çevresindeki inhibisyon zon sınırları ölçülmüştür. Kullanılan antibiyotik diskleri, çift disk sinerji yönteminde kullanılan antibiyotiklere ilave olarak ampisilin (AM) (10µg), gentamisin (CN) (10µg), imipenem (IPM) (10µg), sefepim (FEB) (30µg), klindamisin (DA) (2µg), siprofloksasin (CIP) (5µg), piperasilin-tazobaktam (TPZ) (110µg) antibiyotik diskleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Antibiyotiklerin zon çapları

Antibiyotik	% Direnç (n)	% Duyarlı (n)
AMC	19<	19>
ATM	21<	24>
CPD	21<	21>
CTX	20<	23>
CRO	20<	23>
CAZ	19<	22>
CXM	18<	18≥
DA	-	-
AM	14<	14≥
CN	13<	17≥
IPM	16<	22≥
CIP	19<	22≥
TPZ	13<	16≥
FEB	21<	24≥

3.2.6. *E. coli* İzolatlarının DNA izolasyonu

Bakteriden DNA izolasyonu Ausubel ve ark. (1991)'nin önerdiği metoda göre yapılmıştır. Kanlı agar üzerinde üretilen suşlar, 5 ml brain heart infüzyon sıvı kültür ekim yapılarak istenilen yoğunlukta üretilmiştir. Kültür 2 dk 10.000 rpm de santrifüj ile çöktürülmüş ve süpernatant atılmıştır. Pellet 567µl TE tamponunda süspanse edilmiştir. 30µL %10 SDS ve 3µL proteinaz K eklenerek, 37°C de 1 saat inkübe edilmiştir. 100µL 5M NaCl eklenerek. 80µL CTAB/NaCl solüsyonu ilave edilerek 10 dk 65°C'de sıcak su banyosunda tutulmuştur. Eşit hacimde (700-800µL) kloroform/izoamilalkol ilave edilerek 5 dk 12.000 rpm ' de santrifüj edilmiştir. Üstteki faz ayrı bir eppendorf tüpüne alınarak, üzerine (300, 420) µl izopropanol eklenmiş ve vortekslenmiştir. Süpernatantı dökülen tüp üzerine % 75 etanol eklenerek DNA tekrar 12000 rpm'de +4°C'de 5 dk santrifüj işlemi uygulanmış ve alkol döküldükten sonra tüpler kurutulmuştur. Pellet 100µl TE tamponunda yavaşça süspanse edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri çalışma yapılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir (Ausubel ve ark., 1991).

3.2.7. *E. coli* izolatlarının multipleks PZR ile GSBL genlerinin belirlenmesi

GSBL üreten *E. coli* izolatlarının TEM, SHV, CTX-M, OXA GSBL'leri enzimlerinin kodlayan *blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA*, *blaCTX-M* genleri özgül primerler

kullanılarak mltipleks PZR ile taranmıştır. Bu alışmada GSBL genleri için 4 çift primer kullanılmıştır (izelge 3. 3).

Çizelge 3.4. GSBL genleri için primerler

Gen adı	5'-3' primer	Monstein ve ark. (2007)
<i>blaTEM</i>	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	
<i>blaSHV</i>	AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
<i>blaCTX-M</i>	CGCTTTGCGATGTGCAG ACCGCGATATCGTTGGT	
<i>blaOXA</i>	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	

İlk olarak 10x Reaksiyon Tampon 2,5 µl, dNTP mix 1 µl, primerlerin herbirinden 1 µl, Taq polimeraz 0,15 µl, distile su 16, 35 µl bileşenleri içeren bir master mix hazırlanmıştır. PZR tüplerindeki toplam hacim 25 µl olacak şekilde, her tüpe 23 µl master mix, 2 µl kalıp DNA ilave edilmiştir. İlk denatürasyon 95°C'de 15 dk 30 döngü, 94 °C'de 30s, annealing 60°C 30s, uzatma 72°C'de 2 dk. 72°C'de 10dk. son bir uzama aşaması gerçekleştirilmiştir (Monstein ve ark., 2007). % 2'lik agaroz jel elektroforez ile 100 V de 25dk. yürütülerek jel görüntüsü DNA görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarılmıştır.

3.2.8. *E. coli* izolatlarının filogenetik gruplamasının belirlenmesi

Tripleks PZR  primer (*chuA*, *yjaA* ve *TspE4.C2*) ifti ile gerçekleřtirilecektir (Al-Mayahie 2014) (izelge 3. 4).

Çizelge 3.5. Filogenetik genleri için primerler

Gen adı	5'-3' primer	Al-Mayahie (2014)
<i>yjaA</i>	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
<i>chuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>TspE4.C2</i>	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CGCGCCAACAAAGTATTACG	

PZR toplamdaki toplam hacim 10 µl olacak şekilde ilk olarak 10x Reaksiyon Tampon 1 µl, dNTP mix 0.08 µl, primerlerin herbirinden 0.4 µl, Taq polimeraz 0.08 µl, distile su 4.44 µl bileşenleri içeren bir master mix hazırlanmıştır. PZR koşulları şu şekildedir: denatürasyon, 94°C'de 5 dakika, 94°C'de 30 saniye 30 döngü, Uzatma, 55°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye ve 72°C 7 dakika final sıcaklık gerçekleştirilmiştir. %2'lik agaroz jel elektroforez ile 100 V' de 25dk. yürütülerek jel görüntüsü DNA görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarılmıştır.

Sonuçlar Clermont ve ark. (2000)'na göre yorumlanmıştır:

Grup A (*chuA*-, *yjaA* ±, *TspE.C2*-)

Grup B1 (*chuA*-, *yjaA* ±, *TspEC2* +)

Grup B2 (*Chua* + *yjaA* + *spE.C2* ±) ve

Grup D (*Chua* + *yjaA*-, *TspE.C2* ±)

3.2.9. *fimH* geninin PZR ile belirlenmesi

fimH geni spesifik bir çift primerle çoğaltılmıştır (Johnson ve Stell, 2000) (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.6. *fimH* geni için primer

Gen adı	5'-3'primer	
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGTA	Johnson ve Stell (2000)

PZR reaksiyonu ilk olarak 10x Reaksiyon Tampon 2.5 µl, dNTP mix 0.2 µl, primerlerin herbirinden 1 µl, Taq polimeraz 0.2 µl, distile su 11.35 µl bileşenleri içeren bir master mix hazırlanmıştır. PZR koşulları şu şekilde: denatürasyon, 94°C'de 4 dakika, primerlerin bağlanması, 94°C'de 30 saniye 33 döngü, uzatma, 58°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika ve 72°C 7 dakika final sıcaklık gerçekleştirildi. %2'lik agaroz jel elektroforez ile 100 V de 25dk. yürütülerek jel görüntüsü DNA görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarılmıştır.

3.2.10. *fimH* geninin dizi analizi

E. coli izolatlarında tesbit edilen *fimH* geninin PZR ürünleri MacroGen'e ve RefGen'e gönderilerek dizi analizi yaptırılmıştır. Diziler Aligner bilgisayar programı ile hizalanmıştır.

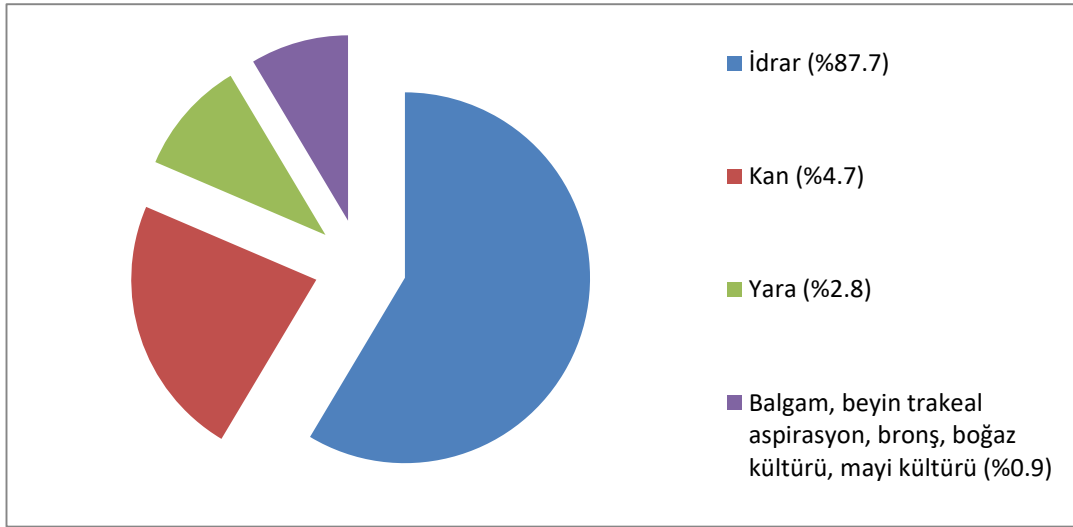
3.2.11. *fimH* geninin dizi analizine göre filogenetik ağacın elde edilmesi

Aligner programı ile hizalanan diziler Mega 5.0 bilgisayar programında Maximum Likelihood istatistik analizine göre bir filogenetik ağaç elde edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. *E. coli* İzolatların Toplanması

Konya’da bazı hastanelerin Mikrobiyoloji Laboratuvarına başvuran, yatan hastalar ve poliklinik hastalarından çeşitli kültür örnekleri toplanmıştır. Çeşitli kültürlerden 106 *E. coli* suşu izole edilmiştir. 106 *E. coli* izolatının % 87.7’si idrar, % 4.7’si kan, % 2.8’i yara, % 0.9’u balgam, % 0.9’u beyin trakeal aspirasyon, % 0.9’u bronş, % 0.9’u boğaz kültürü, % 0.9’u mayi kültürlerinden izole edilmiştir (Şekil 4.1).



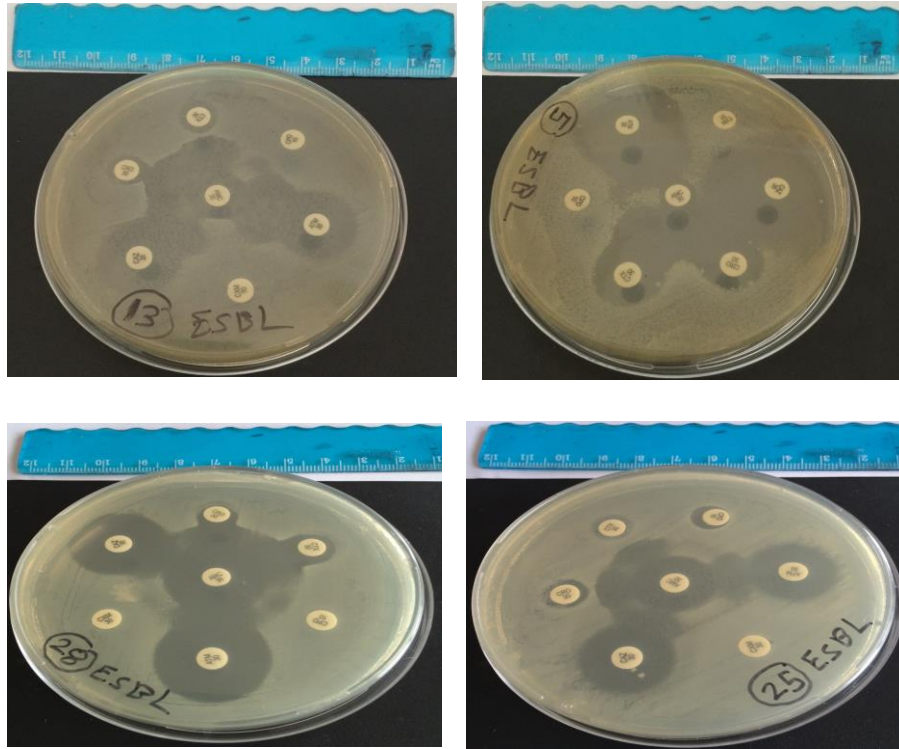
Şekil 4.1. 106 klinik materyallere göre yüzde(%) dağılımları

4.2. *E. coli* İzolatlarının İdentifikasyonu

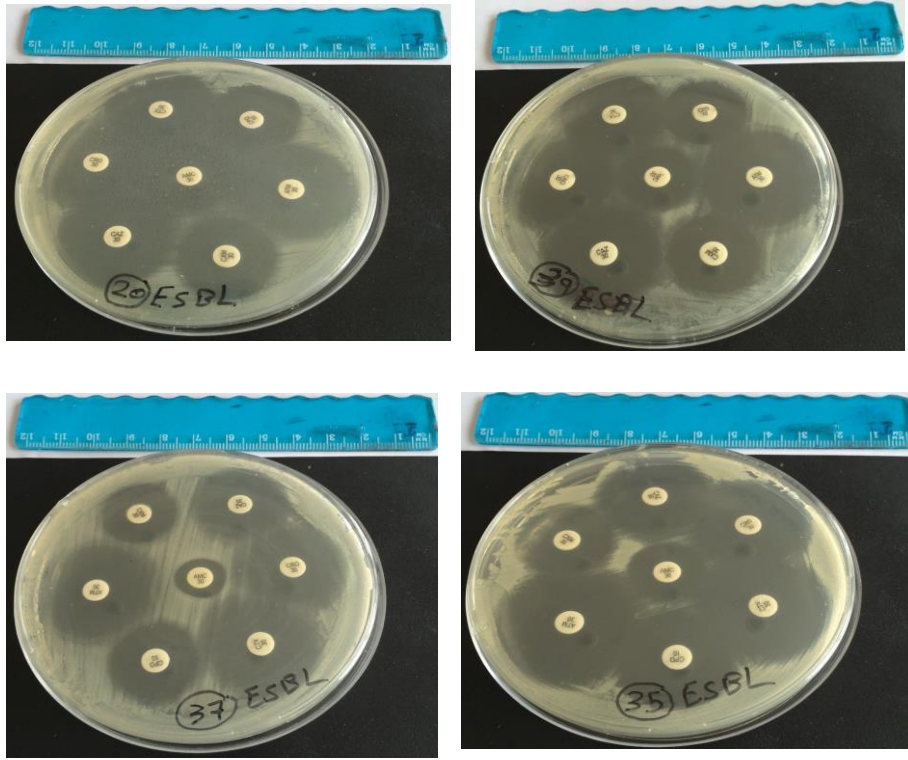
Kültürden alınan *E. coli* izolatları yeniden Gram boyama yapılarak doğrulama yapılmıştır. Gram negatif çıkanların TSI besiyerine yatay ve dikey ekimleri yapılmıştır. Bir gece inkübasyondan sonra glukoz kullanımı, gaz oluşumu, H₂S reaksiyonu yapılarak ve indol, sitrat ve Voges-Proskauer reaksiyonlarına bakılarak identifikasyonu yapılmıştır.

4.3. *E. coli* İzolatlarının GSBL Üreten Fenotipik Olarak Belirlenmesi

Doğrulan klinik kaynaklı *E. coli* izolatları çift disk sinerji yöntemi ile GSBL pozitif ya da negatif olarak belirlenmiştir. Merkeze amoksisilin + klavulanik asit (AMC) (30 µg) yerleştirilmiş, etrafına 3 cm aralıklarla seftriakson (CRO) (30 µg), sefotaksim (CTX) (30 µg), seftazidim (CAZ) (30 µg), aztreonam (ATM) (30 µg), sefuroksim (CXM) (30 µg), sefpodoksim (CPD) (30 µg) diskleri yerleştirilmiş ve antibiyotik disklerine ait inhibisyon zonlarının, amoksisilin/klavulanik asit yönünde genişlemesi GSBL pozitif olarak kabul edilmiştir. 106 *E. coli* izolatının 22'si (%20.75) fenotipik olarak GSBL pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil 4. 2).



