



**T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÜRİNER SİSTEM ENFEKSİYON ETKENİ *E. COLİ*
SUŞLARINDA FOSFOMİSİN DİRENÇ GENLERİ, CTX-M, SHV
VE TEM GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR. İPEK OMA Y BEŞER**

**TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. NURAL CEVAHİR**

ANKARA-2023

**T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÜRİNER SİSTEM ENFEKSİYON ETKENİ *E. COLİ*
SUŞLARINDA FOSFOMİSİN DİRENÇ GENLERİ, CTX-M, SHV
VE TEM GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. İPEK OMA Y BEŞER

**TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. NURAL CEVAHİR**

**Bu çalışma Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi'nin 23.09.2022 tarih ve TTU-2022-2412
nolu kararı ile desteklenmiştir.**

ANKARA-2023

TEŞEKKÜR

Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Ziya Cibali AÇIKGÖZ başta olmak üzere, gerek uzmanlık eğitimim gerekse tez çalışmam süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Nural CEVAHİR'e; asistanlığım süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Bedia DİNÇ'e, Prof. Dr. Rıza DURMAZ'a, Prof. Dr. Ayşe Esin AKTAŞ'a ve Prof. Dr. Tuba DAL'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında yardımlarından dolayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Duygu ÖCAL'a ve dizi analizi çalışmasındaki yardımlarından dolayı Oğuz ARI' ya teşekkür ederim.

Dr. İpek Omay Beşer
Ankara-2023

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR.....	I
KISALTMALAR	IV
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
TABLO LİSTESİ.....	VI
RESİM LİSTESİ.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. ÜRİNER SİSTEM ENFEKSİYONU.....	3
2.2. ÜROPATOJENİK <i>Escherichia coli</i> (UPEC).....	4
2.3.ÜSE TEDAVİSİ.....	5
2.3.1. Antimikrobiyallere Direnç.....	6
2.3.2. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Direnci	7
2.4.FOSFOMİSİN.....	10
2.4.1.Fosfomisinin Etki Mekanizması.....	11
2.4.2. Fosfomisinin Farmakodinamik/Farmakokinetik (FD/FK) Özellikleri.....	12
2.4.3.Fosfomisin Direnç Mekanizmaları.....	13
1) Fosfomisine geçirgenliğin azalması.....	13
2) Antibiyotiğin hedef bölgesi olan MurA'daki Modifikasyonlar.....	14
3) Enzimatik inaktivasyon.....	14
2.4.4.Fosfomisin İn vitro Duyarlılık Yöntemleri	16
3. MATERYAL VE METOD.....	18
3.1.İZOLATLARIN TOPLANMASI VE SAKLANMASI.....	18
3.2.MİKROBİYOLOJİK KÜLTÜR VE TANIMLAMA.....	18

3.3. ANTİMİKROBİYALLERE DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI	18
.....	
3.3.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi İle Fosfomisin Duyarlılığının Araştırılması.....	19
3.3.2. Agar Dilüsyon Yöntemi İle Fosfomisin Duyarlılığının Araştırılması.....	20
1) Fosfomisin çalışma solüsyonlarının hazırlanması.....	20
2) Fosfomisin agar dilüsyon plaklarının hazırlanması.....	21
3) Agar dilüsyon yöntemi için izolatların hazırlanması.....	22
3.4. MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE FOSFOMİSİN DİRENÇ GENLERİNİN SAPTANMASI.....	23
3.4.1. DNA izolasyonu.....	23
3.4.2. <i>fosA3</i> , <i>fosA</i> , <i>fosC2</i> , <i>fosX</i> , <i>fosB</i> genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmesi.....	23
3.4.3. <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmesi.....	27
3.4.4. Agaroz jel elektroforezi.....	29
3.4.5. Sekans analizi.....	30
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. İZOLATLARIN KLİNİK VE DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ.....	34
4.2. ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK SONUÇLARI.....	34
4.3. FOSFOMİSİN DİRENÇ GENLERİ VE BETA-LAKTAMAZ GENLERİ.....	36
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇLAR.....	51
7. KAYNAKLAR.....	53

KISALTMALAR

AUC	:Area Under the Curve
CEPA	:Compañía Española de Penicilina y Antibióticos
CFU	:Colony Forming Unit
CLSI	:The Clinical And Laboratory Standards Institute
CNF-1	:Cytotoxic necrotizing factor-1
ÇİD	:Çoklu İlaça Dirençli
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
EUCAST	:European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FD	:Farmakodinamik
FDA	:Food And Drug Administration
FK	:Farmakokinetik
G-6-P	:Glikoz-6-Fosfat
GSBL	:Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
IV	:İntravenöz
KPE	:Karbapenemaz Üreten Enterobakter
MALDİTOF-MS	:Matriks Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight - Mass Spectrometry
MİK	:Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MRKNS	:Metisilin Dirençli Koagülaz Negatif Stafilokok
MRSA	:Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
OECD	:Organisation for Economic Co-Operation and Development
PEP	:Phosphoenolpyruvate
PZR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TBE	:Tris Borat EDTA
TMP/SMZ	:Trimetoprim/Sülfametoksazol
UPEC	:Üropatojenik <i>Escherichia coli</i>
USHİESA	:Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı
ÜSE	:Üriner Sistem Enfeksiyonları
VRE	:Vankomisin Dirençli Enterokok
YBÜ	:Yoğun Bakım Ünitesi

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. <i>fosA3</i> geni taşıyan F24:A-B1 plazmid pHNTC9e'nin diğer benzer plazmidlerle karşılaştırılması.....	9
Şekil 2. Fosfomisin trometamol, Fosfomisin kalsiyum ve Fosfomisin disodyumun moleküler yapısı.....	11
Şekil 3. Fosfomisin direnç mekanizmaları	13
Şekil 4. Fosfomisinin inaktivasyonuna yol açan fosfomisin modifiye edici enzimler.....	16
Şekil 5. Fosfomisin duyarlılığının disk difüzyon yöntemiyle değerlendirilmesi.....	17
Şekil 6. <i>Enterobacterales</i> türleri arasında FosA'nın epidemiyolojik haritası.....	45

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Çalışmadaki hastaların demografik özellikleri ve klinik başvuru yerleri dağılımı.....	33
Tablo 2. Otomatize sistemle fosfomisin dirençli bulunan 52 <i>E. coli</i> izolatlarının agar dilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle fosfomisin duyarlılığının karşılaştırılması	34
Tablo 3. Fosfomisin dirençli 72 <i>E. coli</i> izolatının antibiyotik duyarlılıkları	35
Tablo 4. <i>fosA3</i> geni saptanan izolatların antibiyotik duyarlılıkları.....	36
Tablo 5. <i>fosA3</i> geni saptanan izolatlarda beta-laktamaz genlerinin varlığı	37

RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1. Fosfomisin Duyarlılığının Disk Difüzyon Yöntemi İle Değerlendirilmesi	19
Resim 2. Fosfomisin Duyarlılığının Agar Dilüsyon Yöntemiyle Değerlendirilmesi	22
Resim 3. <i>fosA3</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{TEM}</i> ve <i>bla_{SHV}</i> PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	30

ÖZET

Üriner Sistem Enfeksiyon Etkeni *E. coli* Suşlarında Fosfomisin Direnç Genleri, CTX-M, SHV ve TEM Genlerinin Araştırılması

Dr. İpek OMA Y BEŞER

GİRİŞ ve AMAÇ: Üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE), kadınlarda daha sık olmak üzere en sık görülen bakteriyel enfeksiyonlar arasındadır. ÜSE etkeni olarak en sık *Escherichia coli* karşımıza çıkmaktadır. Özellikle genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten üropatojenik *E. coli* (UPEC) suşlarının yayılması, ÜSE tedavisini zorlaştırmaktadır. Artan antimikrobiyal direnç profilleri nedeniyle fosfomisin gibi antibiyotiklerin kullanımı yeniden önem kazanmıştır. Fosfomisin, peptidoglikan sentezinin ilk basamağını geri dönüşümsüz olarak inhibe eden fosfoenolpiruvat analogu olan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Fosfomisin direnci, fosfomisine geçirgenliğin azalması, antibiyotiğin hedef bölgesi olan MurA'daki modifikasyonlar ve enzimatik inaktivasyon gibi çeşitli mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Bu çalışmada, idrar örneklerinden izole edilen fosfomisin dirençli *E. coli* izolatlarında fosfomisin direnç genlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Fosfomisin direnç genlerinin, özellikle *fosA3*'ün *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} gibi GSBL genleriyle aynı plazmid üzerinde taşınıp yayılması nedeniyle, fosfomisin dirençli *E. coli* izolatlarında aynı zamanda beta-laktamaz gen varlığı da araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD: Çalışmaya Ağustos 2022-Şubat 2023 yılları arasında Ankara Şehir Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na kültür için gönderilmiş idrar örneklerinden izole edilen ve otomatize sistem (Vitek 2) veya disk difüzyon yöntemiyle fosfomisine dirençli bulunan 97 *E. coli* izolatı dahil edilmiştir. Tüm izolatlarda disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemiyle fosfomisin duyarlılığı araştırılmıştır. İzolatların antibiyotiklere duyarlılıkları otomatize sistem kullanılarak belirlenmiştir. Fosfomisine dirençli bulunan izolatlarda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle fosfomisin direnç genleri (*fosA3*, *fosA*, *fosC2*, *fosX*, *fosB*) ve *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} olmak üzere üç beta-laktamaz geni araştırılmıştır.

BULGULAR: Çalışmaya otomatize sistem ve/veya disk difüzyon yöntemleri ile fosfomisine dirençli saptanan 97 *E. coli* izolatı dahil edilmiştir. İzolatların 52'si otomatize sistemle, 45'i disk difüzyon yöntemiyle fosfomisine dirençli saptandı. Agar

dilüsyon yöntemiyle 97 izolatın 72'si fosfomisine dirençli bulundu. Yetmiş iki fosfomisin dirençli *E. coli* izolatının %40,2 (29/72)'sinde *bla*_{CTX-M}, %91,6 (66/72)'sında *bla*_{TEM} ve %20,8 (15/72)'inde *bla*_{SHV} geni saptandı. Yirmi sekiz izolatta *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{TEM}, on üç izolatta *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV}, dört izolatta *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{SHV} genleri beraber bulunurken, üç örnekte ise her üç gen beraber saptandı. Yetmiş iki fosfomisin dirençli *E. coli* izolatının 3 (%4,2)'ünde *fosA3* geni saptanmış olup *fosA*, *fosC2*, *fosX*, *fosB* geni saptanamamıştır. *fosA3* geni saptanan üç izolatın ikisinde hem *bla*_{CTX-M} hem de *bla*_{TEM} genleri saptanırken diğer izolatta sadece *bla*_{TEM} geni bulundu. Üç örnekte de *bla*_{SHV} geni bulunamadı.

SONUÇ: GSBL pozitif UPEC gibi çoklu ilaca dirençli (ÇİD) enfeksiyonların tedavisinde fosfomisinin alternatif ilaç olarak kullanımı önerilmektedir. GSBL üreten suşlarda fosfomisin direnç mekanizmalarının bilinmesi tedavinin yönlendirilmesinde ve direncin takibinde önemli olacaktır. Ülkemizdeki baskın fosfomisin direnç profillerinin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: UPEC, fosfomisin direnci, *fos* direnç genleri, GSBL

ABSTRACT

Investigation Of Fosfomycin Resistance Genes, CTX-M, SHV, And TEM Genes In *E. coli* Strains As The Causative Agent Of Urinary System Infections.

Dr. İpek OMA Y BEŞER

INTRODUCTION and OBJECTIVE: Urinary tract infections (UTIs) are among the most common bacterial infections, with a higher prevalence in women. *Escherichia coli* is the most frequently encountered causative agent of UTIs. The dissemination of uropathogenic *E. coli* (UPEC) strains producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) poses a challenge in the treatment of UTIs. Due to increasing antimicrobial resistance profiles, the use of antibiotics such as fosfomycin has regained importance. Fosfomycin is a broad-spectrum antibiotic that irreversibly inhibits the first step of peptidoglycan synthesis, acting as a phosphoenolpyruvate analogue. Fosfomycin resistance occurs through various mechanisms, including reduced permeability to fosfomycin, modifications in the target site MurA, and enzymatic inactivation. This study aims to investigate fosfomycin resistance genes in *E. coli* isolates obtained from urine samples. Since fosfomycin resistance genes are often found on the same plasmid as ESBL genes such as bla_{CTX-M}, bla_{TEM}, and bla_{SHV}, the presence of beta-lactamase genes has also been examined in fosfomycin-resistant *E. coli* isolates.