A)



B)

Şekil 4.2. A) *E. coli* izolatlarında GSBL pozitif olanlar

B) *E. coli* izolatlarında GSBL negatif olanlar

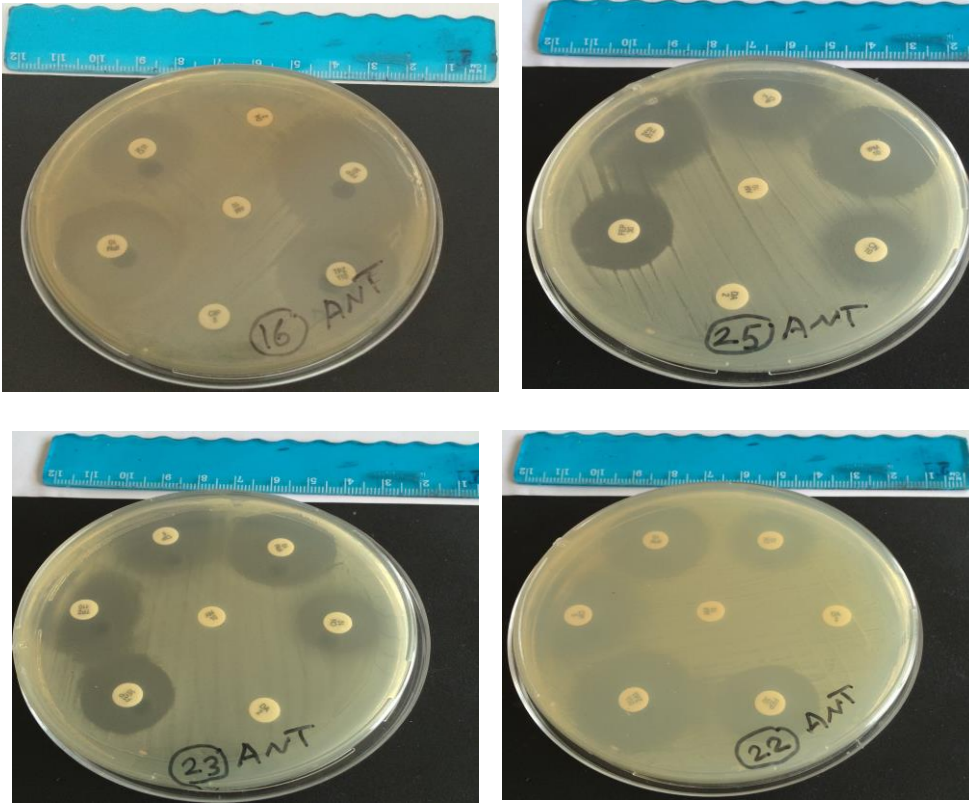
4.4. *E. coli* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

E. coli izolatlarının disk difüzyon sinerji yöntemi için kullanılan amoksisilin + klavulanik asit (AMC) (30 µg), seftriakson (CRO) (30 µg), sefotaksim (CTX) (30 µg), seftazidim (CAZ) (30 µg), aztreonam (ATM) (30 µg), sefuroksim (CXM) (30 µg), sefpodoksım (CPD) (30 µg),'e ilave olarak ampisilin (AM) (10µg), gentamisin (CN) (10µg), imipenem (IPM) (10µg), sefepim (FEB) (30µg), klindamisin (DA) (2µg), siprofloksasin (CIP) (5µg) ve piperasilin-tazobaktam (TPZ) (110µg) antibiyotiklere Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile duyarlılıkları belirlenmiştir. CLSI standartlarına göre zon çapları dikkate alınarak duyarlı (S) veya dirençli (R) olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *E. coli* izolatının fenotipik GSBL sonuçları ve antibiyotik duyarlılıkları

Bakte ri NO.	Kaynak	GSB L	AM C	AT M	CP D	CT X	CR O	CA Z	CX M	D A	A M	C N	IP M	CI P	TP Z	FE B
1	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
2	İDRAR	+	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	I	S	S	S
4	İDRAR	-	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R
5	İDRAR	+	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
6	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
7	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S
9	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S
10	Beyin Trakeal aspirasyon	-	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	I	S	S	R
11	YARA	+	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	S	S	R
12	İDRAR	+	S	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S	S	S
13	İDRAR	+	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S	S	R
14	İDRAR	-	R	S	R	S	I	S	S	R	R	I	I	S	S	S
15	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	I	S	S	S
16	İDRAR	-	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S
17	İDRAR	+	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S	S	R
18	İDRAR	-	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
19	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
20	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
21	İDRAR	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R
22	İDRAR	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
23	İDRAR	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
24	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
25	İDRAR	+	S	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S	S	R
26	İDRAR	-	S	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	S	S	R
27	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
28	İDRAR	+	S	I	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S
29	KAN	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
30	BALGA M	+	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	S	R
31	KAN	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
32	İDRAR	-	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
33	İDRAR	-	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
34	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
35	KAN	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S
36	KAN	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S
37	İDRAR	-	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S
38	İDRAR	+	S	I	R	R	R	I	R	R	R	S	S	R	S	R
39	YARA	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S
40	İDRAR	+	S	R	R	R	R	I	R	R	R	I	S	S	S	R
41	İDRAR	+	S	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	R	S	R
42	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
43	BRONŞ	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S
44	İDRAR	-	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S
45	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S
46	İDRAR	-	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
47	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
48	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
49	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
50	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
51	İDRAR	-	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
52	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
53	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S
54	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
55	KAN	-	R	I	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	I	S
56	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
57	İDRAR	-								R						
58	İDRAR	+	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
59	İDRAR	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S

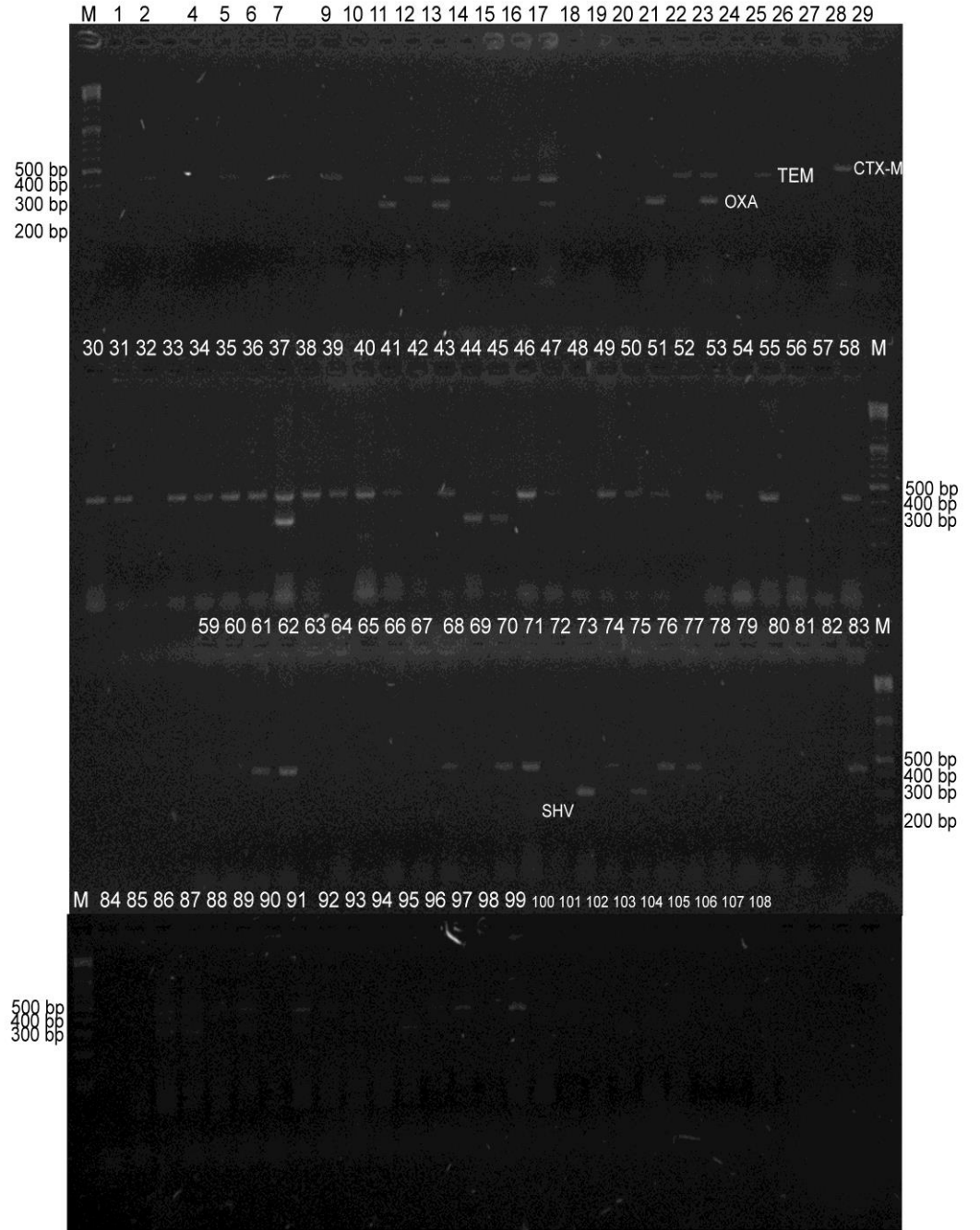
60	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
61	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
62	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
63	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
64	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
65	İDRAR															
66	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S
67	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
68	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
69	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
70	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
71	İDRAR	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
72	YARA	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
73	İDRAR	–	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
74	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
75	İDRAR	–	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R
76	İDRAR	–	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	I	R
77	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
78	İDRAR	–	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
79	İDRAR	–	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	I	I	R
80	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
81	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
82	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
83	İDRAR	–	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
84	İDRAR															
85	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
86	İDRAR	+	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R
87	İDRAR	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
88	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
89	İDRAR	+	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
90	İDRAR	–	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
91	İDRAR	+	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	S	R
92	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
93	İDRAR															
94	İDRAR	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
95	İDRAR	–	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
96	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
97	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
98	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
99	İDRAR	–	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S
100	BOĞAZ KÜLTÜ RÜ	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
101	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
102	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
103	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
104	MAYİ KÜLTÜ RÜ	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
105	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
106	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
107	İDRAR	–	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
108	İDRAR	–	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S



Şekil 4.3. *E. coli* izolatlarının antibiyotik sonuçları

4.5. *E. coli* İzolatlarının GSBL Üreten Genotipik Olarak Belirlenmesi

E. coli izolatlarında GSBL'leri kodlayan *bla*_{TEM} (431 bp), *bla*_{SHV} (214 bp), *bla*_{OXA} (296 bp), *bla*_{CTX-M} (501 bp) genleri multipleks PZR ile taranmıştır. 106 *E. coli* izolatından 70'sinin (%66.03) GSBL ürettiği belirlenmiştir. 106 *E. coli* izolatının genotiplendirme sonucunda 47'si (% 67.14) *bla*_{TEM}, 15'i (%21.42) *bla*_{CTX-M}, 18'i (%25.71) *bla*_{OXA} ve 3'ü (%4.28) *bla*_{SHV} olmak üzere tek bir kodlanan GSBL genini taşıdığı görülmüştür. En yaygın iki geni taşıyan kombinasyon *bla*_{OXA} + *bla*_{TEM}'dir (% 8.57). Bunu takip eden kombinasyonlar *bla*_{CTX-M} + *bla*_{OXA} (% 5.71), *bla*_{TEM} + *bla*_{SHV} (% 4.28), *bla*_{OXA} + *bla*_{SHV} (%1.42)'dir. Tek başına veya diğer GSBL tipleriyle kombine olarak en yaygın GSBL tipi TEM'dir (çizelge 4.2).



Şekil 4.4. *E.coli* izolatlarının CTX-M, TEM, OXA, SHV gen bölgelerinin mütipleks PZR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi (Marker: Fermentas SM0333)

Çizelge 4.2. Genotipik olarak GSBL pozitif olanlar

NO.	Fenotipik	Genotipik				Filogenetik grup				<i>fimH</i>
	GSBL	CTXm	TEM	OXA	SHV	ChuA 279bp	yjaA 211bp	TspE4.C2 152bp		
1	–	–	–	–	–	+	+	+	B2	+
2	+	–	+	–	–	+	+	+	B2	+
4	–	–	–	–	–	+	–	–	D	+
5	+	–	+	+	–	+	–	–	D	+
6	–	–	–	–	–	+	+	+	B2	+
7	–	–	+	–	–	–	–	–	A	–
9	–	–	+	–	–	–	+	+	B1	+
10	–	–	–	–	–	–	–	+	B1	–
11	+	–	–	+	–	–	+	–	A	+
12	+	–	+	–	–	–	+	–	A	–
13	+	–	+	+	–	+	–	–	D	+
14	–	–	+	–	–	+	–	–	D	–
15	–	–	+	–	–	+	+	+	B2	+
16	–	–	+	–	–	–	–	+	B1	+
17	+	–	+	+	+	+	–	+	D	+
18	–	–	–	–	–	–	–	–	A	–
19	–	–	–	–	–	+	+	+	B2	+
20	–	–	–	–	–	–	–	–	A	–
21	+	–	–	+	–	+	+	+	B2	+
22	+	–	+	–	–	–	+	–	A	+
23	+	–	+	+	–	+	–	+	D	+
24	–	–	–	–	–	+	+	+	B2	+
25	+	–	+	–	–	+	–	–	D	+
26	–	–	–	–	–	–	+	–	A	+
27	–	–	–	–	–	–	–	–	A	–
28	+	+	–	–	–	+	+	+	B2	+
29	–	–	–	–	–	–	–	–	A	+
30	+	–	+	–	–	+	+	+	B2	+
31	–	–	+	–	–	+	–	+	D	+
32	–	–	–	–	–	+	–	–	D	–
33	–	–	+	–	–	+	+	+	B2	+
34	–	–	+	–	–	+	–	–	D	+
35	–	–	+	–	–	–	–	+	B1	+
36	–	–	+	–	–	–	–	+	B1	+
37	–	–	+	+	–	+	+	–	B2	+
38	+	–	+	–	–	+	+	+	B2	+
39	–	–	+	–	–	+	–	+	D	+
40	+	–	+	–	+	–	–	–	A	+
41	+	–	+	–	–	+	+	+	B2	+
42	–	–	–	–	–	+	+	+	B2	+
43	–	–	+	–	–	–	–	+	B1	+
44	–	–	–	+	–	+	+	+	B2	+
45	–	–	+	+	–	+	+	+	B2	+
46	–	–	+	–	–	+	+	–	B2	+
47	–	–	+	–	–	+	+	–	B2	+
48	–	–	–	–	–	+	+	+	B2	+
49	–	–	+	–	–	+	–	–	D	+
50		–	+	–	–	+	–	–	D	+
51	–	–	+	–	–	–	+	–	A	+
52	–	–	–	–	–	+	–	+	D	+
53	–	–	+	–	–	+	–	+	D	+
54	–	–	–	–	–	+	+	+	B2	+
55	–	–	+	–	–	+	+	+	B2	+
56	–	–	–	–	–	–	+	–	A	+