MATERIALS AND METHODS: The study included 97 *E. coli* isolates obtained from urine samples sent for culture to the Central Bacteriology Laboratory of Ankara City Hospital between June 2022 and February 2023, which exhibited resistance to fosfomycin as determined by the automated system (Vitek 2) or the disk diffusion method. Fosfomycin susceptibility was investigated for all isolates using both the disk diffusion and agar dilution methods. The antibiotic susceptibilities of the isolates were determined using an automated system. In fosfomycin-resistant isolates, fosfomycin resistance genes (*fosA3*, *fosA*, *fosC2*, *fosX*, *fosB*), and three beta-lactamase genes (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}) were investigated using the polymerase chain reaction (PCR) method.

RESULTS: A total of 97 *E. coli* isolates, determined to be resistant to fosfomycin using automated systems and/or the disk diffusion method. Out of these isolates, 52 were identified as fosfomycin-resistant using the automated system, while 45 were determined to be fosfomycin-resistant through the disk diffusion method. Using the

agar dilution method, 72 out of 97 isolates were found to be resistant to fosfomycin. Among the 72 fosfomycin-resistant *E. coli* isolates, the *bla*_{CTX-M} gene was detected in 40.2% (29/72), the *bla*_{TEM} gene in 91.6% (66/72), and the *bla*_{SHV} gene in 20.8% (15/72) of them. Among these isolates, 28 had both *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM} genes, 13 had both *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} genes, and 4 had both *bla*_{CTX-M} and *bla*_{SHV} genes. In three isolates, all three genes (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{SHV}) were detected together. Furthermore, the *fosA3* gene was found in 3 (4.2%) of the 72 fosfomycin-resistant *E. coli* isolates, while the *fosA*, *fosC2*, *fosX*, and *fosB* genes were not detected in any of the isolates. Among the three isolates carrying the *fosA3* gene, two also had both *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM} genes, while the remaining isolate only had the *bla*_{TEM} gene. None of the three isolates had the *bla*_{SHV} gene.

CONCLUSION: The use of fosfomycin as an alternative drug in the treatment of multidrug-resistant infections, such as ESBL-positive UPEC, is recommended. Understanding the fosfomycin resistance mechanisms in strains producing ESBLs is important for guiding treatment and monitoring resistance. Further studies are needed to determine the predominant fosfomycin resistance profiles in our country.

Keywords: UPEC, fosfomycin resistance, *fos* resistance genes, ESBL

1.GİRİŞ

Üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE) en sık görülen bakteriyel enfeksiyonlar arasındadır (1). ÜSE, erişkin kadınlarda erkeklere oranla daha sık görülmekle birlikte çocukluk yaş grubunda ikinci en sık görülen bakteriyel enfeksiyondur (2,3). Avrupa Üroloji Derneği (EUA) tarafından üriner sistem enfeksiyonları komplike ve komplike olmayan ÜSE olarak iki gruba ayrılmıştır. ÜSE için kadın cinsiyet, vajinal enfeksiyon, geçirilmiş ÜSE, kalıcı kateter, böbrek taşı, immunsupresyon gibi çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır (4).

Üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC) toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarının %80'ininden fazlasından sorumludur (5). *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* ve *Enterococcus* gibi diğer etkenler, özellikle kateterle ilişkili ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara sebep olmaktadır (6).

Komplike olmayan ÜSE vakalarının çoğu toplum kökenlidir ve etken idrar yoluna ulaşmadan önce bağırsaklarda kolonizasyon gelişmektedir. UPEC, perineal bölgeyi kolonize ettikten sonra üretra boyunca yayılarak mesanede kolonize olup sistite neden olmaktadır (7). Bu süreçte çeşitli virülans faktörleri rol oynamaktadır. Fimbria yüzey epiteline tutunmayı sağlarken, flagellum ile hareket gerçekleşir. α -Hemolizin ve sitotoksik nekrotizan faktör-1 (CNF-1) gibi toksinler doku hasarına neden olurlar. UPEC, ayrıca sideroforlar aracılığıyla ortamdan demir ihtiyacını karşılamaktadır. Kapsül ve biyofilm oluşumu, bağışıklık sistemini devre dışı bırakarak enfeksiyonun ilerlemesine katkı sağlanmaktadır (8).

Komplike olmayan sistit ve piyelonefrit tedavisinde sıklıkla nitrofurantoin, fosfomisin, trimetoprim/sülfametoksazol (TMP/SMZ), florokinolonlar, amoksisilin/klavulanat ve sefalosporin grubu antibiyotikler kullanılmaktadır (2). Antimikrobiyallere direnç, son yıllarda ÜSE'ye neden olan bakterilerde giderek artmakta ve önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir (9). Direnç genlerini kodlayan çok sayıda mobil elementin, özellikle plazmidlerin, *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında aktarılması sonucu direnç daha da fazla yayılıp artmaktadır (10). Bu direnç artışı genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların (GSBL), özellikle CTX-M tipinin üretiminin küresel olarak yayılması sebebiyle önem arz etmektedir. Üropatojenik *E. coli* suşlarındaki ÇİD'e ilişkin artan endişe ve yeni antimikrobiyal

ajanların azlığı nedeniyle, özellikle GSBL üreten dirençli suşlarda fosfomisin gibi eski antibiyotiklerin kullanımı yeniden gündeme gelmiştir (11).

Fosfomisin, Avrupa'da komplike olmayan ÜSE tedavisinde yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir bakterisidal antimikrobiyal ajandır (12). Peptidoglikan biyosentezinin ilk adımını inhibe ederek etki göstermektedir (13). Fosfomisine karşı üç farklı direnç mekanizması gösterilmiştir; antibiyotiğin hedef enzimi olan MurA'nın aşırı ekspresyonu veya mutasyonu, hücre zarındaki taşıyıcı genlerdeki mutasyonlar ve fosfomisin modifiye edici enzimlerle gerçekleşen enzimatik inaktivasyon (14). Enzimatik inaktivasyon, *Enterobacterales* tarafından plazmidlerle taşınan farklı *fosA* ve *fosC2* genleri ile ilişkilidir ve bu, bakteriler arasında direncin yayılmasını arttırmaktadır. *E. coli*'de, *fos* genlerinin en yaygın olanı, çoğunlukla *bla_{CTX-M}* geni ile ilişkili olan ve Doğu Asya'da yaygın olarak bildirilen *fosA3*'tür (15). *fosA3* daha sonra çeşitli Avrupa ülkelerinde de raporlanmıştır (16,17).

Ülkemizde ve dünyada giderek artan antimikrobiyallere direnç nedeniyle üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde fosfomisin antibiyotiği alternatif ilaç olarak dikkat çekmektedir. Bu çalışmada idrar örneklerinden izole edilen fosfomisin dirençli *E. coli* izolatlarında fosfomisin direnç genlerinin (*fosA*, *fosA3*, *fosC2*, *fosB* ve *fosX*) eş zamanlı olarak *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* ve *bla_{SHV}* gibi beta laktamaz genlerinin araştırılması, söz konusu genlerin birlikteliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ülkemizde fosfomisin direnç genlerinin oranları ile ilgili veriler yetersizdir. Elde ettiğimiz bu sonuçlarla literatüre katkı sağlanacağı öngörülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ÜRİNER SİSTEM ENFEKSİYONU

Üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE) insanlarda en sık görülen bakteriyel enfeksiyonlar arasındadır ve dünya genelinde her sene 150 milyon kişi bu enfeksiyondan etkilenmektedir (18,19). Toplum kökenli komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonları çoğunlukla kadınlarda görülmekle birlikte kadınların %40'ının ve erkeklerin %12'sinin yaşamları boyunca en az bir defa semptomatik ÜSE atağı yaşadığı ve etkilenen kadınların %27 ila %48'inin tekrarlayan ÜSE geçirdiği tahmin edilmektedir (20,21).

Üriner sistem enfeksiyonları ayrıca önemli bir ekonomik sorundur. Amerika Birleşik Devletleri'nde, 2007 yılında ÜSE semptomları için tahminen 10,5 milyon poliklinik başvurusu (tüm ayaktan başvuruların %0,9'unu oluşturur) ve 2–3 milyon acil servis başvurusu olduğu bildirilmiştir (22). Ülkemizde ise Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı (USHİESA) Etken Dağılımı ve Antibiyotik Direnç Raporu (2021) incelendiğinde ülkemizdeki sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyon dağılımında ÜSE 3. sıklıkta görülmektedir. ÜSE'nin büyük çoğunluğunu kateter ilişkili ÜSE oluşturmaktadır (23).

Klinik olarak üriner sistem enfeksiyonları iki gruba ayrılmaktadır: komplike ÜSE ve komplike olmayan ÜSE. Komplike olmayan ÜSE tipik olarak sağlıklı, yapısal veya nörolojik üriner sistem anormallikleri olmayan bireyleri etkiler ve bu enfeksiyonlar alt ÜSE (sistit) ve üst ÜSE (piyelonefrit) olarak ikiye ayrılmaktadır (24). Kadın cinsiyet, geçirilmiş bir ÜSE, cinsel aktivite, vajinal enfeksiyon, diyabet, obezite ve genetik yatkınlık dahil olmak üzere çeşitli risk faktörleri sistit ile ilişkili bulunmuştur (25).

Komplike ÜSE'ler immünsüpresyon, taş, üriner obstrüksiyon, nörolojik hastalığa bağlı olarak gelişen üriner retansiyon, böbrek yetmezliği, böbrek transplantasyonu, gebelik, kalıcı kateterler gibi üriner sistemi veya konak savunmasını olumsuz etkileyen faktörlerle ilişkili bulunmuştur (26).

ÜSE'lere, gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerin yanı sıra mantarlar da neden olmaktadır. ÜSE'lerde etken olan bakteriler arasında, UPEC suşları en yaygın olanıdır. UPEC'in, komplike olmayan ÜSE'lerin yaklaşık %80'inden, toplum kaynaklı

enfeksiyonların %95'inden ve hastane kaynaklı enfeksiyonların %50'sinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (27). Ülkemizde sağlık hizmeti ilişkili ÜSE etken dağılımında büyük çoğunluğunu (%74,1) *Enterobacteriaceae* grubu oluştururken, bu grup içinde en sık (%33,4) görülen etkenin *E. coli* olduğu bildirilmiştir (23). Komplike olmayan ÜSE'lerde *E. coli*'yi sıklık açısından *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, grup B *Streptococcus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida spp.* gibi etkenler takip etmektedir (5,28,29).

2.2. ÜROPATOJENİK *Escherichia coli* (UPEC)

Enterobacteriaceae ailesinin bir üyesi olan *E. coli*; fakültatif anaerop, sporsuz gram negatif bir basildir. *E. coli* suşları hem bağırsak (akut gastroenterit, hemolitik üremik sendrom) hem de intra-abdominal, akciğer, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, yenidoğan menenjit ve bakteriyemi gibi çeşitli bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olmaktadır (30). Bu enfeksiyonlar çok yaygın görülebilmekle beraber, yüksek morbidite ve mortaliteyle seyredebilmektedirler (31,32).

Bağırsak florasında bulunan *E. coli* üriner sisteme geçerek periüretal, üretral ve vajinal alanda kolonize olmaktadır. Daha sonra bakteriler mesaneye ulaştıktan sonra üroepitelyuma tutunmaktadır (33). Üroepitelyuma yapışan bakteriler hücre içine girerek sitoplazmaya ulaşp çoğalmaya başlamakta ve sessiz bir *E. coli* rezervuarı oluşturabilmektedirler (34). Hücre içi bakterilerin bir kısmı mesane epitelinin dökülüp idrar yolu ile atılmasıyla temizlenirken, bir kısmı biyofilm oluşturarak konak immün yanıtı kaçırmaktadır (35). Bazı bakteriler ise biyofilm oluşturmak yerine hareketli forma dönüşerek mesane lümenine yayılmaktadır ve hatta böbreklere kadar ilerleyerek piyelonefrite sebep olmaktadır (6). Tüm bu süreçte *E. coli*'ye ait birçok virülans faktörü görev almaktadır.