57		-	-	-	-	+	+	+	B2	+
58	+	-	+	-	-	-	+	-	A	+
59	-	-	+	-	-	+	+	+	B2	+
60	-	-	+	-	-	-	+	-	A	+
61	-	-	+	-	-	+	+	+	B2	+
62	-	-	+	-	-	+	+	+	B2	+
63	-	-	-	-	-	-	-	-	A	+
64	-	-	+	-	-	+	-	+	D	+
65		-	-	-	-	+	+	+	B2	+
66	-	-	-	-	-	-	+	-	A	+
67	-	-	-	-	-	+	+	+	B2	+
68	-	-	+	-	-	+	-	-	D	+
69	-	-	-	-	-	+	+	+	B2	+
70	-	-	+	-	-	+	-	-	D	+
71	+	-	+	-	+	-	+	-	A	+
72	-	-	+	-	-	-	-	-	A	-
73	-	-	-	+	-	-	+	-	A	+
74	-	-	+	-	-	-	+	-	A	+
75	-	-	-	+	-	+	+	+	B2	+
76	-	-	+	-	-	+	+	+	B2	+
77	-	-	+	-	-	+	+	+	B2	+
78	-	-	-	-	-	-	+	-	A	+
79	-	-	-	-	-	+	+	+	B2	+
80	-	-	-	-	-	+	+	+	B2	+
81	-	-	-	-	-	+	+	+	B2	+
82	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-
83	-	-	+	-	-	-	+	+	B1	+
84		-	-	-	-	+	-	+	D	+
85	-	-	-	-	-	+	+	+	B2	+
86	+	+	-	+	-	+	+	+	B2	+
87	+	+	-	+	-	+	+	+	B2	+
88	-	+	-	-	-	+	+	+	B2	+
89	+	+	-	+	-	+	+	-	B2	+
90	-	-	-	-	-	+	+	+	B2	+
91	+	+	-	+	-	-	+	-	A	+
92	-	+	-	-	-	+	+	+	B2	+
93		-	-	-	-	+	+	-	B2	+
94	+	-	-	-	-	-	+	+	B1	+
95	-	-	-	+	-	+	-	-	D	-
96	-	+	-	-	-	+	+	+	B2	+
97	-	+	-	-	-	+	+	+	B2	+
98	-	-	-	-	-	-	+	+	B1	+
99	-	+	-	-	-	+	+	+	B2	+
100	-	-	-	-	-	+	+	+	B2	+
101	-	+	-	-	-	-	+	-	A	+
102	-	+	-	-	-	+	+	+	B2	+
103	-	-	-	+	-	+	+	+	B2	+
104	-	-	-	+	-	+	+	+	B2	+
105	-	+	-	-	-	+	+	-	B2	+
106	-	-	-	-	-	+	+	+	B2	+
107	-	+	-	-	-	+	+	+	B2	+
108	-	+	-	-	-	+	+	-	B2	+

Çizelge 4.3. *E. coli* izolatlarının genotipik belirlenmesi

Genetik olarak GSBL pozitif	<i>E.coli</i>	%
	(n = 70)	%66.03
A. Bir GSBL geni bulunduranlar		
<i>bla</i> _{CTX-M}	15	21,42
<i>bla</i> _{TEM}	47	67,14
<i>bla</i> _{OXA}	18	25,71
<i>bla</i> _{SHV}	3	4,28
B. iki geni birlikte bulunduranlar		
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M}	0	0
<i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{CTX-M}	4	5,71
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{OXA}	6	8,57
<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{SHV}	0	0
<i>Bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV}	3	4,28
<i>Bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{SHV}	1	1,42
C. üç GSBL geni birlikte bulunduranlar		
<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{OXA}	0	0
<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV}	0	0
<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{SHV}	0	0
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{SHV}	1	1,42

4.6. GSBL Üreten *E. coli* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

70 GSBL pozitif olanlar arasında % 98.41'inin TPZ' ye duyarlı olduğu, % 96.82'sinin IPM'e duyarlı olurlarken %100'ü DA 'ya dirençlidir. Bu beta-laktamaz üreten izolatların en çok sefalosporin grubu antibiyotiklere dirençli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Sadece GSBL pozitif olanlar antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotik	% Direnç (n)	% Orta duyarlı (n)	% Duyarlı (n)
AMC	38.09(24)	0(0)	63.49(40)
ATM	31.74(20)	1.58(1)	68.25(43)
CPD	38.09(24)	0(0)	63.49(40)
CTX	38.09(24)	0(0)	63.49(40)
CRO	38.09(24)	0(0)	63.49(40)
CAZ	11.11(7)	17.46(11)	73.01(46)
CXM	38.09(24)	0(0)	63.49(40)
DA	100(63)	0(0)	0(0)
AM	88.88(56)	0(0)	12.69(8)
CN	26.98(17)	1.58(1)	73.01(46)
IPM	1.58(1)	3.17(2)	96.82(61)
CIP	33.33(21)	0(0)	68.25(43)
TPZ	0(0)	3.17(2)	98.41(62)
FEB	30.15(19)	0(0)	71.42(45)

4.7. *E. coli* İzolatlarının Çoklu Antibiyotik Direnç İndeksi (MAR İndeksi)

Üç veya 3'ten daha fazla antibiyotiğe dirençli *E. coli* izolatı olduğu için, (% 52.47) Krumperman (1983)'e göre çoklu antibiotik direnç indeksi resistance (MAR) hesaplanmıştır. MAR indeksi 0.07-0.85 arasında değişmiştir. 102 *E. coli* izolatın 31'inde (% 30.69) MAR indeksi 0.2'nin üzerinde olduğu görülmüştür. Üç izolatı (71, 87. 94) en yüksek MAR indeksine (0.85) sahiptir. Bu izolatlar kullanılan antibiyotiklerin 12'sine direnç göstermiştir. Sadece klindamisin dirençli olan suşlar en düşük MAR indeksine (0.07) sahip olmuştur. MAR risk değerlendirilmesi (düşük ve yüksek riski ayırt etmek için) ve antibiyotiklerin aşırı kullanıldığı çevreyi belirlemek için iyi bir araçtır (Krumperman, 1983; Paul ve ark., 1997). Beklenildiği gibi GSBL'lerin çoklu antibiyotik dirençleri oldukça yüksek olup MAR indeksi 0.5 ile 0.85 arasındadır ve en az 7 antibiyotiğe birden dirençlidirler (Çizelge 4.5).

4.5. *E. coli* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profilleri

Direnç tipi	Direnç Profili	No	%	İzolatlar	MAR İndeksi
I	DA	28	27.45	1,6,19,20,24,29,42,47*,52,54,56,59*,63,64*,66,67,69,72*,81,82,85,97*,98, 100,102*,104*,106,108*,15*,31*,34*,49*,60*,61*,62*,68*,74*,77*,80,96*,101*,103*,105*	0.07
II	DA, AM	15	14.70	48	0.14
III	DA, CIP	1	0.98	73*,78,90	0.14
IV	ATM, DA	3	2.94	92*	0.14
V	DA, CN	1	0.98	7*	0.21
VI	DA, AM, IPM	1	0.98	9*,35*	0.21
VII	DA, AM, CIP	2	1.96	18	0.21
VIII	ATM, CPD, DA	1	0.98	27,70*,88*	0.21
IX	DA, AM, CN	3	2.94	33*,46*,50*,51*,83*,95*,107*	0.21
X	DA, AM, AMC	7	6.86	14*	0.28
XI	AMC, CPD, DA, AM	1	0.98	16*, 44*, 99*	0.28
XII	AMC, DA, AM, CIP	3	2.94	36*, 39*, 43*, 45*, 53*	0.28
XIII	DA, AM, CN, CIP	5	4.90	75*	0.35
XIV	ATM, CPD, CAZ, DA, FEB	1	0.98	37*	0.35
XV	AMC, DA, AM, CN, CIP	1	0.98	2*, 55*	0.5
XVI	AMC, CPD, CTX, CRO, CXM, DA, AM	2	1.96	12*	0.5
XVII	ATM, CPD, CTM, CRO, CXM, DA, AM	1	0.98	26	0.5
XVIII	AMC, CPD, CTX, CRO, CXM, DA, FEB	1	0.98	28*	0.5
XIX	CPD, CTX, CRO, CXM, DA, AM, CIP	1	0.98	5*	0.57
XX	AMC, CPD, CTX, CRO, CXM, DA, AM, CN	1	0.98	25*, 40*	0.5
XXI	ATM, CPD, CTM, CRO, CXM, DA, AM, FEB	2	1.96	32	0.57
XXII	AMC, CPD, CTX, CRO, CAZ, CXM, DA, AM	1	0.98	38*	0.57
XXIII	CPD, CTX, CRO, CXM, DA, AM, CIP, FEB	1	0.98	10	0.64
XXIV	ATM, CPD, CTX, CRO, CXM, DA, AM, CN, FEB	1	0.98	13*, 17*, 76*, 79	0.64
XXV	AMC, ATM, CPD, CTX, CRO, CXM, DA, AM, FEB	4	3.92	41*	0.64
XXVI	ATM, CPD, CTX, CRO, CXM, DA, AM, CIP, FEB	1	0.98	4	0.71
XXVII	AMC, CPD, CTX, CRO, CAZ, CXM, DA, AM, CN, FEB	1	0.98	11*	0.71
XXVIII	AMC, ATM, CPD, CTX, CRO, CXM, DA, AM, CN, FEB	1	0.98	22*, 23*	0.71
XXIX	AMC, ATM, CPD, CTX, CRO, CAZ, CXM, DA, AM, FEB	2	1.96	91*	0.71
XXX	ATM, CPD, CTX, CRO, CXM, DA, AM, CN, CIP, FEB	1	0.98	21*	0.78
XXXI	AMC, ATM, CPD, CTX, CRO, CAZ, CXM, DA, AM, CIP, FEB	1	0.98	30*, 86*	0.78
XXXII	AMC, ATM, CPD, CTX, CRO, CXM, DA, AM, CN, CIP, FEB	2	1.96	58*,89*	0.78
XXXIII	ATM, CPD, CTX, CRO, CAZ, CXM, DA, AM, CN, CIP, FEB	2	1.96	71*, 87*, 94	0.85
XXXIV	AMC, ATM, CPD, CTX, CRO, CAZ, CXM, DA, AM, CN, CIP, FEB	3	2.94		

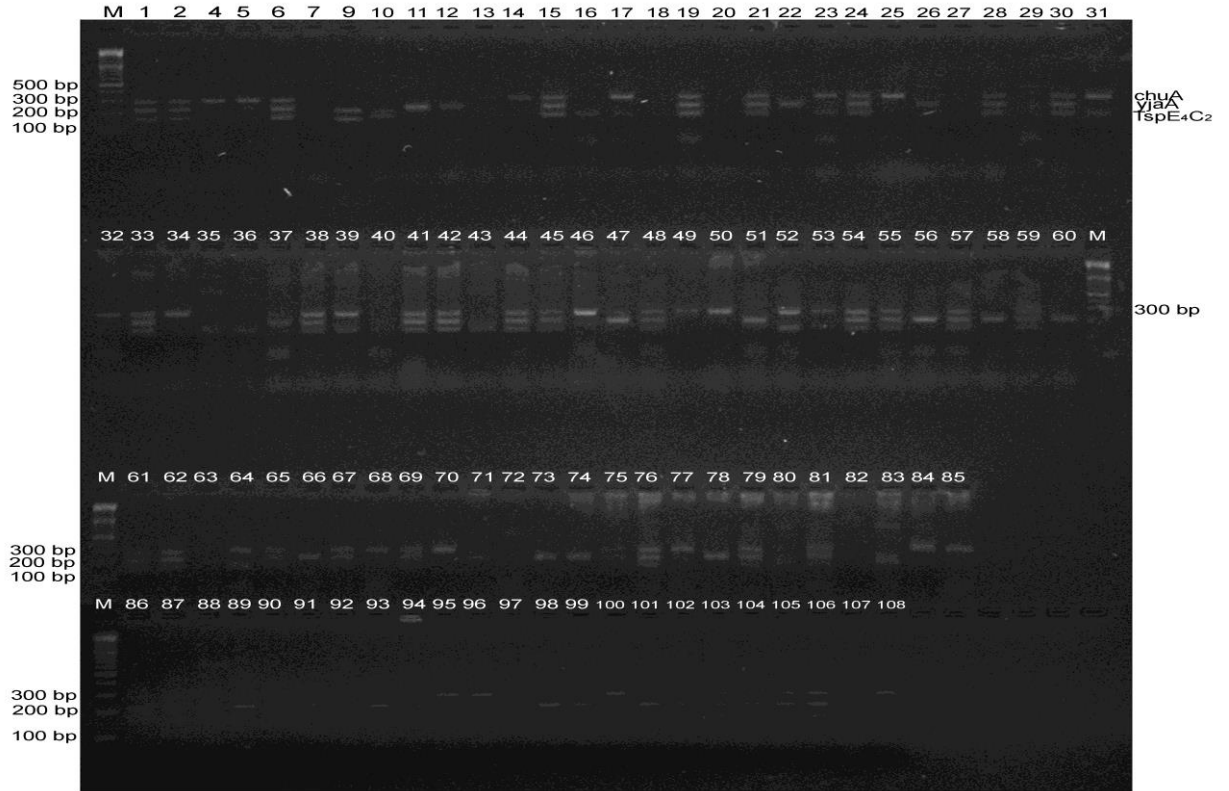
*GSBL pozitif

MAR, Çoklu antibiyotik Direnci.

4.8. *E. coli* İzolatlarının Multipleks PZR ile Filogenetik Gruplama Sonuçları

chuA, *yjaA*, *TspE4C2* genlerinin yalnız veya birlikte bulunup bulunmamasına göre multipleks PZR sonucunda filogenetik gruplama yapılmıştır (Şekil 4. 5). Çalışılan tüm klinik 106 *E. coli* izolatının 53'ü (% 50) B2, 24'ü (% 22.64) A, 20'si (% 18.86) D, 9'u (% 8.49) B1 grubunda yer almıştır. UPEC'ler en çok B2 filogenetik grubunda toplanmıştır (Çizelge 4.6). 106 *E. coli* izolatlarının 70'i GSBL pozitif olanların 34 (% 48.57)'ü B₂, 16 (% 22.85)'sı D, 14 (% 20)'ü A, 6 (% 8.57)'sı B₁ grubunda yer aldığı

görülmüştür. GSBL negatif olan 36 adet *E. coli* izolatının 19'u (% 52.77) B₂ grubunda toplanmıştır. Genel olarak değerlendirildiğinde *E. coli* izolatları en çok B₂ ve A filogenetik grubunda görülmektedir, daha azı ise D ve B₁ grubunda görülmüştür (Çizelge 4.7).