E. coli 'nin önemli virülans faktörleri, genel olarak iki gruba ayrılmaktadır: bakteri hücre yüzeyinde bulunanlar ve salgısal virülans faktörleri. Bakteriyel yüzey virülans faktörleri yaygın olarak tip 1 fimbria ve P fimbria olmak üzere çeşitli fimbriaları içermektedir. Bu fimbrialar konakçı hücre yüzeyine yapışmayı sağlayarak doku invazyonuna (ÜSE patogeneğinde önemli) neden olmakta, biyofilm oluşumuna ve sitokin indüksiyonuna da katkı sağlamaktadır. Bakteriyel yüzey virülans faktörleri

arasında flagellum, kapsüler lipopolisakarit ve dış zar proteinleri de sayılabilmektedir (36). *E. coli*, flagella aracılığıyla idrar akışının tersi yönünde hareket ederek üreterler yoluyla böbreklere ulaşarak akut piyelonefrite ve kan dolaşımına girerek ürosepsise neden olmaktadır (37). Toksinler ve siderofor gibi demir toplama sistemleri salgısal virülans faktörlerindendir. UPEC, bir dizi toksin salgılayarak konakçı epitel hücrelerine zarar verir. UPEC suşlarının yaklaşık %50'si α -hemolizin üretir ve bu toksin üretimi semptomatik ÜSE ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (38). Hemolizinin salgılanması, konakçı hücrenin parçalanmasını sağlayarak enfeksiyona neden olan bakteriler tarafından besin olarak kullanılabilen demir gibi diğer büyüme faktörlerinin salınmasına neden olmaktadır (39). Demir, bakteri üremesi için gereklidir ve üriner sistemde sınırlı miktarda bulunmaktadır. UPEC'te 4 farklı siderofor sistemi tanımlanmıştır: aerobaktin, enterobaktin, yersiniabaktin ve salmokekin. Demir toplama sistemleri UPEC için önemli bir kolonizasyon faktörüdür. (40).

2.3.ÜSE TEDAVİSİ

ÜSE, başta kadınları etkileyen en yaygın enfeksiyonlardan biridir ve genellikle nükslerle seyredip, yoğun tedavi gerektiren kronik enfeksiyonlara yol açar; bu da hastaları sık sık antimikrobiyal tedaviye veya uzun süreli profilaksiye maruz bırakmaktadır (41). Alt ÜSE düzgün ve hızlı bir şekilde tedavi edildiğinde, nadiren komplikasyonlara yol açmaktadır. Ancak tedavi edilmezse, tekrarlayan ÜSE, piyelonefrit, sepsis gibi komplikasyonlara ve hamile kadınlarda da erken membran rüptürü, koryoamniyonit, düşük doğum ağırlıklı bebek gibi ciddi sonuçlara yol açabilmektedir (42).

Kadınlarda akut komplike olmayan sistit ve piyelonefritin tedavisi için Uluslararası Klinik Uygulama Kılavuzları, birinci seçenek ilaçlar olarak fosfomisin ve nitrofurantoini önermektedir (43). Avrupa Üroloji Derneği kılavuzlarına göre, tüm Avrupa ülkelerinde menopoz öncesi kadınlarda komplike olmayan sistitin ve piyelonefritin tedavisi için önerilen antibiyotikler şu şekildedir: nitrofurantoin, fosfomisin trometamol, TMP/SMZ ve pivmesillinam. TMP/SMZ, direncin yüksek olduğu yerlerde ampirik tedavi için önerilmezken; direncin düşük olduğu (<%20) bölgelerde kullanımı önerilmektedir (44).

Siprofloksasin ve levofloksasin gibi florokinolon grubu antibiyotiklerin verebileceği hasar göz önünde bulundurularak, komplike olmayan sistit tedavisinde bu antibiyotiklerin alternatif ilaç olarak düşünülmesi önerilmektedir (45). Siprofloksasin, hafif ve orta dereceli piyelonefrit veya komplike ÜSE vakalarında ikinci seçenek ampirik tedavi olarak ve komplike olmayan sistit için üçüncü seçenek ampirik tedavi olarak kullanılabilir. Amoksisilin-klavulanat, hafif ve orta dereceli piyelonefrit veya komplike ÜSE için birinci seçenek tedavi ve ayrıca komplike olmayan sistit için alternatif ampirik tedavi olarak önerilmektedir (46).

2.3.1. Antimikrobiyallere Direnç

ÜSE tedavisi için antimikrobiyal ajan seçimi patojenin lokal direnç profillerine bağlı olarak değişmektedir. Özellikle tekrarlayan ÜSE tedavilerinde yaygın olarak ampirik antibiyotik kullanımı, antibiyotiklere olan direncin artmasında önemli bir etkindir. Son yıllarda özellikle gelişmekte olan ülkelerde *E. coli*'deki antimikrobiyallere olan direncin artması, florokinolonlar, sefalosporinler ve aminoglikozidler gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin aşırı kullanımıyla sonuçlanmakta ve bu da tedavi ve hastaneye yatış maliyetlerini artırmaktadır (44,47).

UPEC'te antimikrobiyallere direnç, birçok ülkede giderek artmakta, zamana ve bölgeye bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Nitrofurontain için bu direnç <%1,5-13,3 arasında değişmekle beraber fosfomisin için bu oran <%1,5'tir. Gelişmekte olan ülkelerde amoksisilin-klavulanat direnci %48-83, siprofloksasin direnci %55,5-85,5 ve TMP/SMZ direnci için %54-82 olarak değişmektedir. Gelişmiş ülkelerde bu oran sırasıyla şu şekildedir: amoksisilin-klavulanat %3,1-40, siprofloksasin %5,1-39,8 ve TMP/SMZ %14,6-37,1 (46).

Bazı UPEC izolatları ampisiline ve birinci kuşak oral sefalosporinlere dirençli olabilmektedir. Belçika, Almanya ve İspanya'da ikinci kuşak sefalosporin olan sefuroksime direnç oranları sırasıyla %5,5, %12,8 ve %16,6 olarak bulunmuştur. İngiltere'de yatan hastaların idrar örneklerinden elde edilen *E.coli* izolatlarının üçüncü kuşak sefalosporinlere (sefotaksim/seftazidim) dirençli olabildiği görülmüştür (%13,8-21,3). Romanya'da üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlı UPEC oranı %87 olarak bulunmuştur (46).

Amerika’da 2003-2012 yılları arasında yapılan retrospektif bir çalışmada kadın hastalarda üriner sistem örneklerinden izole edilen etkenlerin antibiyotik direnç profilleri incelenmiştir. Çocuk hastalarda *E. coli* izole edilen örneklerde antibiyotik direnç oranları ampisilin için %44,8, amoksisilin/klavulanat için %3,1, sefuroksim için %2,5, sefazolin için %38,5, seftriakson için %3,3, siprofloksasin için %5,1, nitrofurontain için %0,5, TMP/SMZ için %25,1 olarak bulunmuştur. Erişkin genç hastalarda antibiyotik direnç oranları, ampisilin için %41,3, amoksisilin/klavulanat için %3,9, sefuroksim için %3,9, sefazolin için %37,5, seftriakson için %4,5, siprofloksasin için %11,8, nitrofurontain için %0,9, TMP/SMZ için %22,3 olarak saptanmıştır. Yaşlı hastalarda ampisilin için %45,2, amoksisilin/klavulanat için %5,5, sefuroksim için %9,5, sefazolin için %49,3, seftriakson için %9,5, siprofloksasin için %29,1, nitrofurontain %2,6, TMP/SMZ için %26,8 olarak direnç oranları belirlenmiştir (47).

2.3.2. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Direnci

β -laktamlara direnç, çeşitli mekanizmalarla gerçekleşebilmektedir. Farklı tipte beta-laktamaz enzimlerinin üretimi bu mekanizmalardan biridir. Beta-laktamazlar, β -laktam antibiyotiklerin (penisilin, sefalosporin, monobaktamlar ve karbapenemler) β -laktam halkasının amid bağıını hidrolize ederek etki gösterirler (48). Beta-laktamazların sınıflandırılmasında en sık Ambler moleküler sınıflandırması ile Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel sınıflandırması kullanılmaktadır (49). Ambler sınıflandırmasında beta-laktamazlar, enzimleri kodlayan nükleotid dizilerine göre dört sınıfa ayrılmaktadır. A, C ve D sınıfı beta-laktamazlar serin beta-laktamazlar; B sınıfı beta-laktamazlar ise metallobeta-laktamazlar olarak isimlendirilmektedir (50). Beta-laktamazların en yeni sınıflandırma şeması olan Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından yapılan sınıflandırmada ise beta-laktamazlar biyokimyasal özelliklerine ve substrat profillerine göre dört gruba ayrılmaktadır (49).

GSBL, Ambler moleküler sınıf A’da yer alan grup 2be, grup 2e ve sınıf D (grup 2d) beta-laktamazlardan oluşur. GSBL’ler; geniş spektrumlu penisilinlere, 1., 2., ve 3. kuşak sefalosporinlere ve kısmen sefepime etkili, karbapenemlere, sefamisinlere ve beta-laktamaz inhibitörlerine etkisizdirler (51). GSBL enzimleri genellikle çeşitli gram-negatif bakterilerde plazmidlere bağlı olarak üretildiğinden, bu enzimleri

kodlayan çeşitli GSBL genleri (*bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*) diğer bakteri türlerine aktarılabilmektedir (52).

TEM tipi GSBL'ler, 1960'ların başında tanımlanan orijinal plazmid aracılı beta-laktamaz TEM-1'in varyantlarıdır (53). Bu enzim, orijinal olarak Temoneira adlı Yunan bir hastanın kan kültüründen alınan bir *E.coli* izolatında bulunduğu için böyle adlandırılmıştır (54). TEM-1'in yapısında bir aminoasit değişikliği (39. pozisyonundaki glutamin yerine lizinin geçmesi) sonucu TEM-2, bu enzimin yapısında 2 aminoasit değişikliği ile de TEM-3 ortaya çıkar (55). Plazmid kökenli bilinen en eski enzim olan TEM-1, ampisilin, penisilin ve birinci kuşak sefalosporin direncine neden olmaktadır ancak oksiminio sefalosporinlere karşı aktiviteleri bulunmamaktadır. TEM kökenli GSBL'ler en sık *E. coli* ve *K. pneumoniae* 'da tanımlanmış olmakla birlikte, *Salmonella spp*, *P. mirabilis*, *Morganella morganii* ve *P. aeruginosa* türlerinde de bulunabilmektedir (56).

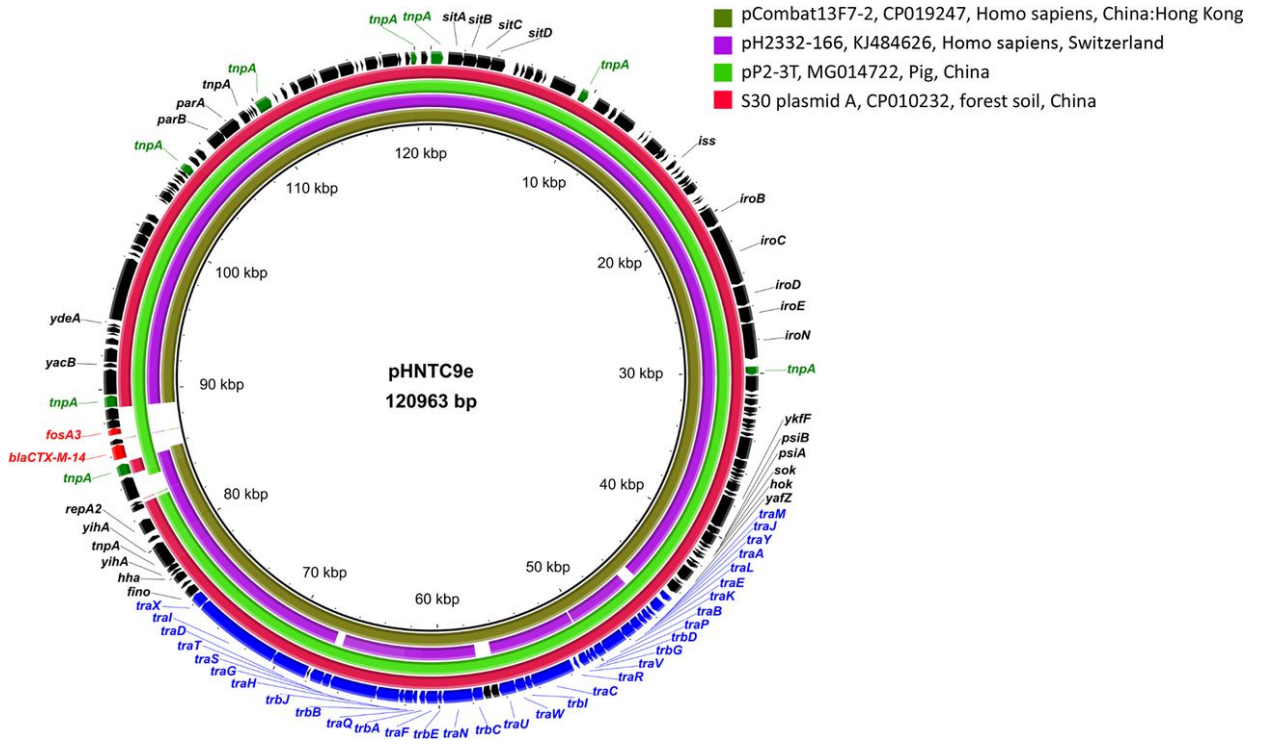
SHV tipi beta-laktamazlar, *K pneumoniae*'da kromozomal olarak kodlanmış enzimler olarak ortaya çıkmıştır (57). SHV-2, 1985'te tanımlanan ilk SHV tipi GSBL genidir. SHV-2, ilk defa Almanya'da bir *Klebsiella ozaenae* suşundan elde edilmiş ve SHV-1'in 238 pozisyonundaki glisin yerine serin gelmesiyle oluşmuştur (58). SHV-1, ampisilin, tikarsilin ve piperasilin gibi penisilinlere etkilidir ancak oksiminio sefalosporinlere karşı etki göstermemektedir (57). SHV tipi GSBL'ler en sık *K. pneumoniae*'nın klinik izolatlarında görülürken, ayrıca *Enterobacterales* ve *P. aeruginosa*'da da bulunmuştur (59).

CTX-M grubu enzimler TEM ve SHV den farklı olarak sefotaksimi substrat olarak kullanılmaktadırlar (60). CTX-M tipi GSBL'ler konjugatif plazmid ya da transpozon aracılığı ile başka bakteriden horizontal gen transferiyle oluşabilmektedir (61). İlk CTX-M tipi beta-laktamaz (CTX-M-1) 1989'da Almanya'da *E. coli* suşunda keşfedilmiştir (62). Dünya çapında 2000'li yıllardan bu yana, CTX-M tipi GSBL'ler, TEM kaynaklı ve SHV kaynaklı GSBL'lerden daha yaygın hale gelmiştir (63). CTX-M enzimi sefotaksim ve seftriaksona karşı etkili iken seftazidime karşı daha zayıf etki göstermektedir (64).

Plazmid aracılı genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar dünya çapında giderek artmaktadır ve CTX-M tipi GSBL'lerin hem insan hem de hayvan kökenli izolatlar arasında yayılarak arttığı ve birçok ülkede yüksek prevalanslarının bildirildiği dikkati

çekmektedir (65). *Enterobacteriaceae*'da, CTX-M tipi GSBL'ler genellikle aminoglikozidler, tetrasiklinler, sülfonamidler ve trimetoprim gibi ilaçların direnç genlerini de taşıyan plazmidler üzerinde kodlanmaktadır. Özellikle fosfomisin direnç genlerinin CTX-M tipi GSBL'ler ile olan bağlantısı dikkati çekmektedir (66).

Fosfomisin, florokinolon dirençli ve GSBL üreten *E. coli*'ye karşı aktif olduğundan, üriner sistem enfeksiyonlarının (ÜSE) tedavisi için önerilen ilk seçenek antibiyotiklerden biridir (43). Bununla birlikte, plazmid aracılı fosfomisin direnç geni *fosA3*, başta Çin olmak üzere birçok Asya ülkesinde hem insanda hem de hayvanda ortaya çıkmış ve yayılmıştır (67,68,69). Yapılan birçok çalışmayla *fosA3* ve *bla*_{CTX-M} genlerinin aynı plazmid üzerinde taşındığı görülmüştür (67,70,71). Japonya'da başka bir plazmid aracılı fosfomisin direnç geni olan *fosC2* de *bla*_{CTX-M} geni taşıyan *E. coli* izolatları arasında tanımlanmıştır (72). Çin'de yapılan bir çalışmada *Enterobacterales* izolatlarında plazmid aracılı *fosA3* geninin prevalansı ve karakterizasyonu araştırılmıştır. Aynı zamanda hem *fosA3* hem *bla*_{CTX-M} geni taşıyan bir plazmidin, Çin'den ve farklı ülkelerden tespit edilen plazmidlerle karşılaştırılması şekil 1'de gösterilmiştir (73).

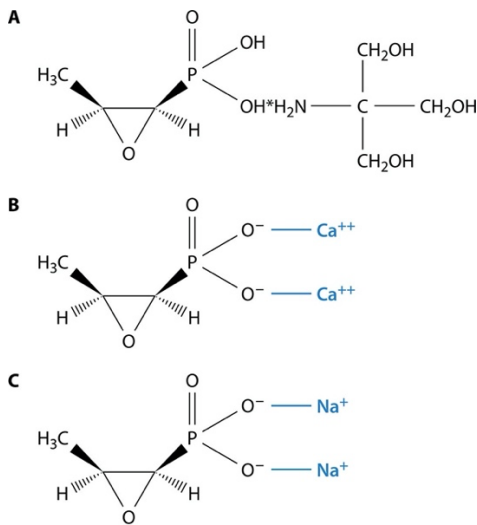


Şekil 1. *fosA3* geni taşıyan F24: A-:B1 plazmid pHNTC9e'nin diğer benzer plazmidlerle karşılaştırılması.

Her daire farklı bir plazmidi temsil eder (içten dışa doğru): pCombat13F7-2, pH 2332-166, pP2-3T, S30 plazmid A ve pHNTC9e. Mobil öğeler yeşil oklarla, antibiyotik direnç genleri kırmızı oklarla, transfer (*tra* ve *trb*) genleri en dıştaki halkada mavi oklarla işaretlenmiştir (73).

2.4. FOSFOMİSİN

Fosfomisin ilk olarak 1969'da Merck, Sharp & Dohme Araştırma Laboratuvarları'ndan *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces viridochromogenes* ve *Streptomyces wedmorensis* tarafından üretilen geniş spektrumlu bir hücre duvarı sentezi inhibitörü olan fosfonomisin olarak rapor edilmiştir. İspanyol ekip CEPA (Compañía Española de Penicilina y Antibióticos) tarafından Avrupa'da geliştirildikten sonra, 1970'lerden itibaren ilk olarak intravenöz (IV) formda (disodyum tuzu) kullanılmaya başlanmış ve daha sonra oral forma (fosfomisin trometamol/trometamin veya fosfomisin kalsiyum) geçiş yapılmıştır. Çoğu Avrupa ülkesinde uzun yıllar kullanılmasına rağmen, komplike olmayan sistitin tedavisinde oral fosfomisin trometamin (Monurol) kullanımının 'Food and Drug Administration'(FDA) tarafından onaylanması 1996 yılını bulmuştur (74). Fosfomisin'in parenteral formunun birçok dirençli patojene karşı etkili olduğu bulunmuş ve çeşitli enfeksiyonların tedavisinde çalışılmıştır (75). Fosfomisinin çeşitli formlarının moleküler yapısı şekil 2'de belirtilmiştir (76).



Şekil 2. (A) Fosfomisin trometamolün moleküler yapısı. (B) Fosfomisin kalsiyumun moleküler yapısı. (C) Fosfomisin disodyumun moleküler yapısı (76).

2.4.1.Fosfomisinin Etki Mekanizması

Fosfomisin, bir epoksit halkası ve bir fosfonik grup içeren, fosfoenolpirüvat (PEP) analogu, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Bakteri hücre duvarı sentezini geri dönüşümsüz olarak engelleyerek bakterisid etki gösterir. Peptidoglikan sentezini, β -laktam ve glikopeptid antibiyotiklerine göre daha erken bir aşamada inhibe eder (77).

Fosfomisin, hedef hücreye girmek için iki farklı transport sistemi kullanır. İlki glukoz-6-fosfat tarafından indüklenen heksoz monofosfat taşıma sistemi (UhpT) iken, diğeri gliseralehid-3-fosfat tarafından indüklenen L- α -gliserofosfat taşıma sistemi (GlpT)'dir. Fosfomisin hücre içine girip sitoplazmaya ulaştıktan sonra peptidoglikan sentezinin ilk basamağında görevli olan MurA enziminin 115. sistein rezidüsüne bağlanarak etki göstermektedir. MurA enzimi, diğeri adıyla UDP-N-asetilglukozamin enolpiruvil transferaz, N-asetilglukozamin ve fosfoenolpiruvattan (PEP) N-asetilmuramik asit (peptidoglikan öncüsü) sentezini katalize eder. Hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilerin, peptidoglikan sentezi için N-asetilmuramik asit oluşumunu gerektirmesi, fosfomisinin etki spektrumunun çok geniş olmasını sağlamıştır (74,77,78). Bu nedenle fosfomisin, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA), metisiline dirençli *koagülaz negatif stafilokoklar* (MRKNS), vankomisine dirençli *enterokoklar* (VRE), penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae*, GSBL üreten *Enterobacterales*, karbapenemaz üreten *Enterobacterales* (KPE) ve ÇİD *P. aeruginosa* gibi birçok dirençli patojenin tedavisinde kullanılmıştır (79).

2.4.2. Fosfomisinin Farmakodinamik/Farmakokinetik (FD/FK) Özellikleri

Fiziksel-kimyasal özellikleri açısından fosfomisin, çoğu dokuya ve interstisyel sıvıya kolayca yayılan, düşük molekül ağırlıklı, plazma protein bağlanması düşük, suda çözünür bir bileşiktir. Çalışmalar, fosfomisinin iltihaplı dokulara, kemiklere ve akciğerlere nüfuz ettiğini ve uygun konsantrasyonlara ulaştığını göstermiştir (80). Fosfomisinin metabolize olmamış formu neredeyse sadece idrarla atılmaktadır (81).

Fosfomisin, plazma proteinlerine düşük oranda bağlandığı için özellikle glomerüler filtrasyon yolu ile elimine edilmektedir ve bu yüzden klirensi glomerüler filtrasyon hızı ile iyi bir korelasyon göstermektedir (82).

Fosfomisin 3 gr'lık tek doz kullanım sonrasında yaklaşık iki saat içinde maksimum serum konsantrasyonuna (22-32 µg/ml) ulaşmaktadır. Tek doz (3g) fosfomisinin biyoyararlanımı %34 ila %41 arasında değişmektedir. Fosfomisinin ortalama yarı ömrü 5.7 saattir. Fosfomisin esas olarak idrar yolu ile atılırken sadece <%0,5'i biliyer yolla elimine edilmektedir. Fosfomisinin ortalama pik idrar konsantrasyonları, 3 gr'lık tek doz kullanım sonrasındaki ilk 4 saat içinde ortaya çıkmaktadır ve genellikle 1053 ila 4415 mg/L aralığındadır. Tek bir dozun yaklaşık %32-43'ü 48 saat içinde ve bunun yaklaşık %85-95'i 24 saat içinde atılmaktadır. Bununla birlikte, çoğu üriner patojeni inhibe etmek için yeterli olan >128 mg/L fosfomisin konsantrasyonları, tek bir 3 g oral dozdan sonra 24-48 saat boyunca korunmaktadır (83).