Şekil 4.5. *E. coli* suşlarındaki (*chuA*, *yjaA*, *TspE4.C₂*) gen böljelerinin PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (Marker: Fermentas SM0333)

Çizelge 4.6. ExPEC izolatların filogenetik gruplaması

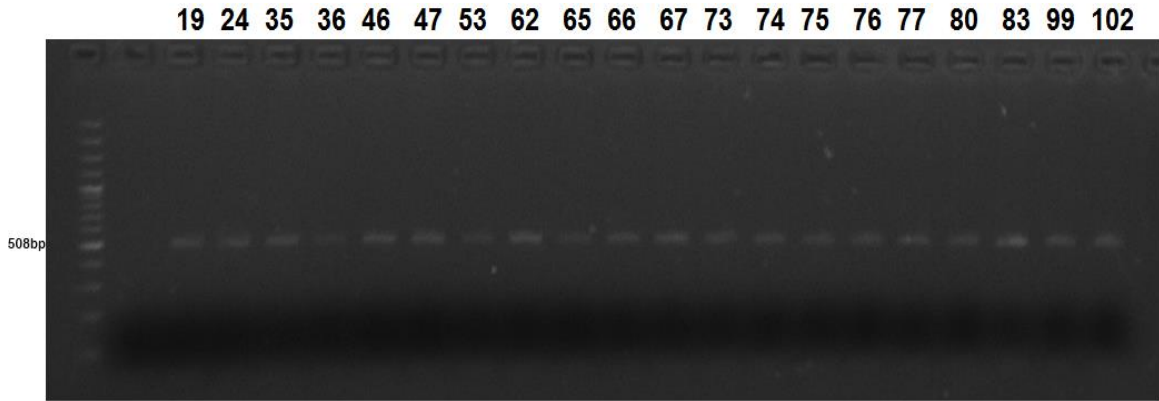
ExPEC	Filogenetik gruplama				Toplam
	Grup A	Grup B1	Grup B2	Grup D	
UPEC	21(%22.58)	5(%5.37)	49(%52.68)	18(%19.35)	93(%100)
Diğerleri	3(%23.07)	4(%30.76)	4(%33.76)	2(%15.38)	13(%100)
Toplam	24(%22.64)	9(%8.49)	53(%50)	20(%18.86)	106(%100)

Çizelge 4.7. Filogenetik Grublama %leri

70 GSBL pozitif		36 GSBL negatif	
A grubu	14 (%20)	A grubu	10 (%27.77)
B ₂ grubu	34 (%48.57)	B ₂ grubu	19 (%52.77)
D grubu	16 (%22.85)	D grubu	4 (%11.11)
B ₁ grubu	6 (%8.57)	B ₁ grubu	3 (%8.33)

4.9. *E. coli* İzolatlarında *fimH* Geninin Belirlenmesi Sonuçları

fimH geni PZR’da spesifik bir çift primerle çoğaltılmıştır. Çalışılan toplam 106 ExPEC izolatının 95’inde (%89.62) *fimH* geninin varlığı (508 bp) belirlenmiştir (Şekil 4. 6, Çizelge 4.2). Çalışma materyalimizin büyük çoğunluğunu oluşturan idrar yolu enfeksiyonuna neden olan üropatojenik *E. coli* (UPEC) izolatlarının 93’ünde (% 87.73), 84 (% 90.32) adet *fimH* geninin varlığı tesbit edilmiştir (Çizelge 4.8). GSBL üreten toplam 70 *E. coli*’nin 57 (% 81.42)’sinde *fimH* geni gözlenmiştir.



Şekil 4.6. *E.coli* izolatlarında *fimH* gen böljelerinin PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (Marker: Fermentas SM1158)

Çizelge 4.8. ExPEC izolatların *fimH* sonuçları

ExPEC	<i>fimH</i> pozitif (n=95)	<i>fimH</i> negatif (n=11)	Toplam
UPEC	84 (%90.32)	9 (%9.67)	93 (%100)
Diğerleri	11(%84.61)	2 (%15.38)	13 (%100)
Toplam	95(%89.62)	11(%10.37)	106 (%100)

4.10. *E. coli* İzolatlarının *fimH* Geninin Dizi Analizi

Toplam çalışılan 106 *E. coli* izolatının *fimH* geninin PZR ile çoğaltılması sonucunda 95’i pozitif çıkmasına rağmen, PZR ürünleri elektroforezde parlak olanlardan seçilmiş 86 izolatın 356 bp’lik *fimH* DNA dizisi aligner bilgisayar programı ile hizalanmıştır. Bu hizalama JN408573, JN408574, JN408577 accession numaralı GenBank dizileri ilave edilerek yapılmıştır (Şekil 4.7).

```

#JN408573 TAATTGCCGT GCTTATTTTG CGACAGACCA ACAACTATAA CAGCGATGAT
TTCCAGTTTG TGTGGAATAT TTACGCCAAT AATGATGTGG TGGTGCCTAC TGGCGGCTGC
GATGTTTCTG CTCGTGATGT CACCGTTACT CTGCCGACT ACCCTGGTTC AGTGCCAATT
CCTCTTACCG TTTATTGTGC GAAAAGCCAA AACCTGGGGT ATTACCTCTC CGGCACAACC
GCAGATGCGG GCAACTCGAT TTTCACCAAT ACCGCGTCGT TTTCACCAGC GCAGGGCGTC
GGCGTACAGT TGACGCGCAA CGGTACGATT ATTCCAGCGA ATAACACGGT ATCGTTAGGA GCAGTA-
#JN408574 .....C.....
.....C.....G.....
.....C.....
#JN408577 .....T..C....G....G...
.....T.....
#1 A...G....A.T..CCC.C.A.....C.....G.....C.....
#2 A.....A.T..CCC.C.A.....T.....T....TG.CGG G....T.TT
.G..CG.AA. AGTA...CAG ..A....G.. T.C.GAA.AA ..AAC...AA ..A.GA...A
GGC..A...A GGGTAG..CG .G....AGT. ..GG..A..A C.AG..CGAA ....C.C...
C.C....G.C ..C..CTC.. C..TTTT... TG..TAAATA .CC...A.A. TG.AA..A..
C..T..T.T. ...G.GT..G TC.C.A.... T.C..G..A. ....TGA... .G.C.....A..-
#3 .....C.....G.....C.....
#6 A...G....A.T..CCC.A.A.....C.....G.....T..A.....
#7 .....C.....G.....C.....
#8 A...GC....A.T..CCC.A.A.....A.....

```

```

#9      A...GC.... ..A.T..CCC .CCA.....
.....T.....
.....A.....
.....-
#10     A...G.... ..A.T..CCC .C.A.....
.....C.....
.....G.....
.....C.....
.....-
#11     A...G.... ..A.T..CCC .C.A.....
.....C.....
.....G.....
.....A.....
.....C.....
.....-
#12     AAA.GC.... ..T..CCC .CC..CC..C .....T..
.....
.....TC..C.....T.. A.....
.....-
#13     AAA.G.... ..A.T..CCC .CC.CA.... CAC.....C .....
.....A.....
.....C.....
.....-
#14     A...G.... ..A.T..CCC .CC.C.... CAC.....C .....
.....C.....
.....T.. A.....
.....-
#15     AAA.G.... ..T..CCC .CGG.CG... ..TG..
.....
.....TC..C.....T.. A.....
.....-
#16     A...G.... ..A.T..CCC .C.A.....
.....C.....
.....G.....
.....T.....
.....C.....
.....-
#19     A...G.... ..A.T..CCC .C.A.....
.....
.....C.....
.....T..G.....T.. ..G.....
C....GT.A. ....G. ....G.C.... ..T.....G ..A.C.... ....CG-

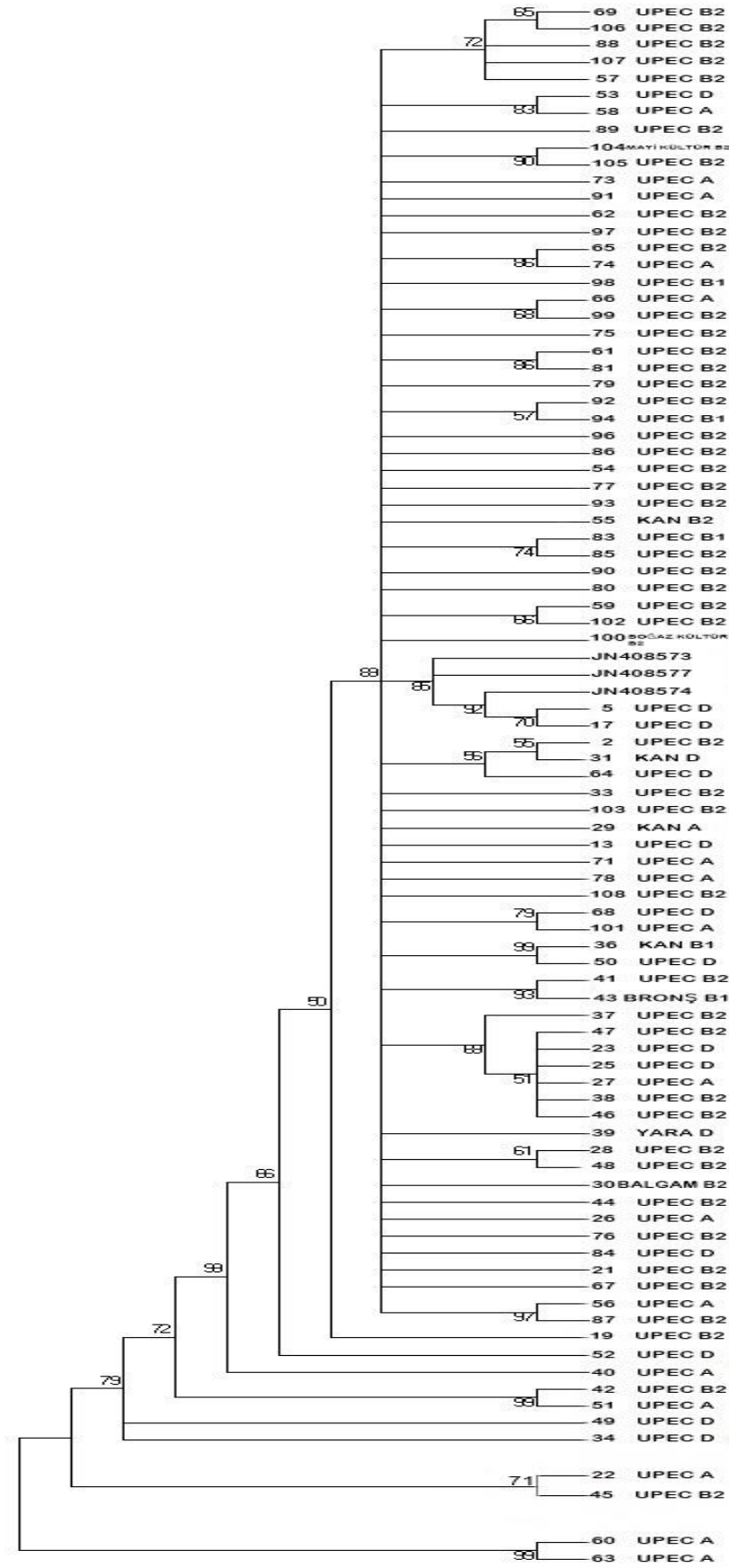
```

Şekil 4.7. *fimH* Dizi analizi hizalaması

4.11. *fimH* Geninin Dizi Analizine Göre Filogenetik Ağacının Elde Edilmesi

Hizalanan *fimH* varyantlarının dizileri filogenetik ağaç oluşturmak için Mega 5.0 bilgisayar programına aktarılmıştır. Daha sonra Maximum Likelihood istatistik metodu kullanılmış ve 750 bootstrap replikasyonu ile Tamira-Nei modeli oluşturarak bir filogenetik ağaç elde edilmiştir (Şekil 4. 8).

356 bp'lik *fimH* DNA dizileri gen bankası ile kıyaslandığında polimorfik sayısının 341, monomorfik nükleotit sayısının 16, singleton variable bölgesinin 34, parsimony informatik bölgesinin 307 olduğu DNA SP 5.10 (DNA Sequence Polymorphic) bilgisayar programı ile hesaplanmıştır. Baz değişikliklerinden 40'ı transversiyon, 17'si transisyon şeklindedir. Ayrıca nükleotit farklılıklarının ortalama sayısı: 57.415, nükleotit çeşitliliği $P_i:0,16128$, haploit sayısının 77 olduğu belirlenmiştir. Dizilerin polimorfizm oranı oldukça yüksek olduğundan, dizilerin varyasyonları filogenetik ağaca yansımış ve %90 benzerlikte 65 *fimH* tipi oluşmuştur.



Şekil 4.8. Maximum Likelihood istatistik metoduna göre elde edilen filogenetik ağaç

Son yıllarda antimikrobiyallere karşı gelişen direnç dünyanın birçok bölgesinde giderek artmaktadır (Woods, 2006). Beta laktam antibiyotiklere karşı gelişen direnç Gram negatif bakterilerin oluşturdukları enfeksiyonların tedavisinde soruna yol açmaktadır (Stürenburg ve Mack, 2003). Enfeksiyonlara neden olan mikroorganizmalarda GSBL varlığı tedavi stratejisinin belirlenmesinde önemlidir (Bradford, 2001; Spahi, 2006; Iraz, 2009). Özellikle GSBL olarak adlandırılan enzim grubu; sefotaksim, seftazidim, seftriakson gibi oksimin beta laktamlara ve aztreonama direnç gelişiminden sorumludur (Drusano ve 1998; Akman, 2008). GSBL üreten suşlarla oluşan enfeksiyonlar penisilinler ve sefalosporinlerle tedavi edilemez. Bu nedenle hastanelerde bu tip mikroorganizmaların tanımlanması, uygun şekilde tedavi edilmesi ve gerekli tedbirlerin alınması gerekmektedir (Queenan ve ark., 2004; Öztürk ve ark., 2010).

Bizim bulgularımıza göre *E. coli* suşları % 20.75 oranında fenotipik olarak GSBL pozitifken % 66.03 oranında genotipik olarak bir veya birden fazla GSBL geni için pozitifdir. Sharma ve ark. (2010) % 70 oranında disk difüzyon testi ile GSBL pozitif *E. coli*'leri, % 84 oranında ise *bla_{TEM}* ve *bla_{SHV}* genlerini belirleyerek GSBL pozitif olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar fenotipik testlerin GSBL subtipini belirleyemediğini (Sharma ve ark., 2010), moleküler metotların hassas olduğunu (Nüesch-Inderbilen ve ark., 1996), GSBL belirlemede PZR'ın güvenilir bir metot olduğu belirtmişlerdir (Grover ve ark., 2006). GSBL tespiti için fenotipik doğrulama testleri yanlış pozitif veya negatif olabilir. Tek bir bakteri izolatu tarafından birden fazla farklı beta-laktamaz türlerinin üretimine yapısal AmpC β -laktamazları üreten organizmalar tarafından GSBL üretimi, inokulum etkisi ve substrat afinitelerinin değişmesi dahil olmak üzere birden fazla faktör buna katkıda bulunur (Rawat ve Nair, 2010; Bora ve ark., 2014). Gram negatif bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin hastaya uygulanıp uygulanmaması konusunda karar verirken çift disk sinerji testi'nin tek başına kullanılmaması gerektiği rapor edilmiştir (Öztürk ve ark., 2010). Fenotipik olarak pozitif sonuç veren 22 izolatın 21'i (94 nolu suş hariç) genotipik olarak da pozitif çıkmıştır. Bu 94 nolu suşun genotipik olarak negatif çıkmasını bizim çalıştığımız sınırlı sayıdaki GSBL genini içermediği fakat diğer GSBL genlerini içerebileceği şeklinde yorumlayabiliriz. Yüksek GSBL prevalansına sahip raporlar olduğu gibi (fenotipik; % 73.58, genotipik olarak; % 78.52) (Bora ve ark., 2014), aksine % 15.7 ve % 31 gibi düşük oranlarda da fenotipik olarak *E. coli*'lerin

GSBL ürettiği bildirilmiştir (Kaftandzieva ve ark., 2011). Yine benzer şekilde Pakistan’da (Shahid ve ark., 2004) % 28.5 oranında nozokomiyal *E. coli* suşların, poliklinik *E. coli* izolatlarının % 6.25 oranında GSBL üretimini saptamışlardır.