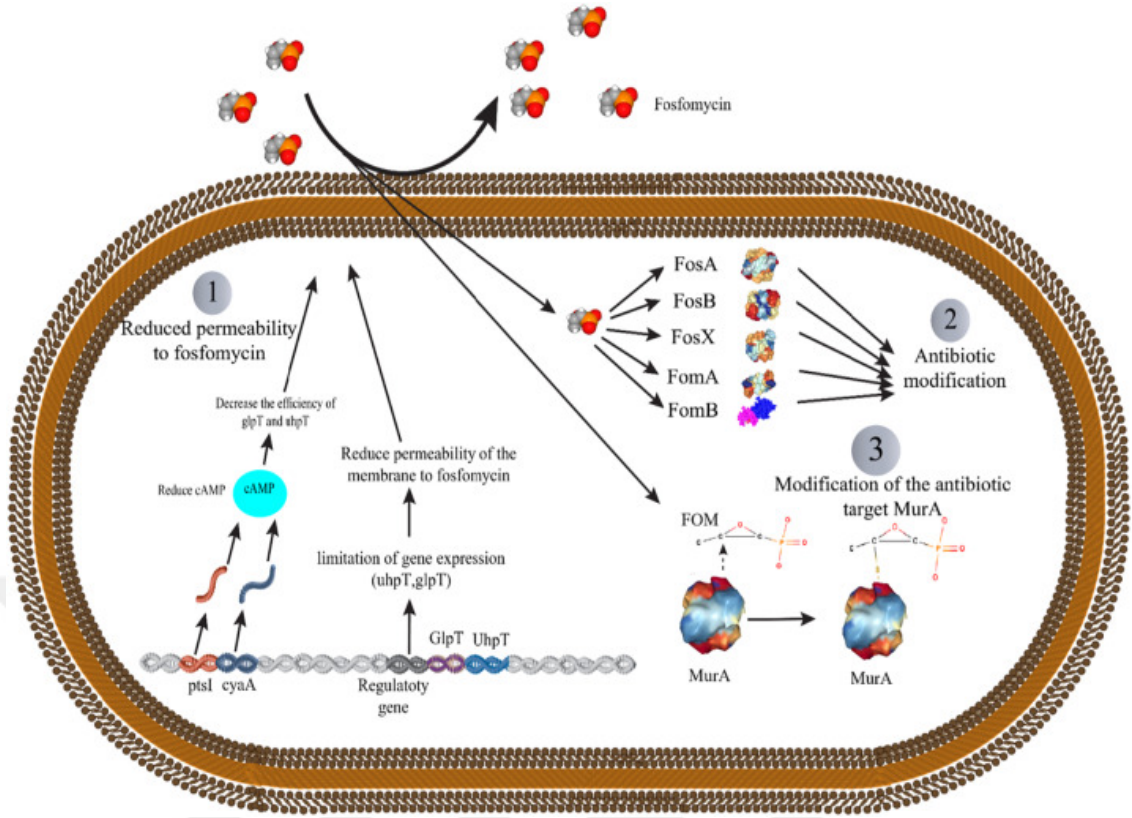
Oral uygulama için iki fosfomisin tuzu mevcuttur: fosfomisin trometamin ve fosfomisin kalsiyum. Her iki tuz da oral uygulamayı takiben hızla emilir ancak fosfomisin kalsiyum, asidik gastrik ortamda hidrolizle inaktive edildiğinden, fosfomisin trometamin için biyoyararlanım %40 iken, fosfomisin kalsiyum için bu oran %12'dir (84,85).

Fosfomisinin bakteriyolojik aktivitesi ile ilişkili FK/FD parametresi net bir şekilde tanımlanamamıştır ve mikroorganizmaya bağlı olduğu düşünülmektedir. Son çalışmalar, gram-negatif basillerde (*P. aeruginosa*, *E. coli* ve *Proteus spp.*) fosfomisin aktivitesini en iyi gösteren FK/FD parametresinin, eğri altında kalan alanın minimum inhibitör konsantrasyona oranı (AUC/MIC) olduğu öngörülmektedir (86).

2.4.3.Fosfomisin Direnç Mekanizmaları

Fosfomisin direnci, üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir (şekil 3) (87)

- 1) Fosfomisine geçirgenliğin azalması
- 2) Antibiyotiğin hedef bölgesi olan MurA'daki modifikasyonlar
- 3) Enzimatik inaktivasyon (14,81,88).



Şekil 3. Fosfomisin direnç mekanizmaları; 1. Fosfomisine azalmış geçirgenlik, 2. Fosfomisin modifiye edici enzimler ve 3. MurA aktif bölgesi sistein rezidüsünün fosfomisin tarafından modifikasyonu (87)

İlk iki mekanizma kromozom kontrolünde iken, üçüncü mekanizma kromozom veya plazmid aracılı olmaktadır. Kromozom aracılı direnç mekanizmalarının çoğunda, transport sistemlerindeki mutasyonlar nedeniyle direnç oluşmaktadır (74).

1) Fosfomisine geçirgenliğin azalması

Fosfomisin taşıyıcı sistemindeki *glpT* ve/veya *uhpT* genlerindeki mutasyon veya bunların düzenleyici genleri olan *uhpA*, *uhpB* ve *uhpC*'den birinde veya her ikisinde meydana gelen mutasyonlar sonucu fosfomisine olan geçirgenlik azalmaktadır (89). Kromozomal olarak gelişen bu direnç mekanizması ilk olarak *E. coli* ve *P. aeruginosa* izolatlarında tanımlanmıştır. *A. baumannii*'deki kromozomal direnç ise tetrasiklin ve kloramfenikol direncinden de sorumlu *abrp* genindeki mutasyonlarla oluşmaktadır (78).

2) Antibiyotiğin hedef bölgesi olan MurA'daki modifikasyonlar

Fosfomisin'in hedef bölgesi olan MurA'daki modifikasyonlar da fosfomisin direnci ile sonuçlanmaktadır. *E. coli*'de fosfomisin, MurA'nın 115. pozisyonunda sisteine kovalent olarak bağlanmaktadır. Bu aktif bölgede sistenin aspartat ile yer değiştirmesinin fosfomisine dirençle sonuçlandığı gösterilmiştir (90,91).

Mycobacterium tuberculosis fosfomisine doğal dirençlidir. Bunun sebebi ise MurA'nın 117. pozisyonunda sistein yerine bir aspartat bulunması sonucu fosfomisinin etki gösterememesidir (78).

MurA'nın aşırı ekspresyonu, fosfomisine dirençli bir fenotipin gelişimine katkıda bulunabilen başka bir mekanizmadır (92). Bununla birlikte, MurA modifikasyonu veya aşırı ekspresyonuna bağlı direnç, *glpT* ve *uhpT* genlerindeki mutasyon gibi taşıyıcı aracılı mekanizmalarla karşılaştırıldığında daha nadir görülmektedir (74).

3) Enzimatik inaktivasyon

Fosfomisin modifiye edici enzimler, fosfomisinin enzimatik inaktivasyonuna neden olarak direnç gelişimine yol açmaktadır. Enzimatik inaktivasyon fosfomisinin epoksit halkasının enzimatik açılması ile ya da fosfonat grubunun fosforilasyonu ile etkisizleştirilmesine dayanmaktadır. Bu modifiye edici enzimler kromozomal olarak kodlanabilir ancak *E. coli* başta olmak üzere çeşitli bakteriler tarafından plazmidler aracılığıyla kodlanıp aktarılabilmektedirler (93,94).

Tüm bu direnç mekanizmaları göz önünde bulundurulduğunda, epidemiyolojik önemi nedeniyle en çok dikkat çeken mekanizma, fosfomisin inaktivasyonudur (78).

Fosfomisin modifiye edici enzimler; FosA, FosB ve FosX olmak üzere 3 metalloenzim ve FomA ve FomB olmak üzere 2 kinaz grubu enzimden oluşmaktadır (77). Metalloenzimler fosfomisin'in epoksit halkasını açarak etki gösterirler ve bunu yaparken çeşitli substratlar kullanmaktadırlar (74,77,78). FosA, glutatyon kullanırken, FosB, basilitiol ve FosX, su kullanmaktadır (95,96,97) (Şekil 4).

Fosfomisin'in modifiye edici enzimlerle inaktivasyonu ilk olarak FosA tarafından kodlanan glutatyon S-transferaz adlı bir metalloenzim grubunda tanımlanmıştır (91). Bu enzim, kofaktör olarak Mn^{+2} ve K^{+} kullanır. *fosA* geni çoğunlukla *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.* ve *Acinetobacter* türlerinde

bulunur (91). *fosA* geninin birçok alt tipi tanımlanmıştır: *fosA2*, *fosA3*, *fosA4*, *fosA5*, *fosA6*, *fosA7* (72,98-102).

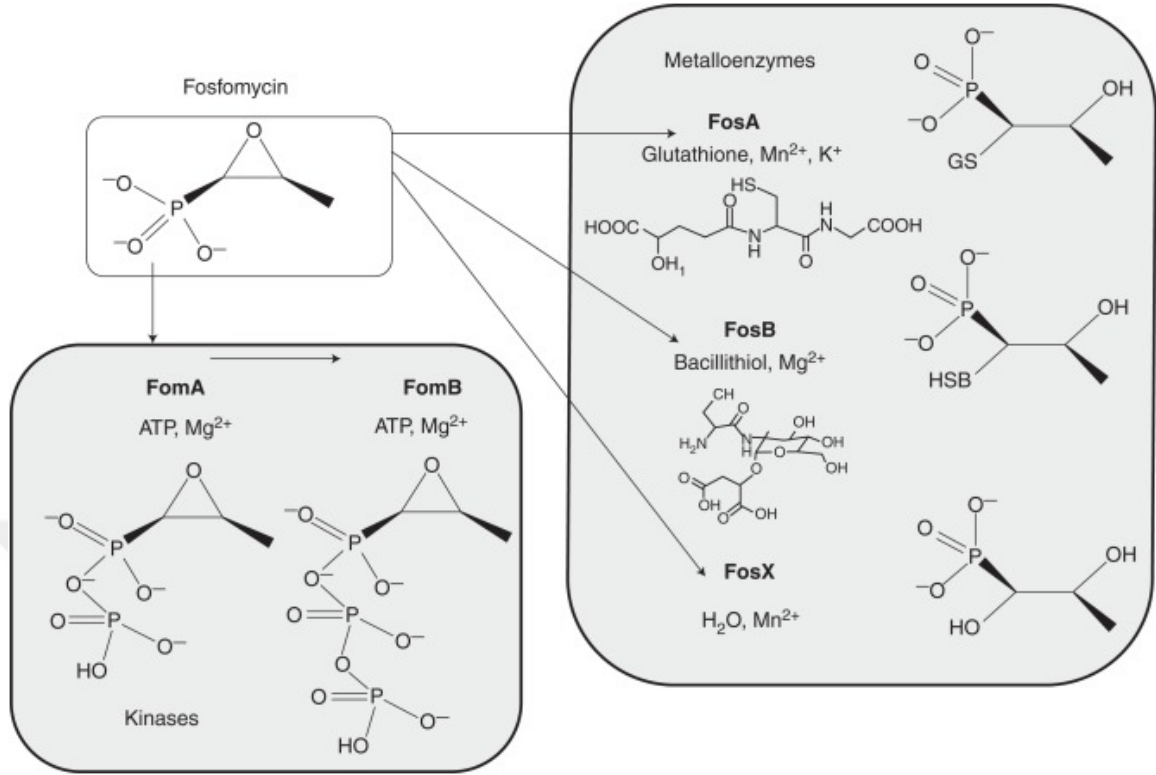
Bu Fos enzim grupları arasında, epidemiyolojik açıdan en ilgili olanı, *E. coli*'deki plazmit aracılı FosA3'tür (74). FosA3 ilk olarak 2006'da Japonya'da tanımlanmış bir *E. coli* klinik izolatından bildirilmiştir (72). FosA3, Asya ülkelerinde ve son zamanlarda Avrupa'da klinik ve çevresel *E. coli* izolatları arasında en yaygın olarak görülen Fos enzim çeşididir (67). Ancak daha sonra Doğu Asya'da (Çin, Hong Kong, Kore ve Japonya), GSBL üreten *E. coli* 'de ve daha az olarak *K. pneumoniae* 'da (insanlardan ve evcil hayvanlardan) *fosA3* geni bildirilmiştir (67,103,). *fosA* geni ve *fosA2*, *fosA3*, *fosA4*, *fosA5* ve *fosA6* gibi çeşitli homolog genleri, GSBL üreten *E. coli* izolatlarında ve karbapenemaz üreten *K. pneumoniae*'da plazmidlerle ilişkilendirilmiştir (78).

Başka bir fosfomisin modifiye edici enzim olan Fos B, fosfomisini sistein veya basilitiol molekülü kullanarak inaktive eder. FosB, FosA ile %38 aminoasit benzerliği gösterse de Mg^{+2} 'ye bağımlı bir enzim olması ve tiyol donörü olarak sistein kullanmasıyla FosA'dan ayrılmaktadır (104). Mevcut veriler, *fosB* geninin ağırlıklı olarak gram-pozitif bakterilerde ifade edildiğini ve hem plazmitte (*Staphylococcus spp.* ve *Enterococcus spp.*'de) hem de kromozomda kodlanabildiğini (*Bacillus subtilis*' te) göstermektedir (104,105,106).

FosX; FosA ve FosB enzimleriyle ilişkilidir, ancak halkayı kırmak için su kullanan Mn^{+2} bağımlı bir epoksit hidrolazdır. FosX enzimleri *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* ve *Brucella melitensis*' te bulunmuştur (14).

Plazmid aracılı fosfomisin modifiye edici enzimlerin başka bir grubu FosC, ATP'yi kullanarak fosfomisine bir fosfat grubu eklemekte, bunun sonucunda fosfomisin inaktivasyonu gerçekleşmektedir (107). FosC2, FosA ile %56 oranında amino asit dizisi benzerliği paylaşmaktadır (72).

Fos enzimlerinin moleküler yapısı şekil 4'te gösterilmiştir (77).



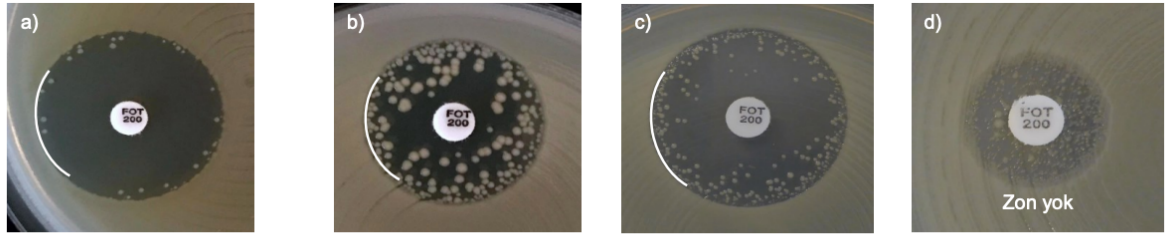
Şekil 4. Fosfomisin inaktivasyonuna yol açan fosfomisin modifiye edici enzimler (77).

2.4.4. Fosfomisin İn vitro Duyarlılık Yöntemleri

Fosfomisin in vitro duyarlılığı, agar dilüsyon, disk difüzyon ve gradient testleri ile saptanabilmektedir. Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından fosfomisine duyarlılık çalışması için önerilen referans yöntem, besiyerine glikoz-6-fosfat (G-6-P/25 mg/L) eklenerek yapılan agar dilüsyon yöntemidir.

CLSI, disk difüzyon yöntemini yalnızca üriner sistem örneklerinden üreyen *E.coli* klinik izolatlarında önerirken diğer *Enterobacterales* türleri için bu test önerilmemektedir (108). EUCAST de yine aynı şekilde disk difüzyon yöntemini *Enterobacterales* türleri içinde sadece *E. coli* için önerirken, *E. coli* dışında kalan diğer *Enterobacterales* türleri için mutlaka agar dilüsyon yönteminin kullanılmasını önermektedir (109).

E. coli'de fosfomisinin hücre içine taşınmasında görevli olan heksoz-6-fosfat (UhpT) yolağı, ekstraselüler G-6-P tarafından indüklenir. Bu yüzden agar dilüsyon yönteminde yanlış direnç oranlarını azaltmak için besiyerine 25 mg/L G-6-P eklenir. Disk difüzyon testinde, diskler G-6-P ile desteklendiğinden (200 µg fosfomisin / 50 µg G-6-P) besiyerine G-6-P eklenmesi gerekli değildir (108,109). Disk difüzyon yönteminde *E. coli* izolatlarının %41 kadarında inhibisyon zonu içinde koloniler görülebildiği için inhibisyon zonu değerlendirilirken dikkatli olunmalıdır (78). EUCAST, *E. coli* için inhibisyon zonu içinde üreyen kolonilerin dikkate alınmaması gerektiğini önermiştir (Şekil 5) (109).



***Escherichia coli* ve fosfomisin için inhibisyon zonu örnekleri.**
a-c) Tüm kolonileri gözardı et ve dış zon sınırını değerlendir.
d) Inhibisyon zonu yok olarak değerlendir.

Şekil 5. Fosfomisin duyarlılığının disk difüzyon yöntemiyle değerlendirilmesi

3. MATERYAL VE METOD

3.1. İZOLATLARIN TOPLANMASI VE SAKLANMASI

Bu çalışma Ankara Bilkent Şehir Hastanesi 2 No'lu Etik Kurul Başkanlığı tarafından E2-22-1973 sayılı kararı ile 22/06/2022 tarihinde onaylanmıştır.

Çalışmaya Ağustos 2022-Şubat 2023 tarihleri arasında Ankara Şehir Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na kültür için gönderilmiş idrar örneklerinden izole edilen ve fosfomisine dirençli bulunan 97 *E. coli* izolatu dahil edilmiştir. Her hastanın sadece tek bir örneği çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatlar, çalışma yapılarına kadar %10 gliserollü beyin kalp infüzyon (BHI) buyyon içinde -20°C'de saklanmıştır.

3.2. MİKROBİYOLOJİK KÜLTÜR VE TANIMLAMA

1. Laboratuvara kültür için gönderilen idrar örneklerinin ekimleri kanlı agar ve UTI agar besiyerlerine yapıldı.
2. Ekim yapılmış plaklar etüvde 37°C'de 18-24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plakta saf olarak $\geq 10^5$ CFU/ml koloni üreyen izolatlar işleme alındı.
3. İzolatların tanımlanması için matriks destekli lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş süresi kütle spektrometrisi (MALDİTOF-MS, Biomerieux, Fransa) kullanıldı.
4. MALDİTOF-MS ile *E. coli* olarak tanımlanan izolatlar antimikrobiyal duyarlılık testleri için ileri işleme alındı.

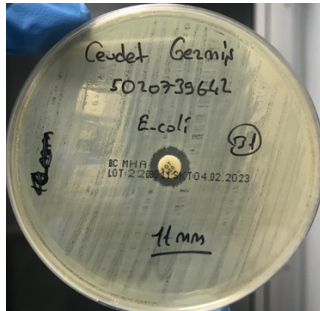
3.3. ANTİMİKROBİYALLERE DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI

1. Rutin bakteriyoloji laboratuvarında kullanılan otomatize sistem Vitek 2 (Biomerieux, Fransa) cihazı ve AST N327 kartı kullanılarak antimikrobiyal duyarlılık testleri yapıldı.
2. Otomatize sistemle fosfomisine dirençli saptanan izolatlar çalışmaya dahil edildi.
3. Otomatize sistemle fosfomisin direnci saptanan izolatlara aynı zamanda Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemiyle fosfomisin duyarlılık testi yapıldı ve sonuçlar not edildikten sonra ileri işlem için izolatlar %10 gliserollü BHI buyyon içinde -20 °C 'de saklandı.

4. Klinik izolatların toplanma süreci içerisinde otomatize sistem güncellenmesi gerçekleşmesi ve yeni gelen AST kartında (Vitek 2 AST-N423) artık fosfomisin antibiyotiğinin yer almaması nedeniyle, fosfomisin dirençli suşların belirlenebilmesi için tarama testi olarak disk difüzyon yöntemine geçildi.
5. Otomatize sistem ve/veya disk difüzyon yöntemi ile fosfomisine dirençli bulunan 97 *E. coli* izolatına aynı zamanda referans yöntem olan agar dilüsyon yöntemi ile fosfomisin duyarlılığı bakıldı.

3.3.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi İle Fosfomisin Duyarlılığının Araştırılması (110)

1. Laboratuvara kültür için gönderilen idrar örneklerinden saf 10^5 CFU/ml koloni *E. coli* üreyen plaklar işleme alınmıştır.
2. İlk aşamada benzer morfoloji gösteren kolonilerden birkaç tanesi steril öze yardımıyla alındı ve steril salinle (%0.45 NaCl) karıştırılarak 0.5 McFarland bulanıklığında 2×10^8 CFU/ml bakteri sayısına karşılık gelen homojen bir süspansiyon elde edildi.
3. Hazırlanan çözeltiye steril pamuklu eküvyon çubuğu daldırıldı. Eküvyondaki inokulumun Müller Hinton Agar besiyeri yüzeyine, üç yönde bütün plağı kaplayacak şekilde çubuk yardımıyla yayılması sağlandı.
4. Ardından fosfomisin diski (200 µg Fosfomisin Trematol/ 50 µg Glikoz-6-Fosfat) (Oxoid™) agar yüzeyine yerleştirilerek 37 °C etüvde 18-24 saat inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrasında inhibisyon zon çapı kumpas (çap ölçer) ile ölçüldü.
6. Antibiyotik duyarlılığı EUCAST önerilerine göre değerlendirildi, inhibisyon zon çapı 24 mm ve üzeri olan koloniler duyarlı, 24 mm'den küçük olan koloniler dirençli olarak kabul edildi (109).



Resim 1. Fosfomisin Duyarlılığının Disk Difüzyon Yöntemi İle Değerlendirilmesi

3.3.2. Agar Dilüsyon Yöntemi İle Fosfomisin Duyarlılığının Araştırılması (110)

1) Fosfomisin çalışma solüsyonlarının hazırlanması

1. Agar dilüsyon testi için fosfomisin trometamol (Sigma-Aldrich, ABD) toz antibiyotiği kullanıldı. Toz antibiyotik, distile su kullanılarak belirli konsantrasyonlarda antibiyotik içeren çalışma solüsyonları elde edilmesi amacıyla sulandırıldı.
2. Çalışmamızda agar dilüsyon plaklarımızın 0,25 – 128 mg/L dilüsyon aralığında 10 farklı antibiyotik konsantrasyonu içermesi planlandı.
3. Hazırlanan antibiyotik solüsyonları sonraki aşamalarda 25 mg/L konsantrasyonda G-6-P içeren Mueller-Hinton agar besiyeri ile 1/10 oranında sulandırılacağından 2,5- 1280 mg/L konsantrasyon aralıklarındaki fosfomisin içeren antibiyotik solüsyonları hazırlanması gerekmektedir. Bunun için 10 adet steril tüp alınarak hedef stok antibiyotik konsantrasyonları üzerlerine yazılarak tüpler 1’den 10’a kadar numaralandırıldı.
4. Aşağıda yer alan hacim-ağırlık-potens-konsantrasyon formülüne dayanarak 64 mg ağırlığındaki fosfomisin trometamol toz antibiyotiği hassas terazi ile tartılıp 50 ml hacimdeki distile su içinde çözülerek 1280 mg/L konsantrasyonda fosfomisin trometamol içeren antibiyotik stok solüsyonu hazırlandı.

$$\text{Hacim(ml)} = \frac{\text{Ağırlık (mg)} \times \text{Potens (}\mu\text{g/mg)}}{\text{Konsantrasyon (}\mu\text{g/ml)}}$$

5. Seri sulandırmalar yapmak amacıyla daha önceden 1’den 10’a kadar numaralandırılmış tüplerin ilki haricindekilere 5’er ml steril distile su eklendi. Birinci ve ikinci tüplere, 1280 mg/L konsantrasyondaki antibiyotik stok solüsyonundan doğrudan 5’er ml ilave edildi. Böylece 2. tüpte yarı yarıya sulandırım sağlanmış olup 10 ml hacme sahip 640 mg/L sonuç konsantrasyonunda antibiyotik solüsyonu elde edildi.

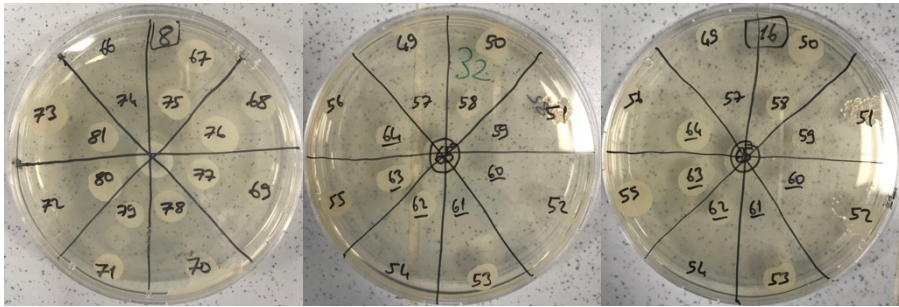
6. İçinde 5 ml distile su bulunan her tüpe, bir önceki tüpteki solüsyondan 5 ml eklenerek, son konsantrasyonun 2,5 mg/L olduğu tüpe kadar iki kat seri sulandırım işlemi yapıldı. Son tüpte oluşan hacimden ise steril pipet ile 5 ml çekilerek dışarıya atıldı. Bu aşamada tüplerde 2.5-1280 mg/L arasındaki 10 farklı fosfomisin konsantrasyonunda solüsyonlar elde edildi.