Bu çalışmada GSBL genlerinden en yaygın *bla_{TEM}* geni iken en az rastlanan *bla_{SHV}* geni olmuştur. Benzer şekilde Kaftandzieva ve ark. (2011) en prevalent genotipin *bla_{TEM}* (% 63.3) olduğunu rapor etmişlerdir. Fakat bizim sonuçlarımızın aksine çalıştıkları genler arasında (TEM, CTX-M, SHV, OXA) CTX-M tipinin yüksek prevelansta olduğunu bildiren çalışmaları da mevcuttur (Durmaz ve ark., 2001; Dallenne ve ark., 2010; Chandramohana ve Revella, 2012; Ludden ve ark., 2014). Aynı şekilde Bora ve ark. (2014), 3 GSBL genotipi arasında CTX-M’nin (%88.67) yaygın prevelant genotipi olduğunu bulmalarına rağmen en az SHV genine rastlamışlardır. Chandra ve ark. (2014) onkoloji hastanesinin yoğun bakım ünitesinden elde ettikleri GSBL üreten *E. coli* suşlarında *bla_{SHV}* geninin negatif olduğunu bulmuşlardır.

Başka bir çalışmada da klinik *E. coli* suşları % 0.9 imipeneme direnç göstermişlerdir (Durmaz ve ark., 2001). Bizim çalışmamız bu sonuçların destekler aksine % 94.11 oranında imipeneme duyarlı olduğunu göstermiştir. Fenotipik olarak negatif olan fakat genotipik olarak pozitif olan ve sadece *bla_{TEM}* genini taşıyan bir suşun (7 nolu) sadece imipeneme dirençli olduğu gözlenmiştir. 5 suşun ise imipeneme orta duyarlı olduğu görülmüştür.

Çoklu ilaç dirençli *E. coli* izolatlarının sıklığı bizim sonuçlarının aksine (% 52.94), % 86.95 oranında yüksek bulunmuştur (Chakrawarti ve ark., 2015). Bizim antibiyogram sonuçlarımıza benzer şekilde (% 95.23), Del Castillo ve ark. (2013) ve Riaz ve ark. (2011) bütün GSBL üreten *E. coli* izolatlarının imipeneme duyarlı olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada en yüksek duyarlılıkta olan piperasillin-tazobaktam (% 97.05) ve imipenem (% 94.11) *E. coli*’lere karşı (Uysal ve Durak, 2012; Riaz ve ark., 2011)’in çalışmalarını destekler şekilde en etkili antibiyotikler olmuştur. En yüksek direnç DA ve AM’ye olan bu çalışma ile uyumlu olarak birçok çalışma klinik *E. coli*’lerin AM’e karşı oldukça yüksek direnç profili gösterdiğini bulmuşlardır % 100 AM, (Chandramohana ve Revella, 2012); % 55 AM, (Giray, 2011); % 75 AM, (Shahi ve ark., 2013). % 100 klindamisine dirençli olduğunu bulduğumuz sonuçların tam aksine başka bir çalışmada bütün *E. coli*’lerin %100 duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Shahi ve ark., 2013). Diğer çalışmalarla uyumlu olarak CTX-M GSBL pozitif *E. coli* izolatları en çok seftazidime duyarlı, seftoksime ve seftriaksona daha direnç göstererek, seftazidime kıyasla seftoksime ve seftriaksonu daha iyi hidrolize etmişlerdir

(Lewis ve ark., 2007; Yan Hu ve ark., 2013). Rakotonirina ve ark. (2013) tarihinden rapor edildiği gibi çoğu GSBL'lerin MAR indeksi yüksekti diğer bir deyişle çoklu antibiyotik direncine sahip olduğunu rapor edilmiş. Diğer GSBL genlerine nazaran CTX-M üreten izolatların çoğunlukla multiple antibiyotik direnci gösterdiği rapor edilmiş olan bir çalışmanın (Durmaz ve ark., 2001) aksine bu çalışmada TEM üreten izolatlar (% 64.28) en çok çoklu antibiyotik direnç gösteren GSBL tipi olmuştur. Bunu takip eden % 60 oranında CTX-M ve % 57.14 oranında OXA olmuştur. İki GSBL genini birlikte üreten üç farklı kombine ise 0.35- 0.85 gibi oldukça yüksek MAR indeksine sahip oldukları görülmüştür. MAR risk değerlendirilmesi (düşük ve yüksek riski ayırt etmek için) ve antibiyotiklerin aşırı kullanıldığı çevreyi belirlemek için iyi bir araçtır (Krumperman, 1983; Paul ve ark., 1997).

İnsan kommensal suşları genellikle filogenetik grup A ve B1' den köken alırken, ExPEC suşlarının çoğu B2 ve daha azı D filogenetik grubunda yer aldığı rapor edilmiştir (Desjardins ve ark., 1995; Russo ve Johnson, 2003). Bu çalışmanın aksine, daha önceki çalışmalar GSBL üreten izolatların B2, D, A filogenetik gruplarında dağıldığını gösterirken, GSBL üretmeyenlerin hiçbirinin grup D' de kümelenmediğini ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmada, B2 ve A grupları bir başka çalışma ile uyumlu olarak en yaygın gruplar olmuştur (Chandramohana ve Revella, 2012). Buna benzer şekilde Mshana ve ark., (2009) çalışmaları *E. coli* suşlarının çoğunun B2'de, azının ise B1'de olduğunu rapor etmesine rağmen bizim sonuçlarımızın aksine CTX-M-15 GSBL genini içerenlerin çoğunun B1'de toplandığını, UPEC'lerin de A grubunda toplandığını göstermişlerdir. Fakat bu tez çalışmasında CTX-M üreten *E. coli*'lerin neredeyse tamamı B2 filogenetik grubunda 2 izolatın ise A grubunda yer aldığı bulunmuştur. B1'de hiç CTX-M üreten izolata rastlanmamıştır. Yine bu çalışmada diğerinin aksine UPEC izolatlarının çoğu B2'de yer almıştır. Bizim bu sonuçlarımızı Ahmed (2012) destekler şekilde CTX-M üreten virulent ekstraintestinal *E. coli* izolatlarının büyük bir çoğunluğunun B2'de yer aldığını rapor etmiştir. Alizade ve ark. (2014) 58 GSBL üreten UTI (UPEC) izolatlarının çoğunun (% 43.10) A grubunda, en azının (% 3.44) ise B1 grubunda olduğunu göstermişlerdir fakat bunun aksine bizim sonuçlarımız, GSBL üreten UTI izolatlarının çoğunun filogenetik grup B2' da yer aldığını, en azının ise grup B1' de bulunduğunu ortaya koymuştur.

Tip-1 fimbriya'yı kullanan özgül adezyon mekanizmaları ile idrar yolu epitel hücrelerine yapışan UPEC'lerin bu yeteneği sonucunda idrar yolu enfeksiyonları (UTI) meydana gelir. UPEC suşları ürogenital yolda kolonize olma kapasitelerini artıran pek

çok virulans faktöre sahiptir. Üreteryal hücre yüzeylerine yapışma, bakteriyal invazyonu başlatan ve idrar akışıyla bakteriyal yıkanmayı önleyen tip-1 fimbriyanın ucuna yerleşmiş fimH adezyonu tarafından gerçekleştirilmektedir. Türkiye'deki hastanelerde UTI vakalarıyla ilişkili yatan hasta ve ayakta tedavi edilen hastalardan izole edilen UPEC'lerde fimH virulans faktörü ile ilgili çalışmalar oldukça nadirdir. Bu çalışmada hem *fimH* geninin prevalansı incelenmiş hemde dizi analizine göre *fimH*'ın genotiplendirilmesi yapılmıştır. *fimH* genin varlığı PZR ile doğrulanarak hem ExPEC'lerin hemde UPEC suşlarının önceki literatürlerin sonuçları ile hemen hemen uyumlu olarak büyük bir çoğunluğunun *fimH* genine sahip olduğu görülmüştür. 113 ExPEC izolatının % 75'inde *fimH* geninin varlığı belirlenmiş idrar yolu enfeksiyonuna neden olan UPEC izolatlarının % 80'inde *fimH* geninin varlığı tesbit edilmiştir (Abdallah ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda ise ExPEC'lerin % 89.62'de, UPEC izolatlarının % 90.32'sinde diğer çalışmaya göre daha yüksek oranlarda *fimH* geninin varlığı gösterilmiştir. Benzer şekilde Hojati ve ark. (2015) UPEC'lerin % 92.8'inde *fimH* genini bulmuşlardır.

Bu çalışmanın *fimH* dendrogram gruplamasının, filogenetik grupları ve GSBL'leri ayırmadığı sonucunu destekler şekilde Tartof ve ark. (2007) *fimH* SNP dayalı gruplamanın filogenetik olarak anlamlı olmadığını bulmuşlardır. Ayrıca dizileme sonucu elde edilen filogenetik ağacın *E. coli*'leri de materyal kaynağına göre ayırmadığını göstermişlerdir. Ghanbarpour ve Akhtardanesh (2012) *fimH* virulans geninin en yaygın gen olduğunu belirterek farklı filogrupların tüm izolatlarında bulunduğunu rapor etmişlerdir. Yun ve ark. (2015) multilokus dizi tiplemesi (MLST), *fimH* genotiplemesi ve filogruplama moleküler tiplendirme metotlarını kıyasladıklarında, UPEC'lerin MLST ve *fimH* genotiplemesinin filogruplamadan daha iyi ayırdığını göstermişlerdir. *fimH*'ın MLST'ye göre yüksek derecede dizi heterojenliğine sahip olduğu için daha bilgi verici olduğu belirtilmiştir. Bu tez çalışması bu raporu doğrular şekilde *fimH*'ın içerdiği yüksek derecede dizi heterojenliği Mega'da elde edilmiş filogenetik ağaca da yansımıştır. Başka bir çalışma ise 166 UPEC suşunun *fimH* (genin 424bp'lik kısmı) varyantlarının dizi analizi sonucu elde ettikleri filogenetik ağaca göre oluşan 46 *fimH* tipinin MLST sonuçları ile uyumlu olmadığını fakat filogenetik grupları çok iyi ayırdığını savunmuştur (Dias ve ark., 2010). Tartof ve ark. (2007) 32 farklı kaynaktan izole ettikleri *E. coli*'lerin 422 bp'lik *fimH* genotiplendirmesi sonucu elde ettikleri filogenetik ağacın 10 tek tip dizi bulunduğunu ve 10 *fimH* tipine ayrıldığını göstermişlerdir. Bu çalışmada ise değerlendirilen 86 *E. coli*'nin 356 bp'lik

gen dizisinin filogenetik ağacında oldukça dizi varyasyonu göstererek 65 fimH tipi oluşmuştur.

Günümüzde idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisi, antibiyotikler ile yapılmaktadır. Ancak üropatojenik *E.coli*' ler *fim* geni tarafından kodlanan tip 1 ve P fimbria gibi adezinler ve salgıladıkları toksinler sayesinde, üriner sistemin iç dokularına kadar invaze olabilmektedir ve bu şekilde UPEC suşlarının antibiyotiklerden kaçabildiği ve uygulanan tedavilere dirençli hale geldikleri düşünülmektedir. Aynı zamanda, antibiyogram yapılmadan tedaviye başlanması, antibiyotik dirençliliğini giderek arttırmakta, dolayısıyla akut idrar yolu enfeksiyonları kronik enfeksiyonlara dönüşerek piyelonefrit ve sepsis gibi ciddi rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Bu nedenle, yeni ilaçların ve aşıların geliştirilmesinde patotip tanısının önemini vurgulayan son yıllarda çok sayıda araştırma mevcuttur (Bekal ve ark., 2003; Palaniappan ve ark., 2006; Giray, 2011).

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Sonuç olarak genişlemiş spektrumlu beta laktamazların (GSBL) Gram negatif bakterilerde oluşturduğu antibiyotik direnci enfeksiyonların tedavisinde önemli bir sorunu gündeme getirmektedir. Enfeksiyon etkeninin direnç fenotipinin ve genotipinin ortaya koyulacağı mekanizmaların belirlenmesi, tedavi sonuçlarını etkileyerek gereksiz antibiyotik kullanımını önleyecektir. Bu çalışma GSBL'lerin belirlenmesinde genotipik metodun fenotipik metottan daha yüksek özgüllüğe ve duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir. Bu sorunun çözülmesinde mikrobiyoloji laboratuvarının rolü, GSBL üreten bakterilerin doğru olarak ve mümkün olan en kısa sürede saptanması ve klinisyene bildirilmesidir. Bu çalışmadan elde ettiğimiz verilere dayanarak çift disk sinerji testinin kısıtlı imkanlara sahip laboratuvarlarda bile uygulanabilecek ucuz, kısa sürede sonuç veren güvenilir bir test olduğu sonucuna varılmıştır. Ülkemizdeki GSBL oranlarının yüksekliği göz önüne alınırsa özellikle *E. coli* suşlarında GSBL üretiminin gösterilmesinde NCCLS/CLSI tarafından önerilen iki doğrulama yöntemlerinden birinin rutin uygulanması oldukça akılcı görünmektedir. Özellikle GSBL üreten *Enterobacteriaceae* suşlarında, antibiyotik direnci ile birlikte GSBL varlığının belirlenmesi, tedavide uygun antibiyotik seçimini kolaylaştıracağı gibi, kullanılan ilaçlara karşı direnç gelişiminin de önlenmesinde yararlı olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma çok antibiyotiğe dirençli üropatojenik *E. coli* aracılı üriner sistem enfeksiyonlarının prevalansının yüksek olabileceğini ve filogenetik B2 grubuna ait *E. coli*'nin baskın bir üropatojen olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca bu yöntemin gelecekte ekstraintestinal patojenik *E. coli*'nin epidemiyolojik çalışmaları için nispeten ucuz, yüksek düzeyde tekrarlanabilir olması gösterilmiştir.

İdrar yolu enfeksiyonları en sık görülen enfeksiyon hastalıklarından birisidir. Basit sistitten, hayatı tehdit eden sepsise kadar giden klinik tablolar oluşturabilmektedir. Yaşamın her döneminde görülebilmekle beraber özellikle genç kadınlarda daha sıktır. Çoğu vakada etken UPEC' dir. *E. coli*'nin üriner sistem patojeni olmasını sağlayan birçok virülans faktörü vardır. *fimH* SNP analizi, toplum ve hastane bağlantılı *E. coli* izolatlarının epidemiyolojik olarak incelenmesi için bir tiplendirme aracıdır ve UPEC'in genotipik analizleri için kolay ve ucuz bir tarama testi olarak kullanılabilir. Dolayısıyla *fimH*, bakteri yapışmasını ve kolonizasyonunu bloke ederek *E. coli* enfeksiyonlarının

önlenmesi için aşı tasarlamak için kullanılabilir. Buna ek olarak, *fimH*, hızlı tespit tabanlı tahlillerin genişletilmesi için bir araç olarak kullanılabilir.