2) Fosfomisin agar dilüsyon plaklarının hazırlanması

1. Besiyeri olarak Mueller-Hinton agar, (BD, ABD) firma önerileri doğrultusunda distile su içinde hazırlandı.
2. Otoklavda uygun koşullarda 15-20 dakika sterilize edildikten sonra soğuması beklenerek, içerisine 25 mg/L konsantrasyonda olacak şekilde G-6-P (Sigma-Aldrich, ABD) eklenip su banyosunda 45-50°C'de agar petrilere dökülünceye kadar donmadan bekletildi.
3. 10 farklı konsantrasyonda fosfomisin agar içerecek olan steril petriler hazırlanarak, petrilere oluşacak son fosfomisin konsantrasyonları plakların üzerine yazıldı.
4. Daha önceden steril şekilde hazırlanmış falkon tüplerine, fosfomisin stok solüsyonundan 5 ml ve G-6-P içeren MHA besiyerinden 45 ml konularak karıştırıldı. Bu şekilde her flakona belirli konsantrasyonda 1 birim fosfomisin stok solüsyonu ve 9 birim MHA konularak fosfomisin agar besiyerimiz petrilere dökülmek üzere hazırlandı. 90 mm'lik petrilere fosfomisin stok solüsyonu içeren bu MHA karışımından yaklaşık 20 ml dökülerek 4 mm kalınlığında agarlar elde edildi.
5. Bu şekilde 128 mg/L, 64 mg/L, 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L ve 0,25 mg/L olmak üzere 10 farklı konsantrasyonda fosfomisin içeren agar plakları hazırlandı.
6. Hazırlanan plakların bir kısmı hemen kullanılmış diğerleri ise parafilm ile kaplanarak ağzı kapalı şekilde beş gün içinde kullanılmak koşuluyla buzdolabında 4°C'de saklandı.

3) Agar dilüsyon yöntemi için izolatların hazırlanması

1. Gliserollü buyyonda stoklanmış *E. coli* izolatlarının KKA'a yapılan ikinci pasajlarıyla elde edilen taze kolonilerden, serum fizyolojik içinde yaklaşık 2×10^8 cfu/ml bakteri sayısına denk gelen 0,5 McFarland standardına eş değer bakteri solüsyonu hazırlandı.
2. 0,5 McFarland bulanıklıktaki bu solüsyon 2 kere 1/10 ve takiben 1/2 olmak üzere serum fizyolojik içeren cam tüpte totalde 1/200 oranında sulandırılarak 10^6 cfu/ml bakteri süspansiyonu elde edildi.
3. 10^6 cfu/ml bakteri içeren süspansiyondan fosfomisin içeren agar plaklarına ekilmek üzere 10 µl alınarak petri yüzeyindeki son bakteri süspansiyonu 10^4 cfu /ml bakteri olacak şekilde ayarlandı.
4. Bakteri süspansiyonundan steril öze ile 10'ar µl alınarak MHA yüzeyine damla şeklinde bırakıldı.
5. Ekim yapılmış plaklar 37 °C etüvde 18-24 saat inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrasında ekim yapılan plaklarda bakteri üremesi varlığı değerlendirildi. Bakteri üremesinin görülmediği ilk antibiyotik konsantrasyon değeri MİK olarak belirlendi.



Resim 2. Fosfomisin Duyarlılığının Agar Dilüsyon Yöntemiyle Değerlendirilmesi

66 ve 74 nolu izolatlar 8 mg/L konsantrasyonunda fosfomisine duyarlı, 54, 57, 60, 61 nolu izolatlar 16 ve 32 mg/L konsantrasyonunda fosfomisine duyarlı ve 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 62, 63, 64 nolu izolatlar 16 ve 32 mg/L konsantrasyonunda fosfomisine dirençliydi.

3.4. MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE FOSFOMİSİN DİRENÇ GENLERİNİN SAPTANMASI

3.4.1. DNA izolasyonu

Mikroorganizmadan DNA elde etmek için kaynatma yöntemi kullanıldı.

1. Çalışma öncesinde ilk olarak gliserollü BHI buyyonunda -20°C’de saklanan stoklar çözülerek canlandırma pasajı yapıldı.
2. Her bir izolat kanlı agara ekim yapıldıktan sonra 37 °C’de 18-24 saat inkübe edildi.
3. Kanlı agar plaklarında saf olarak üretilen *E. coli* kolonilerinden bir öze dolusu alınıp 1 ml beyin kalp infüzyon buyyonuna ekilerek bir gecelik inkübasyona bırakıldı (37°C’ de 18-24 saat).
4. Sıvı besiyerinde üreyen bakteri süspansiyonu 13000 rpm’de 20 dk santrifüj edildi.
5. Üste kalan sıvı aspire edildikten sonra üzerine 200 µl steril distile su eklenip tüpler vortekslenerek 20 dk 99 °C’de ısı bloğunda kaynamaya bırakıldı.
6. Isı bloğundan çıkarılan tüpler 13000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi.
7. Ardından dipteki çökeltiye dokunmadan üstteki sıvıdan 200 µl yeni bir steril ependorf tüpüne alındı.
8. İzolasyon sonrası elde edilen DNA -20°C’de saklandı.

3.4.2. *fosA3*, *fosA*, *fosC2*, *fosX*, *fosB* genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmesi

Fosfomisine dirençli olan izolatlarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemiyle *fosA3*, *fosA*, *fosC2*, *fosX*, *fosB* genleri araştırıldı. DNA amplifikasyonları ThermalCycler (Corbett Research RG-6000, Rotor-Gene) cihazı ile yapıldı.

Kullanılan Primerler:

Primer	Baz Dizisi	Baz Uzunluğu	Kaynak
<i>fosA3</i>	F: 5'-GGC ATT TTA TCA GCA GT-3' R: 5'-AGA CCA TCC CCT TGT AG-3'	350 bp	(69)
<i>fosA</i>	F: 5'-ATC TGT GGG TCT GCC TGT CGT-3' R: 5'-ATG CCC GCA TAG GGC TTCT-3'	271 bp	(69)
<i>fosC2</i>	F: 5'-CGA GCC AAG ATT ACT GT-3' R: 5'-AAC GAT TCC AAA CGA CT-3'	196 bp	(69)
<i>fosX</i>	F: 5'-ATGATCAGTCATATGACATTTATCG-3' R: 5'-ATTTAGCCCCCTTGTCGATAACG-3'	243 bp	(111)
<i>fosB</i>	F: 5'-CAGAGATATTTTAGGGGCTGACA-3' R: 5'-CTCAATCTATCTTCTAAACTTCCTG-3'	312 bp	(111)

fosA3 geninin PZR karışımı aşağıda şekildeki gibi hazırlandı:

İçerik	Hacim
Mastermix (5x)	5 µl
Primer F (100 pmol)	0,1 µl
Primer R (100 pmol)	0,1 µl
Nükleaz free distile su	17,8 µl
Hedef DNA	2 µl
Toplam Hacim	25 µl

PZR Koşulları (112):

- 1) İlk denatürasyon: 94°C 5 dakika
- 2) Denatürasyon: 94°C 30 saniye
- 3) Primer birleşmesi: 57,5°C 30 saniye
- 4) Uzama: 72 °C 1 dakika

Yukarıdaki basamaklar toplamda 30 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. Ardından 72 °C'de 7 dakika son uzama basamağı yapıldı ve reaksiyon sonlandırıldı.

fosA geninin PZR karışımı aşağıda şekildeki gibi hazırlandı:

İçerik	Hacim
Mastermix (5x)	5 µl
Primer F (100 pmol)	0,1 µl
Primer R (100 pmol)	0,1 µl
Nükleaz free distile su	16,8 µl
Hedef DNA	3 µl
Toplam Hacim	25 µl

PZR Koşulları (112):

- 1) İlk denatürasyon: 94°C 5 dakika
- 2) Denatürasyon: 94°C 30 saniye
- 3) Primer birleşmesi: 59,5°C 30 saniye
- 4) Uzama: 72 °C 1 dakika

Yukarıdaki basamaklar toplamda 30 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. Ardından 72°C’de 7 dakika son uzama basamağı yapıldı ve reaksiyon sonlandırıldı.

fosC2 geninin PZR karışımı aşağıda şekildeki gibi hazırlandı:

İçerik	Hacim
Mastermix (5x)	5 µl
Primer F (100 pmol)	0,1 µl
Primer R (100 pmol)	0,1 µl
Nükleaz free distile su	17,8 µl
Hedef DNA	2 µl
Toplam Hacim	25 µl

PZR Koşulları (112):

- 1) İlk denatürasyon: 94°C 5 dakika
- 2) Denatürasyon: 95°C 20 saniye
- 3) Primer birleşmesi: 51°C 30 saniye
- 4) Uzama: 72 °C 30 saniye

Yukarıdaki basamaklar toplamda 35 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. Ardından 72 °C’de 3 dakika son uzama basamağı yapıldı ve reaksiyon sonlandırıldı.

fosX geninin PZR karışımı aşağıda şekildeki gibi hazırlandı:

İçerik	Hacim
Mastermix (5x)	5 µl
Primer F (100 pmol)	0,1 µl
Primer R (100 pmol)	0,1 µl
Nükleaz free distile su	17,8 µl
Hedef DNA	2 µl
Toplam Hacim	25 µl

PZR Koşulları (111):

- 1) İlk denatürasyon: 94°C 5 dakika
- 2) Denatürasyon: 94°C 30 saniye
- 3) Primer birleşmesi: 50°C 30 saniye
- 4) Uzama: 72 °C 1 dakika

Yukarıdaki basamaklar toplamda 30 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. Ardından 72 °C’de 7 dakika son uzama basamağı yapıldı ve reaksiyon sonlandırıldı.

fosB geninin PZR karışımı aşağıda şekildeki gibi hazırlandı:

İçerik	Hacim
Mastermix (5x)	5 µl
Primer F (100 pmol)	0,1 µl
Primer R (100 pmol)	0,1 µl
Nükleaz free distile su	17,8 µl
Hedef DNA	2 µl
Toplam Hacim	25 µl

PZR Koşulları (111):

- 1) İlk denatürasyon: 94°C 5 dakika
- 2) Denatürasyon: 94°C 30 saniye
- 3) Primer birleşmesi: 50°C 30 saniye
- 4) Uzama: 72 °C 1 dakika

Yukarıdaki basamaklar toplamda 30 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. Ardından 72 °C’de 7 dakika son uzama basamağı yapıldı ve reaksiyon sonlandırıldı.

3.4.3. *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmesi

Fosfomisine dirençli izolatlarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemiyle *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} genleri araştırıldı. DNA amplifikasyonları ThermalCycler (Corbett Research RG-6000, Rotor-Gene) cihazı ile yapıldı.

Kullanılan Primerler:

Primer	Baz Dizisi	Baz Uzunluğu	Kaynak
<i>bla</i> _{CTX-M}	F-5'-TCT TCC AGA ATA AGG AAT CCC-3' R- 5'- CCG TTT CCG CTA TTA CAA AC-3'	909 bp	(113)
<i>bla</i> _{TEM}	F: 5'-TTGGGTGCACGAGTGGGTTA-3' R: 5'- TAATTGTTGCCGGAAGCTA -3'	506 bp	(114)
<i>bla</i> _{SHV}	F: 5'- TCGGGCCGCGTAGGCATGAT-3' R: 5'- AGCAGGGCGACAATCCCCGCG -3'	628 bp	(114)

*bla*_{CTX-M} geninin PZR karışımı aşağıda şekildeki gibi hazırlandı:

İçerik	Hacim
Mastermix (5x)	5 µl
Primer F (100 pmol)	0,1 µl
Primer R (100 pmol)	0,1 µl
Nükleaz free distile su	17,8 µl
Hedef DNA	2 µl
Toplam Hacim	25 µl

PZR Koşulları (112):

- 1)İlk denatürasyon: 94°C 5 dakika
- 2)Denatürasyon: 95°C 20 saniye
- 3)Primer birleşmesi: 51°C 30 saniye
- 4)Uzama: 72 °C 30 saniye

Yukarıdaki basamaklar toplamda 35 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. Ardından 72 °C’de 3 dakika son uzama basamağı yapıldı ve reaksiyon sonlandırıldı.