Patojen mikroorganizmalar ile konakçılar arasında sürekli saldırı ve savunma meknaizmaları açısından bir mücadele söz konusudur. Bu mücadelede genellikle sahip oldukları virülens faktörleri ve hızlı evrimleşmeleri nedeni ile patojen mikroorganizmalar galip jelmekte ve her türlü tedavi yöntemine karşı direnç geliştirmektedirler. Ülkemizde *E. coli* patotipleri çok ayrıntılı bir şekilde çalışılmalı, patotiplere özgü virülens genleri araştırılmalı ve bu virülens mekanizmalarının üstesinden gelecek yeni ilaç veya aşı üretimini içeren kapsamlı araştırmalara yer verilmelidir. Antibiyotikler dışında yeni bir ilaç ve aşı kullanımı gündeme geldiğinde, hastalıklara kısa sürede tanı koymak gerekecektir. Bu zamana kadar rutin tanıda yer alacak en güvenilir ve kısa sürede sonuç veren yöntemin bulunması gerekmektedir. Yapılan bu çalışmada, kullanılan Multiplex PZR yönteminin, aynı anda birçok virülens faktörü ortaya çıkarması ve kısa sürede sonuç vermesi nedeni ile rutin tanıda yer alması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abdallah, K. S., Cao, Y. ve Wei, D.-J., 2011, Epidemiologic investigation of extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) based on PCR phylogenetic group and *fimH* single nucleotide polymorphisms (SNPs) in China, *international journal molecular epidemiology genetics*, 2(4),339-353.
- Abiodun, A. O., Olufunke, O. A., Dunah, F. C. ve Oladiran, F., 2014, Phenotypic identification and phylogenetic characterization of uropathogenic *Escherichia coli* in symptomatic pregnant women with urinary tract infections in south-western Nigeria, *International Journal of Biology*, 6(4),1916-9671.
- Agarwal, J., Srivastava, S. ve Singh, M., 2012, Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*, *indian journal of med microbiology*, 30(2):141–9.2.
- Ahmed, M. Y. A., 2012, Characterization and molecular epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* derived from University Hospitals of Egypt and Germany, Doktora Tezi, *Justus-Liebig-University Giessen*, Mısır, 1-10.
- Al-Mayahie , S. M. G., 2014, Phylogenetic grouping and virulence characterization of ESBL-producing and non-producing vaginal *Escherichia coli*, *American Journal of Biomedical and Life Sciences*, 2(5), 127-133.
- Akman, S., 2008, Klinik örneklerden izole edilen *Klebsella* bakterilerinin identifikasyonu ve enzimatik aktivitesi, Yüksek lisans tezi, *Gazi üniversitesi fen bilimleri enstitüsü*, Ankara, 14-25.
- Akova, M., 1992, Yeni beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonu antibiyotikler, *ANKEM Derg*, 6(2), 266-269.
- Akova, M., 2004, Dikkat: genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) var!, *ANKEM Derg*, 18(ek 2), 98-103.
- Aktas, E., Yigit, N., Yazgi, H. ve Ayyildiz, A., 2005, Detection of antimicrobial resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* strains from infected neonates, *Journal of International Medical Research*, 30:445–448
- Al-Jasser, A. M., 2006, Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs): A Global problem, *kuwait med journal.*, 38 (3),171–185.
- Alizade, H., Fallah, F., Ghanbarpour, R. ve ark., 2014, Phylotyping of *blaCTX-M-15* gene in extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* isolates from clinical samples in Iran, *International Journal of the Bioflux Society*, 6(4), 169.
- Alobwede, I., M’Zali, F. H., Livermore, D. M., Heritage, J., Todd, N. ve Hawkey, P. M., 2003, CTX-M extended-spectrum beta-lactamase arrives in the UK., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51,470–471.
- Alvarez, B., Houpijian, H., Mezzasoma, M. ve ark., 2004, What does the future hold for clinical microbiology? (Eds) *General Microbiological Informations*, Article, 22, 3-4.
- Ambler, R. P., 1980, The structure of beta lactamases, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289, 321-31.
- Antao, E., Wieler, H. L. ve Ewers, C., 2009, Adhesin threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, *Gut Pathogens*, 1,22- 12.
- Aridoğan, A., Atasever, L. ve ark., 2004, Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere dirençleri, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 34,20-23.

- Arslan, A. İ., 2010, İdrar yolları enfeksiyonu etkeni *E. coli*'lerin adezinleriyle antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin klasik ve moleküler yöntemlerle araştırılması, *Doktora Tezi Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Aubert, D., Poirel, L., Chevalier, J., Leotard, S. ve Pages, J. M., 2001, Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial Agents Chemother*, 45, 2615-20.
- Ausubel, F. M., Kingston, R. E., Brent, R., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. ve Struhl, K., 1991, Current protocols in molecular biology, *Greene Publishing Associates & Wiley Interscience*, New York.
- Azap, O., Otlı, B., Yesilkaya, A. ve Yakupogullari, Y., 2013, Detection of OXA-48-like carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care center in turkey: Molecular Characterization and Epidemiology, *Balkan Medical Journal*, 30 (2), 259-260.
- Babini, G. S. ve Livermore, D. M., 2000, "Antimicrobial resistance among *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45, 183- 189.
- Bali, E. B., Acik, L. ve Sultan, N., 2010, Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum β -lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital, *African journal of microbiology*, 4(8), 650–654.
- Barnaud, G., Arlet, G., Verdet, C., Gaillot, O., Lagrange, P. H. ve Philippon, A., 1998, *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible beta-lactamase (DHA-1) with an ampR gene from *Morganella morganii*, *Antimicrob. Agents Chemother*, 42, 2352–2358.
- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S. ve Casellas, J. M., 1996, Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1(MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother*, 40, 509–513.
- Bell, J. M., Turnidge, J. D., Gales, A. C., Pfaller, M. A. ve Jones, R. N., 2002, "Prevalence of expended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998- 1999)", *Diagn. Microbiology and Infectious Disease*, (42), 193-198.
- Bilgehan, H., 2000, *Escherichia*. In: Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, 10. baskı İzmir: Barış Yayınları., 3-17.
- Bilgehan, H., 2004, Klinik mikrobiyolojik tanı 4.baskı Barış Yayınları Fakülte Kitabevi, İzmir, 100-105.
- Bingen, E. H., Denamur, E. ve Elion, J., 1994, Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks, *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 311-327.
- Bishara, J., Livne, G., Ashkenazi, S., Levy, I., Pitlik, S., Ofir, O., Lev, B. ve Sarma, Z., 2005, "Antibacterial susceptibility of extended-spectrum beta lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*", *Israel Medical Association Journal*, 7(5), 298-301.
- Bodey, G. P., 1990, Penicillins, monobactams, and carbapenems, *Texas Heart Institute Journal*, 17, 315-329.
- Bonnet, R., 2004, Growing group of extended-spectrum β -Lactamases: The CTXM enzymes", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 1-14.

- Bora, E., Lin, A., Wood, S. J., Yung, A. R., McGorry, P. D. ve Pantelis, C., 2014, Cognitive deficit in youth with familial and clinical high risk to psychosis: a systematic review and meta-analysis, *Acta psychiatr*, 130, 1-15.
- Bradford, P. A., Urban, C., Mariano, N., Projan, S. J., Rahal, J. J. ve Bush, K., 1997, Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein, *Antimicrob. Agents Chemother*, 41, 563–569.
- Bradford, P. A., 2001, Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of This important resistance threat, *Clinical Microbiology Reviews*, 933–951.
- Bekal, S., Brousseau, R., Masson, L. ve Prefontaine, G., 2003, Rapid identification of *E. coli* pathotypes by irulence gene detection with DNA Microarrays, *Journal of Clinical Microbiology*, 2113-2125pp.
- Branger, C. O., Zamfir, S., Geoffroy, G., Laurans, G., Arlet, H. V., Thien, S., Gouriou, B. ve Denamur, P. a. E., 2005, Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum- β -lactamase type, *Emerging Infectious Disease*, 11, 54-61.
- Brauner, A., Leissner, M., Wretling, B. ve ark., v., 1985, Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in patients with bacteremia, *European Journal of Clinical Microbiology*, 4, 566-569.
- Bush, K. ve Sykes, R. B., 1983, Beta-lactamase inhibitors in perspective, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 11,97.
- Bush, K., Jacoby, G. A. ve Medeiros, A. A., 1995, A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure, *Antimicrob, Agents Chemother*, 39, 1211–1233.
- Bush, K., 2000, The evolution of beta lactamases., *Mikrobiyoloji Bülteni*, 34, 7-21.
- Bush, K. ve Jacoby, G. A., 2010, Updated functional classification of beta-lactamases, *Antimicrob Agents Chemother*, 54(3),969-976.
- Canton, R. ve Coque, T. M., 2006, The CTX-M beta-lactamase pandemic, *Current Opinion in Microbiology*, 9, 466–475.
- Canton, R., Morosini, M. I., de la Maza, O. M. ve de la Pedrosa, E. G., 2008, IRT and CMT beta lactamases and inhibitor resistance, *Clinical Microbiology and Infectious*, 14, 53-62.
- Carrer, A., Poirel, L., Eraksoy, H., Çağatay, A. A., Badur, S. ve Nordmann, P., 2008, Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in İstanbul, Turkey., *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2950-4.
- Carter, M. W., Oakton, K. J., Warner, M. ve Livermore, D. M., 2000, Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid combination disk method, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 4228-4232.
- Chakrawarti, A., Dongol, P., Khanal, H., Subba, P. ve Banerjee, J. J., 2015, Extended Spectrum Beta Lactamases detection and multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* from urine samples of patients from a referral hospital of eastern nepal, *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 3(3), 423-426.
- Chambers, H. F., 2000, penicillins” Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases 5. Baskı” kitabında s.261, Churchill and Livingstone philadelphia.
- Chandra, V., Goswami, P. N. ve 2014, Detection of TEM & SHV genes in extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing *E. coli* & *Klebsiella pneumoniae* isolated from a tertiary care cancer hospital, *National Journal of Medical Research*, 4:3.

- Chandramohana, L. ve Revella, P. A., 2012, Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a pediatric patient population, *Antimicrob Agents Chemother*, 56(9), 4765–4770.
- Chromek, M. ve Brauner, A., 2007, Urinary Tract Infection. Why Do Some Children Get Complications, While Others Don't? , *Current Pediatric Reviews*, 3, 35-44
- Ciftci, I. H., Karakece, E., Asik, G., Demiray, T. ve Er, H., 2013, An Investigation on the Presence of OXA-48 and KPC in Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains, *Ankem Dergisi*, 27 (2), 49-54.
- Clermont, O., Bonacorsi. S. ve Bingen, E., 2000, Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4555-4558.
- Colodner, R., Rock, W., Chazan, B., Keller, N., Guy, N., Sakran, W. ve Raz, R., 2004, "Risk Factors for the Development of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria in Nonhospitalized Patients", *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 23,163–167
- Colodner, R., 2005, "Extended-spectrum beta-lactamases: a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists", *American Journal of Infection Control*, 33(2), 104-107.
- Cormican, M. G., Marshall, S. A. ve Jones, R. N., 1996, Detection of extended spectrum- β -lactamase (ESBL)-producing strains by the E test ESBL screen, *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1880-1884.
- Craig, W. A., Gorbach, S. L., Barlett, J. G., Blacklow, N. R. ve ark., 1998, Penisillins. In: *Infectious Diseases 2nded.*, Philadelphia, WB Saunders, 173-84.
- Çelebi, S., Yüce, N., Çakır, D., Hacımustafaoğlu, M. ve Özkaya, G., 2009, Çocuklarda Genişlemiş Spektrumlu β - Laktamaz Üreten *E. coli* Enfeksiyonlarında Risk Faktörleri ve Klinik Sonuçları, *Beş Yıllık Çalışma Çocuk Enf Derg*, 3, 5-10.
- Çolak, Ö. Ü., 2011, Klinik örneklerden izole edilen *E. coli* ve *Klebsiella* cinsi bakterilerde çift difüzyon tarama ve çift sinerji yöntemleri ile genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığının araştırılması, Yüksek lisans tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü*, Ankara.
- Dağlar, D. ve Öngüt, G., 2012, Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) ve Tanı Yöntemleri, *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1, 1-9.
- Dakh, F., 2008, Mutation frequency of non-ESBL phenotype sentry (Asia-Pacific) isolates of *Klebsiella pneumoniae* conversion to an GSBL positive phenotype master of applied science Queensland university of technology.
- Dallenne, C., Costa, A., Decre, D., Favier, C. ve Arlet, G., 2010, Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important b-lactamases in *Enterobacteriaceae*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 490–495.
- Datta, N. ve Kontomichalou, P., 1965, Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*, *Nature*, 208, 239–241.
- Del Castillo, B. R., Vinue, L., Jesus Roman, E., Guerra, B., Carattoli, A., Torres, C. ve Martinez-Martinez, L., 2013, Molecular characterization of multiresistant *Escherichia coli* producing or not extended-spectrum β -lactamases, *BMC Microbiology*, 13:84.
- Demir, N., 2006, Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörlerinin araştırılması, Uzmanlık Tezi, Kartal eğitim ve araştırma hastanesi, İstanbul.
- Desjardins, P., Picard, B., Kaltenbock, B., Elion, J., Denamur, E. ve 1995, Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population: evidence

- from random amplified polymorphic DNA and restriction-fragment-length polymorphism, *Journal of Molecular Evolution*, 41, 440-448.
- Dias, R. C., Moreira, B. M. ve Riley, L. W., 2010, Use of *fimH* single-nucleotide polymorphisms for strain typing of clinical isolates of *Escherichia coli* epidemiologic investigation, *Journal of Clinical Microbiology*, 48(2), 483-8.12.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G. ve Hartsch, T., 2001, S-Fimbriya-Encoding Determinant *sfa I* Is Located on Pathogenicity Island III 536 of Uropathogenic *Escherichia coli* Strain 536, *Infection And Immunity*, 4248-4256.
- Donnenberg, M. S. ve Welch, R. A., 1995, Virulence determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. In Urinary Tract Infections Molecular Pathogenesis and Clinical management. Mobley, H.L.T. and Warren, J.W.(eds) Washington DC, American Society for Microbiology press, 135-174.
- Drawz, S. M. ve Bonomo, R. A., 2010, Three Decades of β -Lactamase, *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 160-201.
- Drews, S. J., Poutanen, S. M., Mazzulli, T. ve McGeer, A. J., 2005, Decreased Prevalence of Virulence Factors among Ciprofloxacin-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, 4218-4220.
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W. ve Jarlier, V., 2008, Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide, *Clinical Microbiology and Infectious*, 14 (1), 90-103.
- Drusano, G. L. ve 1998, "Infection in the Intensive Care Unit: β -Lactamase-Mediated Resistance Among *Enterobacteriaceae* and Optimal Antimicrobial Dosing", *Clinical Infectious Diseases*, 27 (1), 111-116.
- Du, B., Long, Y. ve Liu, H., 2002, "Expanded spectrum beta-lactamase producing *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome", *Intensive Care Medicine*, (28), 1718-1723.
- Duguid, J. P., Clegg, S. ve Wilson, I. M., 1978, The fimbrial and nonfimbrial hemagglutinins of *Escherichia coli*, *Journal of Medical Microbiology*.
- Durmaz, R., Dumaz, B., Koroglu, M. ve Tekerekoglu, M. S., 2001, "Detection and typing of extended spectrum beta-lactamases in clinical isolates of the family *Enterobacteriaceae* in a medical center in Turkey", *Microbial Drug Resistance*, (7), 171-175.
- Durupinar, B., 2001, Antibiyotiklere Dirençte Yeni Eğilimler, *Klinik Dergisi*, 14 (2), 47-56.
- Ebrahimi, F., 2016, Epidemiology of faecal carriage of extended -spectrum beta-lactamase producers in healthy individuals and in different patient populations university of debrecen doctoral school of pharmaceutical sciences.
- Ece, G. V., 2005, klinik örneklerden izole edilen *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi varlığının araştırılması Ankara.
- Emody, L., Kerenyi, M. ve Nagy, G., 2003, Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*, *The International Journal of Antimicrobial Agents*, 22 (29), 29-33.6.
- Erayman, I., Erayman, B. ve Arıbaş, E. T., 2001, İdrar örneklerinden izole edilen Gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları, *Ankara Derg.*, 15:164.
- Färber, J., Moder, K. A., Layer, F. ve ark., v., 2008, Extended-spectrum beta-lactamase detection with different panels for automated susceptibility testing and with a chromogenic medium, *Journal of Clinical Microbiology*, 46(11), 3721-7.
- Feng, P., Weagant, S. D. ve Grant, M. A., 2002, Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria; Bacteriological Analytical Manual. Food and drug

- Administration (FDA) US department of Health & Human services at ([http // w.w.w.fda.gov/food/scienceresearch/laboratorymethods/bacteriologicalanalyticalmanual/ucm064948.htm](http://www.fda.gov/food/scienceresearch/laboratorymethods/bacteriologicalanalyticalmanual/ucm064948.htm)).
- Finer, G. ve Landau, D., 2004, Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy, *The Lancet. Infectious diseases.*, 4(10), 631–5.15.
- Geyik, M. F., Kökoğlu, Ö. F. ve ark., v., 2002, Hastane kaynaklı gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar; *Enfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 16 (2), 175-178.
- Giray, B., 2011, İzmir bölgesinde gözlenen idrar yolu enfeksiyonlarına neden olan üropatojenik *E. coli*'lerdeki p- fimbriya' nın üç farklı g-adezininin moleküler biyolojik yöntemler ile saptanması: *Ege üniversitesi fen bilimleri enstitüsü*, Bornova-İzmir.
- Golabi, P., 2011, Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz (GSBL) Salgılayan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Enfeksiyonlarında Fataliteyi Belirleyen Faktörler ve Uygun Antibiyotik Kullanımının Rolü, Uzmanlık tezi, *Marmara Üniversitesi İstanbul*.
- Greenwood, D., Finch, R., Davey, P. ve Wilcox, M., 2006, Antimicrobial Chemotherapy. (5 Th edition) by Oxford University Press Inc., New York.
- Grover, S. S., Sharma, M., Chattopadhyay, D., Kapoor, H., Pasha, S. T. ve Singh, G., 2006, Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporins resistance in *Klebsiella pneumoniae*: Emergence of high resistance against cefepime, the fourth generation cephalosporins, *Journal of Infection*, 54, 279-88.
- Guyer, D. M., Gunther, N. W. T. ve Mobley, H. L., 2001, Secreted proteins and other features specific to uropathogenic *Escherichia coli*, *Journal of Infectious Diseases*, 183, 1: 32-5.
- Gülamber, C., 2009, *Enterobacteriaceae* izolatlarında CTX-M tipi genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) enzim pozitifliği ve dağılımı; Afyonkarahisar.
- Gülay, Z., 2001, Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta laktamlara ve Karbapenemlere direnç”, *Hastane Enfeksiyonları Dergisi*, (5), 210-229.
- Gülay, Z., 2003, Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyeller, *Ankem Derg*, 17 (3), 192-204.
- Gür, D., 1996, Beta-laktamazların sınıflandırılması, *Flora*, 2, 80-86.
- Gür, D., 2002, “Temel Tıptan Kliniğe Beta Laktamazlar”, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2) 102-109.
- Gür, D., 2004, ESBL'ların Genel Özellikleri ve ESBL Tipleri. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen Enfeksiyonlar, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
- Gür, D., 2008, Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç, “Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M(eds): Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Etkenlere Göre Enfeksiyonlar, cilt 1” kitabında, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 243-57,
- Helfand, M. ve Bonomo, R., 2003, Beta-lactamses: a survey of protein diversity, *Current Drug Targets. Infection Disorders*, 3(1), 9-23.
- Ho, P. L., Tsang, D. N., Que, T. L., Ho, M. ve Yuen, K. Y., 2000, “Comparison of screening methods for detection of extended spectrum beta-lactamases and their prevalence among *E. coli* and *Klebsiella* species in Hong Kong”, *APMIS*, (108), 237-240.
- Hojati, Z., Zamanzad, B., Hashemzadeh, M., Molaie, R. ve Gholipour, A., 2015, The FimH Gene in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated From Patients With Urinary Tract Infection, *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8 (2), e17520.

- Huang, K., Ferrin-O'Connell, L., Zhang, W., Leonard, G. A., O'Shea, E. K. ve Quirocho, F. A., 2007, Structure of the Pho85-Pho80 CDK-cyclin complex of the phosphate-responsive signal transduction pathway, *Molecular Cell*, 28, 614–623.
- İnan, N. U. ve Gürler, N., 2004, İdrar yolu enfeksiyonu olan çocuklardan izole edilen *E. coli* suşlarından antibiyotik direnci ve çeşitli virulans faktörlerinin araştırılması,, *Ankem Dergisi*, 18(2), 89-96pp.
- Iraz, M., 2009, malatya devlet hastanesi'nde klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *klebsiella* spp. suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitifliği ile antibiyotik duyarlılığı, *Ankem Derg*, 23(4), 161-165.
- Irving, W., Boswell, T. ve Aldeen, D. A., 2005, Instant notes in Medical Microbiology, *Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford*.
- Jacoby, G. A. ve Medeiros, A. A., 1991, More extended spectrum β -lactamases, *Antimicrob Agents Chemother*, 35, 1697–704.
- Jacoby, G. A., 1994, Genetics of extended spectrum beta-lactamases, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 13:2.
- Jacoby, G. A., 2006, Beta-lactamase nomenclature, *Antimicrob Agents Chemother*, 50(4), 1123-1129.
- Jacoby, G. C., 1997, Application of tree ring analysis to paleoseismology, *reviews of Geophysics*, 109-124
- Jawetz, E., 1987, penicillins and cephalosporins," katzung BG(ed): Basic and Clinical Pharmacology, 3. Baskı" kitabında s.516, Appleton and lange, California.
- Johnson, J., 1991, Virulence factors in *Escherichia coli* Urinary Tract Infection, *Clinical Microbiology*, 4: 82-113.
- Johnson, J. R., Roberts, P. L. ve Stamm, W. E., 1987, P fimbriya and other virulence factors in *Escherichia coli* urosepsis: association with patients' characteristics, *The Journal of Infectious Diseases*, 156, 225-229.
- Johnson, J. R. ve Stamm, W. E., 1989, Urinary tract infection in women: diagnosis and treatment, *Annals of Internal Medicine*, 111, 906-917.
- Johnson, J. R. ve Russo, T. A., 2002, Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*.", *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139, 155-162.
- Johnson, J. R., Owens, K., Gajewski, A. ve Kuskowski, M. A., 2005, Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 6064–6072.
- Johnson, R. E., Yu, S. L., Prakash, S. ve Prakash, L., 2003, Yeast DNA polymerase zeta is essential for error-free replication pastthymine glycol, *Genes & Development*, 17, 77–87.
- Johnson, J. R. ve Stell, A. L., 2000, Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise, *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 261-72.
- Jawetz, Melnick ve Adelberg, 2010, Tibbi mikrobiyoloji Gür, D. Hadımköy-İstanbul, 249-261.
- Nataro, J. P. ve Kaper, J. B., 1998, Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 142-201.
- Kader, A. A. ve Angamuthu, K., 2005, "Extended-spectrum beta-lactamases in urinary isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and other gram-negative bacteria in a hospital in Eastern Province, Saudi Arabia", *Saudi Medical Journal*, 26(6), 956-959.

- Kaftandzieva, A., Trajkovska-Dokic, E. ve N., P., 2011, Prevalence and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *Contributions, Sec. Biol. Med. Sci., MASA*, XXXII, 2, p. 129–141.
- Kallenius, G., Svenson, S. B., Hultberg, H. ve ark., v., 1981, Occurrence of P fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infection, *Lancet*, 2, 1369-1372.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. ve Mobley, H. L., 2004, Pathogenic *Escherichia coli*, *Nature Reviews Microbiology*, 2, 123–140.
- Kapil, A., 2005, The challenge of antibiotic resistance: need to contemplate, *The Indian Journal of Medical Research*, 121, 83-91.
- Kayser, F. H., 2002, “Genel Bakteriyoloji” Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernajel RM, Tıbbi.
- Kernodle, D. S., Stratton, C. W., McMurray, L. W., Chipley, J. R. ve McGraw, P. A., 1989, Differentiation of beta-lactamase variants of *Staphylococcus aureus* by substrate hydrolysis profiles, *The Journal of Infectious Diseases*, 159, 103–108.
- Kfoury, J. N. S. ve Araj, G. F., 2003, Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases, *British Medical Journal*, 327, 1209-1913.
- Knothe, H., Shah, P., Kremery, V., Antal, M. ve Mitsushashi, S., 1983, Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*, *Infection*, 11, 315-7.
- Kroghelt, K. A., Bergmans, H. ve Klemm, P., 1990, Direct evidence that the *fimH* protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae *Infect Immun*, 58(6), 1995-1998.
- Krumperman, P. H., 1983, Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to indentify high-risk sources of fecal contamination of foods, *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 165-170
- Lal, P., Kapil, A., Das, B. K. ve S., S., 2007, Occurence of TEM and SHV gene inextended spectrum β -lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* spp.isolated from a tertiary care hospital, *Indian Journal of Medical Res*, 125, pp. 173-178. .
- Langermann, S., Palaszynski, S., Barnhart, M., Auguste, G., Pinkner, J. S., Burlein, J., Barren, P., Koenig, S., Leath, S., Jones, C. H. ve Hultgren, S. J., 1997, Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination *Science*, 276(5312), 607-611.
- Lascols, C. ve ark., v., 2012, Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel beta-lactamases: a snapshot of extended spectrum beta-lactamases throughout the world, *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 1632–1639.
- Latham, R. H. ve Stamm, W. E., 1984, Role of fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections in adult women: correlation with localization studies, *The Journal of Infectious Diseases*, 149, 835-840.
- Lautenbach, E., Patel, J. B., Bilker, W. B. ve Edelstein, P. H., 2001, Fishman. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk factors for infection and impact of resistance on outcomes, *Clinical Infectious Diseases*, 32, 1162-71.
- Le Bouguenec, C., 2005, Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*, *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6-7), 471–8.
- Leblebicioğlu, H., Nas, Y., Eroğlu, C., Sunbul, M., Esen, S. ve Günaydın, M., 1999, “Detection of expended spectrum beta-lactamases in *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *Journal of Chemotherapy*, (11), 103-106.

- Lee, J. H., Bae, I. K. ve Hee Lee, S., 2010, New definitions of extended-spectrum beta lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance, *Medicinal Research Reviews*, (Epub ahead of print).
- Lee, N., Yuen, K. Y. ve Kumana, R., 2003, Clinical role of beta lactam/beta lactamse inhibitor combinations. , *Drugs*, 63, 1511-24.
- Leverstein-van Hall, M. A., Fluit, A. C., Paauw, A., Box, A. T., Brisse, S. ve Verhoef, J., 2002, Evaluation of the E test ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum β -lactamases in multi-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3703-3711.
- Lewis, J. S. I., Herrera, M., Wickes, B., Patterson, J. E. ve Jorgensen, J. H., 2007, First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system, *Antimicrob. Agents Chemother*, 51, 4015-4021.
- Livmore, D. M., 1987, Mechanisms of resistance to cephalosporin antibiotics, *Drugs*, 34 (2), 64.
- Livmore, D. M., 1995, "Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance", *Clinical Microbiology Reviews*, (8), 557-584.
- Livmore, D. M. ve Yuan, M., 1996, "Antibiotic resistance and production of extended- spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella* spp. From intensive care units in Europe", *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 38, 409- 424.
- Livmore, D. M. ve ark., v., 2007, CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 165-174.
- Ludden, C., Hanahoe, B., Boyle, F., Kanagaratnam, B., Cormican, M. ve Morris, D., 2014, Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*.
- M'Zali, F. H., Chanawong, A., Kerr, K. G., Birkenhead, D. ve Hawkey, P. M., 2000, Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45, 881-885.
- MacKenzie, F. M., Forbes, K. J., Dorai-John, T., Amyes, S. G. ve Gould, M., 1997, Emergence of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*., *Lancet* 350:783.
- Maiti, N. S., Harel, J. ve Fairbrother, M. J., 1993, Structure and copy number analysis pap, sfa, and afa- related gene clusters in F165-positive bovine and porcine *Escherichia coli* isolates, *Infection and Immunity*, 61 (6), 2453-2461pp.
- Maltezou, H. C., 2009, Metallo-beta-lactamases in Gram negative bacteria: introducing the era of panresistance ?, *The International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(5), 405.
- Marrs, C. F., Zhang, L. ve Foxman, B., 2005, *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?, *FEMS Microbiology Letters*, 252 (2), 183-190.
- Mascaretti, O., 2003, Bacteria versus antibacterial agents, *Washington D.C: Asm Press*, 1, 107-198.
- Matar, G. M., Al Khodor, S., El Zaatari, M. ve Uwaydah, M., 2005, "Prevalence of the genes encoding extended-spectrum beta-lactamases, in *Escherichia coli* resistant to beta-lactam and non-beta-lactam antibiotics", *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 99(4), 413-417.
- Medeiros, A. A., 1984, Beta-Lactamases, *British Medical Bulletin*, 40, 18-27.