*bla*_{TEM} PZR karışımı aşağıda şekildeki gibi hazırlandı:

İçerik	Hacim
Mastermix (5x)	5 µl
Primer F (100 pmol)	0,1 µl
Primer R (100 pmol)	0,1 µl
Nükleaz free distile su	17,8 µl
Hedef DNA	2 µl
Toplam Hacim	25 µl

PZR Koşulları (114):

- 1) İlk denatürasyon: 95°C 3 dakika
- 2) Denatürasyon: 94°C 1 dakika
- 3) Primer birleşmesi: 55°C 30 saniye
- 4) Uzama: 72 °C 1 dakika

Yukarıdaki basamaklar toplamda 35 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. Ardından 72 °C’de 7 dakika son uzama basamağı yapıldı ve reaksiyon sonlandırıldı.

bla_{SHV} PZR karışımı aşağıda şekildeki gibi hazırlandı:

İçerik	Hacim
Mastermix (5x)	5 µl
Primer F (100 pmol)	0,1 µl
Primer R (100 pmol)	0,1 µl
Nükleaz free distile su	17,8 µl
Hedef DNA	2 µl
Toplam Hacim	25 µl

PZR Koşulları (114):

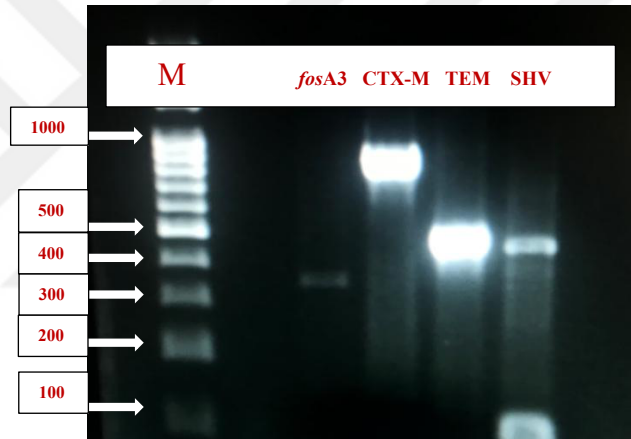
- 1) İlk denatürasyon: 95°C 3 dakika
- 2) Denatürasyon: 94°C 1 dakika
- 3) Primer birleşmesi: 52 °C 30 saniye
- 4) Uzama: 72 °C 1 dakika

Yukarıdaki basamaklar toplamda 35 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. Ardından 72 °C’de 7 dakika son uzama basamağı yapıldı ve reaksiyon sonlandırıldı.

3.4.4. Agaroz jel elektroforezi

1. Steril olarak hazırlanan 10xTBE çözeltisinden 100 ml alıp 1 litre distile suya tamamlanarak 0,1’lik TBE tamponu hazırlanmıştır.

2. 100 ml 0,1'lik TBE solüsyonu içine 1 gr agaroz toz eklenerek (%1'lik agaroz jel) mikrodalga fırında eritildi.
3. Çözelti 50 °C'ye soğutulduktan sonra içerisine 2,5 µl etidyum bromür eklendi.
4. Düz bir zeminde agarozun döküleceği kalıp hazırlanıp jel dökülerek bir süre katılaşması beklendi. Önceden hazırlanan TBE tampon çözeltisi, jelin üzerini tamamen kapatacak şekilde jelin yürütüleceği tank içine döküldü.
5. PZR ürünlerinin her birinden 5 µl alınıp, 1 µl DNA loading buffer tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara sırasıyla yüklendi.
6. Moleküler ağırlık belirteci olarak 3000 bp ladder (Solis BioDyne, Estonya) kullanıldı.
7. PZR ürünleri 100 voltta 40 dakika yürütülerek jel elektroforezi gerçekleştirildi.



Resim 3. *fosA3*, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. *fosA3*; 350 bp, *bla*_{CTX-M}; 909 bp, *bla*_{TEM}; 506 bp ve *bla*_{SHV}; 628 bp

3.4.5.Dizi analizi

fosA3, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{TEM} birlikte saptandığı iki izolata dizi analizi yapıldı. Dizi analizi Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda uygulandı. Dizi analizi aşamaları şu şekildedir:

1. *fosA3*, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{TEM} PZR ürünleri ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Applied Biosystems, Santa Clara, ABD) kiti ile üreticinin talimatlarına göre saflaştırıldı.

2. PCR tüpü içerisinde 5µL PZR ürünü ve 2 µL ExoSAP-IT solüsyonu karıştırılarak ısı döngüsü cihazında 37 °C’de 15 dakika inkübasyonu takiben 80 °C’de 15 dakika inaktivasyon işlemi yapıldı.
3. Elde edilen ürün kalıp DNA olarak kullanılacak şekilde Big dye terminator kit (BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) kullanılarak Cycle sekans işlemi gerçekleştirildi. Cycle sekans reaksiyonu yaklaşık 20 ng hedef DNA, 5 pmol primer ve 4 µL BigDye Terminator 3.1 içerecek şekilde toplam 10 µL reaksiyon halinde uygulandı.
4. Cycle sekans reaksiyonundan sonra tüm ürünler BigDye X Terminatör saflaştırma Kiti (Life Technologies, Carlsbad, ABD) kullanılarak saflaştırıldıktan sonra DNA dizileme işlemi için ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, ABD) cihazına yüklendi. Dizileme sonrası elde edilen ham veriler ApE-A plasmid Editor (v3.1.3) programı ile analiz edildi.

İlk izolatın sekans analiz sonucu:

fosA3:

CCTATCTCTCCTGTGGGGCGCTGTGGCTGTGCTTGTGCTGGATGAGCAGCGGGCGTAA
AACGCCCCCTCAGGAAAGCGACTATACCCACTACGCCTTCAGCGTGGCGGAAGAAG
AGTTTGCCGGGGTGGTGGCTCTGCTGGCGCAGGCGGGGGCTGAGGTATGGAAAGAT
AACCGCAGTGAAGGGGCGTCTTACTATTTTCTCGACCCTGACGGCCATAAGCTGGAG
CTGCATGTGGGAATCTGGCGCAGCGGCTGGCCGCCTGTCGGAACGCCCTACAAG
GGGATGGTCT

bla_{CTX-M} :

ATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACG
GCGGACGTACAGCAAAAAGTGGCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGAAGACTGGG
TGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCG
CTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGTGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAG
TGAAAGCGAACCGAATCTGTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACTTGGT
TAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTGCATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCT
TAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTTCTCA
CGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCCGACAGCTG
GGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCG
GGCGATCC

***bla*_{TEM} :**

ATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAA
TGACTTGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT
AAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACTTACT
TCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTTGCACAACATGGGGG
ATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACG
ACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAA
CTGGCGAACTACTTACTCTA

İkinci izolatın sekans analiz sonuçları:

***fosA3*:**

CCTATCTCTCCTGTGGGGCGCTGTGGCTGTGCTTGTGCTGGATGAGCAGCGGGCGTAA
AACGCCCCCTCAGGAAAGCGACTATACCCACTACGCCTTCAGCGTGGCGGAAGAAG
AGTTTGCCGGGGTGGTGGCTCTGCTGGCGCAGGCGGGGGCTGAGGTATGGAAGAT
AACCAGAGTGAAGGGGCGTCTTACTATTTTCTCGACCCTGACGGCCATAAGCTGGAG
CTGCATGTGGGGAATCTGGCGCAGCGGCTGGCCGCCTGTCGGAACGCCCTACAAG
GGGATGGTCT

***bla*_{CTX-M} :**

GGAAGTGTCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAATT
AGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATT
CGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGA
TGGCCGCGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTAAATCAG
CGAGTTGAGATCAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACG
TCAATGGGACGATGTCAGTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATA
ACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGGCCGGCTAGCGTCACCGCGT
TCGCCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTAA
ACACCGCCATTCCGGGCGATCC

***bla*_{TEM} :**

CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGG
TATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTC
AGAATGACTTGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGA
CAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACT
TACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGG
GGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAA
ACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTA
TTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCT

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Elde edilen veriler, bilgisayar ortamında IBM SPSS Statistics v.24 paket programı kullanılarak değerlendirildi. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi ve Fisher's Exact testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p \leq 0.05$ kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. İZOLATLARIN KLİNİK VE DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ

Çalışmaya Ağustos 2022-Şubat 2023 tarihleri arasında Ankara Şehir Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na kültür için gönderilmiş idrar örneklerinden izole edilen ve fosfomisine dirençli bulunan 97 *E. coli* izolatı dahil edildi.

Çalışılan izolatların 68 (%70)'i kadın, 29 (%30)'u erkek hastalara aitti. İzolatların (%11,3)'i pediatrik hastalara, 48 (%49,5)'i 18-65 yaş arası erişkin hastalara ve 38 (%39,2)'i 65 yaş üzeri yaşlı hastalara aitti (Tablo 1). Hastaların yaş aralığı 1-95'ti ve hasta yaş ortalaması 53,2'ydi.

Çalışmaya alınan izolatların 73 (%75,3)'ü poliklinik hastalarına aitti. Örneklerin gönderildiği klinikler arasında ilk sırayı (19/73) üroloji polikliniği almaktaydı. İzolatların 24 (%24,7)'ünü yatan hastalardan gelen örnekler oluşturmaktaydı. Yatan hastalardan 18 (%75)'ini servis hastaları oluştururken, 6 (%25)'sini yoğun bakım ünitesi hastaları oluşturmaktaydı (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmadaki hastaların demografik özellikleri ve klinik başvuru yerleri dağılımı

Demografik özellikler ve klinik başvuru yeri		Sayı (n)/ (%)
Cinsiyet	Kadın	68/70,1
	Erkek	29/29,9
Yaş	Çocuk (<18)	11/11,3
	Genç (18-65)	48/49,5
	Yaşlı (>65)	38/39,2
Klinik başvuru yeri	Poliklinik	73/75,3
	Servis	18/18,5
	Yoğun Bakım Ünitesi	6/6,2

4.2. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI

Ağustos 2022-Şubat 2023 tarihleri arasında Ankara Şehir Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na kültür için gönderilmiş 117.667 idrar örneğinin 5.759'unda *E. coli* izole edildi ve otomatize sistem ve/veya disk diffüzyon yöntemiyle fosfomisin duyarlılığı araştırıldı. Fosfomisine dirençli saptanan 97 *E. coli* izolatının

72'si agar dilüsyon yöntemiyle fosfomisine dirençliydi. Fosfomisin için direnç oranı %1,25 olarak bulundu.

Doksan yedi fosfomisin dirençli izolat, Vitek 2 ve/veya disk difüzyon yöntemleriyle belirlendi. Fosfomisin dirençli doksan yedi *E.coli* izolatının 52'si otomatize sistemle dirençli tespit edilirken, disk difüzyon yöntemi ile 45'i dirençli saptandı.

Tüm izolatların fosfomisin direnci, referans yöntem olan agar dilüsyon ile de çalışıldı. Fosfomisin duyarlılığı çalışılan 97 izolatın 72 (%74,2)' si agar dilüsyon yöntemiyle fosfomisine dirençli bulundu.

Otomatize sistemle fosfomisin dirençli bulunan 52 *E.coli* izolatı eş zamanlı olarak disk difüzyon yöntemi ile de test edildi. Fosfomisin dirençli 52 izolatın 20'si disk difüzyon testi ile fosfomisine dirençli bulundu. Elli iki fosfomisin dirençli izolatın 39'u ise agar dilüsyon yöntemi ile fosfomisine dirençli olduğu tespit edildi (Tablo 2).

Disk difüzyon yöntemiyle fosfomisine dirençli bulunan 45 *E.coli* izolatının 33'ü agar dilüsyon yöntemiyle fosfomisine dirençli olarak saptandı.

Tablo 2. Otomatize sistemle fosfomisin dirençli bulunan 52 *E. coli* izolatlarının agar dilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle fosfomisin duyarlılığının karşılaştırılması

Agar dilüsyon	Disk Diffüzyon		Toplam
	Dirençli	Duyarlı	
Dirençli	19	20	39
Duyarlı	1	12	13
Toplam	20	32	52

Yetmiş iki fosfomisine dirençli *E. coli* izolatının antibiyotik duyarlılıkları otomatize sistem (VİTEK2, Biomerieux, Fransa) kullanılarak belirlendi. Antibiyotik duyarlılık sonuçları tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Fosfomisin dirençli 72 *E. coli* izolatının antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotikler	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	Orta Duyarlı n (%)
İmipenem	39 (100)	-	
Meropenem	72 (100)	-	
Ertapenem	71 (98,6)	1 (1,4)	
Nitrofurontain	68 (94,4)	4 (5,6)	
Amikasin	66 (91,6)