- Medeiros, A. A., 1997, Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics, *Clinical Infectious Diseases*, 24(1), S19-S45.
- Mehli, M., Zer, Y. ve Gayyurhan, E., 2007, Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarında GSBL oluşturmaının ÇDST ve Vitek2 yöntemler ile araştırılması, *Ankem Derg*, 21(2), 71-75.
- Mirelis, B., Navarro, F., Miro, E., Mesa, R. J., Coll, P. ve Prats, G., 2003, Community transmission of extended-spectrum β -lactamase. *Emerg., Infectious Diseases*, 9, 1024-1025.
- Mladin, C., Usein, C. R., Chifiriuc, M., Palade, A., Slavu, C. L., Negut, M. ve ark., v., 2009, Genetic analysis of virulence and pathogenicity features of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with neurogenic bladder, *Romanian Biotechnological Letters*, 14(6), 4906–11.8.
- Morin, M. D. ve Hopkins, W. J., 2002, Identification of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction and their association with infectivity in mice, *Elsevier Science Inc*, 60 (3), 537-541.
- Mougeot, B. F., Gunter, W. N., Donnenberg, S., M., ve Mobley, L. T. H., 2002, Uropathogenic *Escherichia coli*, Ed. By. Donnenberg, S, M, *Escherichia coli* Virulence Mechanism of a Versatile Pathogen, *Elsevier*, 239-268pp.
- Mshana, S. E., Imirzalioglu, C., Hossain, H., Hain, T., Domann, E. ve T. Chakraborty, T., 2009, Conjugative IncFI plasmids carrying CTX-M-15 among *Escherichia coli* ESBL-producing isolates at a University Hospital in Germany, *BMC Infectious Diseases*, 9: 97.
- Mulvey, M. A., 2002, Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*, *Cellular Microbiology*, 4, 257-71.
- Naas, T., Poirel, L. ve Nordmann, P., 2008, Minor extended spectrum beta-lactamases, *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14(S1), 42-52.
- NCCLS, M.-S., 2003, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Thirteenth Informational Supplement. NCCLS. NCCLS documents. Wayne, Pennsylvania, USA, National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS documents.
- Nordmann, P. ve Naas, T., 1994, Sequence analysis of PER-1 extended spectrum beta lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta lactamases, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 104–114.
- Nordmann, P., Naas, T. ve Poirel, L., 2011, Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1791-8.
- Novais, A., Cantón, R., Moreira, R., Peixe, L., Baquero, F. ve Coque, T. M., 2007, Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids, *Emerging Infectious Diseases*, 13(2), 796-9.
- Nüesch-Inderbinen, M. T., Hächler, H. ve Kayser, F. H., 1996, Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 15, 398.
- O'Hanley, P., Low, D., Romero, I. ve ark., 1985, Gal-Gal binding and hemolysin phenotypes and genotypes associated with uropathogenic *Escherichia coli*, *The New England Journal of Medicine*, 313, 414-420.
- Oliveira, F. A., Paludo, K. S., Arend, L. N., Farah, S. M., Pedrosa, F. O., Souza, E. M. ve ark., 2011, Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of

- uropathogenic *Escherichia coli* strains, *Genetics and Molecular Research*, 10(4), 4114–25.
- Orak, F. F., 2005, Hastane enfeksiyonuna neden olan gram-negatif bakterilerde direnç paterni ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz tayini, Adana Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi Adana.
- Oteo, J., Campos, J. ve Baquero, F., 2002, “Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2001), *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 945- 952.
- Otto, G., Sandberg, T., Marklund, B. I. ve ark., v., 1993, Virulence factors and pap genotype in *Escherichia coli* isolates from women with acute pyelonephritis, with or without bacteremia, *Clinical Infectious Diseases*, 17, 448-456.
- Ozakın, C., Sinirtas, M., Sevgican, E., Kazak, E. ve Gedikoğlu, S., 2003, Comparison of the E-test method with an automated bacterial identification and antimicrobial susceptibility detection system for screening expended-spectrum beta-lactamase producers, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, (35), 700-703.
- Öcal, D., 2012, Gram negatif bakterilerde antibakteriyal direncin fenotipik yöntemler ile tayin ve bildirimi, *Ankem Dergisi*, 26 (3), 154-164.
- Ögedey, E. D., Cömert, F., Köktürk, F., Külâh, C. ve Aktaş, E., 2016, Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Escherschia coli* ve *Klebsiella* Spp. suşlarında CTX-M enzim tiplerinin belirlenmesi, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 46(2), 88-96.
- Özsoy, F. M., Öncül, O., Yıldırım, A. ve Pahsa, A., 2001, Genişletilmiş spektrumlu Beta-laktamazlar: Klinik önemi ve getirdiği sorunlar, *Flora dergisi*, 6, 3-21.
- Öztürk, C. E., Kaya, D., Yücel, M., Çalışkan, E., Behçet, M. ve Ankaralı, H., 2010, Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz tespitinde kullanılan bazı fenotipik testlerin karşılaştırılması, *Ankem Derg.*, 24(3), 111-116.
- Paterson, D. L., 2000, Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum beta lactamases (ESBL), *Clinical Microbiology and Infection*, 6, 460-463.
- Paterson, D. L. ve Bonomo, R. A., 2005, Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update, *Clinical Microbiology Reviews*, 18 (4), 657-686.
- Paul, S., Bezbaruah, R. L., Roy, M. K. ve Ghosh, A. C., 1997, Multiple antibiotic resistance (MAR) index and its reversion in *Pseudomonas aeruginosa*, *Letters in Applied Microbiology*, 24, 169-171.
- Pérez-Pérez, F. J. ve Hanson, N. D., 2002, Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2153–2162.
- Perilli, M., Felici, A., Franceschini, N., Santis, A. D., Pagani, L., Luzzaro, F., Oratore, A., Rossolini, G. M., Knox, J. R. ve Amicosante, G., 1997, Characterization of a new TEM-derived beta-lactamase produced in a *Serratia marcescens* strain, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 2374–2382.
- Philippon, L. N., Naas, T., Bouthors, A. T., Barakett, V. ve Nordmann, P., 1997, OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 2188–2195.
- Pitout, J. D., Nordmann, P., Laupland, K. B. ve Poirel, L., 2005, Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 (1), 52-59.

- Pitout, J. D. ve Laupland, K. B., 2008, Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern, *The Lancet Infectious Diseases*, 8, 159-166.
- Pitout, J. D., 2010, Infections with extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*: changing epidemiology and drug treatment choices, *Drugs*, 70, 313–333.
- Poirel, L., Naas, T., Guibert, M., Chaibi, E. B., Labia, R. ve P., N., 1999, Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 573–581.
- Poirel, L., Le Thomas, I., Naas, T., Karim, A. ve Nordmann, P., 2000, Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 622–632.
- Poirel, L., Lebossi, E., Castro, M., Fevre, C., Foustoukou, M. ve Nordmann, P., 2004, Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 2277–2279.
- Palaniappan, M. U. R., Zhang, Y., Chiu, D. ve Torres, A., 2006, Differentiation of *Escherichia coli* pathotypes by oligonucleotide spotted array, *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (4), 1495-1501pp.
- Queenan, A. M., Folen, B., Gownley, C., Wira, E. ve Bush, K., 2004, Effects of inoculum and beta-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology, *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 269-75.
- Queenan, A. M. ve Bush, K., 2007, Carbapenemases; the versatile beta-lactamases, *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440-58.
- Rahal, J. J., 2000, Extended-spectrum beta-lactamases: how big is the problem? *Clinical Microbiology and Infection*, 6(2), 2-6.
- Rakotonirina, H. C., Garin, B., Randrianirina, R. ve Richard, V., 2013, <Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated in Antananarivo, Madagascar., *BMC Microbiology*, 13:85.
- Rawat, D. ve Nair, D., 2010, Extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria, *Journal of Global Infectious Diseases*, 2, 263-74.
- Riaz, S., Faisal, M. ve Hasnain, S., 2011, Antibiotic susceptibility pattern and multiple antibiotic resistances (MAR) calculation of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Pakistan, *African Journal Biotechnology*, 10(33), 6325-6331.
- Rubens, C. S. D., Beatriz, M. M. ve Lee, W. R., 2010, Use of *fimH* single-nucleotide polymorphisms for strain typing of clinical isolates of *Escherichia coli* for epidemiologic investigation, *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 483-488.
- Russo, T. A. ve Johnson, J. R., 2000, Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* (ExPEC), *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 1753-1754.
- Russo, T. A. ve Johnson, J. R., 2003, Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem, *Microbes and Infection*, 5(5), 449-56.

- Sanders, C. C. ve Sanders, W. E., 1992, Beta-lactam resistance in Gram-negative bacteria: New challenges for new drugs, *Clinical Infectious Diseases*, 14, 1089-1099.
- Seid, J. ve Asrat, D., 2005, "Occurrence of extended spectrum beta-lactamase enzymes in clinical isolates of *Klebsiella* species from Harar region, eastern Ethiopia", *Acta Tropica*, 30:1.
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N. ve Whittam, T. S., 1986, Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics, *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 873-884.
- Shahi, S. K., Singh, V. K. ve Kumar, A., 2013, Detection of *Escherichia coli* and associated β -lactamases genes from diabetic foot ulcers by multiplex PCR and molecular modeling and docking of SHV-1, TEM-1, and OXA-1 β -lactamases with clindamycin and piperacillin, 8, pp.7 e68234.
- Shahid, M., Malik, A., Agrawal, M. ve Singhal, S., 2004, Phenotypic detection of extended spectrum and AmpC beta lactamases by a new spot-inoculation method and modified three dimensional extract test:comparison with the conventional three-dimensional extract test, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 684-687.
- Shahid, M. ve ark., v., 2011, *bla*CTX-M, *bla*TEM, and *bla*SHV in *Enterobacteriaceae* from north-Indian tertiary hospital:high occurrence of combination genes, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4, 101-105.
- Sharma, j., Sharma, M. ve Ray, P., 2010, Detection of TEM & SHV genes in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary care hospital from India, *The Indian Journal of Medical Research*, pp 332-336.
- Sokurenko, E. V., Chesnokova, V., Dykhuizen, D. E. ve ark., v., 1998, Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the *fimH* adhesin, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 8922-6.
- Sokurenko, E. V., Feldgarden, M., Trintchina, E., Weissman, S. J., Avagyan, S., Chattopadhyay, S. ve ark., v., 2004, Selection footprint in the *fimH* adhesin shows pathoadaptive niche differentiation in *Escherichia coli*, *Molecular Biology and Evolution*, 21(7), 1373-83.11.
- Sood, S., 2013, Comparative Evaluation of the in-vitro Activity of Six beta-lactam/beta-lactamase Inhibitor Combinations against Gram Negative Bacilli, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7 (2), 224-228.
- Soto, E. G. ve Hultgren, J. S., 1999, Bacterial adhesins: Common themes and variations in architecture and assembly, *Journal of Bacteriology*, (Rev) 181 (4) : 1059-1071pp.
- Soutourina, O. A. ve Bertin, P. N., 2003, Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 27(4), 505-237.
- Spahi, A. B., 2006, *Enterobacteriaceae* suşlarında genilemiş spektrumlu beta laktamazların (GSBL) saptanmasında kullanılan bazı yöntemlerin karşılaştırılması ve GSBL üretim sıklığının belirlenmesi.
- Srinivas, V., Reich, R. R., Dou, S.-J., Jasperse, L., Pan, X., Wanger, A., Quitugua, T., Edward A., Dias, R. C., Moreira, B. M. ve Riley, L. W., 2010, Use of *fimH* single-nucleotide polymorphisms for strain typing of clinical isolates of *Escherichia coli* for epidemiologic investigation, *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 483-488.

- Stürenburg, E. ve Mack, D., 2003, Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control, *Journal of Infection*, 47 (4), 273-95.
- Su, C., 2008, Female lower urinary tract infection, *JTUA.*, 19, 12–20.5.
- Svanborg-Eden, C., Eriksson, B. ve Hanson, L. A., 1978, Adhesion to normal human uroepithelial cells of *Escherichia coli* from children with various forms of urinary tract infection, *The Journal of Pediatrics*, 93, 398-403.
- Synder, J. A., Haugen, B. J., Lockatell, V. ve ark., v., 2005, Coordinate Expression of Fimbriya in Uropathogenic *Escherichia coli*, *Infect and Immunity*, 7588-7596.
- Tanır, G. ve Göl, N., 1999, “Antibiyotik Direnci”, *Klinik Dergisi*, 12 (2), 4754.
- Tartof, S. Y., Solberg, O. D. ve Riley, L. W., 2007, Genotypic analyses of uropathogenic *Escherichia coli* based on *fimH* single nucleotide polymorphisms (SNPs), *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 10), 1363–9.13.
- Topçu, A. W., Söyletir, G. ve Doğanay, M., 2002, İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. s. 165, s.1507, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Toval, F., Köhler, C. D., Vojel, U., Wagenlehner, F., Mellmann, A., Fruth, A., Schmidt, M. A., Karch, H., Bielaszewska, M. ve Dobrindt, U., 2014, Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection, *Journal of Clinical Microbiology*, 52:2.
- Tunçkanat, F., 1993, Üriner sistem enfeksiyonu patogeneğinde bakteriyel virülans faktörleri., *Klinik Derg.*, 6 (1), 3-5.
- Turan, Ç., 2011, İdrar örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarında p fimbriya varlığı ile GSBL oluşturma arasındaki ilişkinin araştırılması Uzmanlık tezi Adnan menderes üniversitesi, Aydın.
- Turgut, D., 2010, Genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli*'nin etken olduğu toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarının risk faktörleri; *Hacettepe Üniversitesi Tıp fakültesi*, Ankara.
- Tükenmez-Tigen, E. ve Mülazımoğlu, L., 2012, Toplum kökenli enfeksiyonlarda genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar ve klinik önemi, *Klinik Dergisi*, 25(3), 94-8.
- Tzouveleakis, L. S., Tzelepi, E., Tassios, P. T. ve Legakis, N. J., 2000, CTX-M type beta lactamases: an emerging group of extended spectrum enzymes, *The International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 137-142.
- Ulusoy, S., 2002, Antibiyotikler,” Ekim N, Uçan ES(eds): Solunum sistemi enfeksiyonlar, 1. baskı kitabında S. 125, Toraks Kitapları, Ankara.
- Uysal, A. ve Durak, Y., 2012, Pulsed-field jel electrophorphorsis typing, antibiotic resistance, and plasmid profiles of *Escherichia coli* strains isolated foods, *Canadian Journal of Microbiology*, 58, 1278-1287.
- Vahaboglu, H., Coskunkan, F., Tansel, O. ve ark., v., 2001, Clinical importance of extended spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. And *Pseudomonas aeruginosa* strains, *Journal of Medical Microbiology*, 50, 642-5.
- Vila, J., Navia, M., Ruiz, J. ve Casals, C., 1997, Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 2757–2759.
- Walter, R. J. ve Hoiby, N., 2006, OXA-type carbapenemases, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 373-83.
- Weissman, S. J., Chattopadhyay, S., Aprikian, P., Obata-Yasuoka, M., Yarova-Yarovaya, Y., Stapleton, A., Ba-Thein, W., Sokurenko, E. V., Johnson, J. R., Dykhuizen, D. ve ark., v., 2006, Clonal analysis reveals high rate of structural

- mutations in fimbriyal adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, 59(3), 975–988.
- Wiener, J., Quinn, J. P., Bradford, P. A. ve ark., v., 1999, Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes, *The Journal of the American Medical Association*, 281, 517-523.
- Winberg, J., 1984, P-fimbriyae, bacterial adhesion, and pyelonephritis, *Archives of Disease in Childhood*, 59, 180-184pp.
- Woods, C. R., 2006, Antimicrobial resistance: mechanisms and strategies, *Paediatric Respiratory Reviews*, 7, 128-129.
- Wu, P.-J., Shannon, K. ve Phillips, I., 1992, beta-Lactamases and susceptibility to beta-lactam antibiotics in *Escherichia coli*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 30, 868–871.
- Wullt, B. T., 2003, he role p-fimbriya for *Escherichia coli* establishment and mukozal inflammation in the human urinary tract, *The International Journal of Antimicrobial Agents*, 21 (6), 605-21.
- Wojnicz, D., 2007, Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children with chronic pyelonephritis, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 16(5), 651.4.
- Yan Hu, Y., Cai, J.-C., Zhou, H.-W., Chi, D., Zhang, X.-F., Chen, W.-L., Zhang, R. ve Chena, G.-X., 2013, Molecular typing of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from environmental water, swine feces, specimens from healthy humans, and human patients.
- Yapar, S. M., 2007, Hastane kökenli *Escherichia coli* izolatlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar. Uzmanlık Tezi. Edirne: Trakya Üniversitesi.
- Yavuzdemir, S., Aysev, D. ve Güriz, H., 2003, Genislemis spektrumlu beta-laktamaz yapan *E. coli* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 33, 126-129.
- Yıldırım, A., 1999, Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) araştırma yöntemlerinin karşılaştırılması: *E. coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarında sıklığının saptanması. Uzmanlık tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, İstanbul.
- Yuluğ, N., 1997, Beta-laktamazlar ve klinik açıdan önemi, *Ankem Derg*, 11(2), 205-207.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : AEVAR ASHRAF KHORSHED
Uyruğu : IRAK
Doğum Yeri ve Tarihi : 17/6/1986 Kerkük
Telefon : 05382505592
Faks :
e-mail : ayfr_1986@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Kerkük	2004
Üniversite	: Kerkük	2008
Yüksek Lisans	: Kayseri	2011
Doktora	: Konya	2016

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
-----	-------	--------

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER: Arapça, İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR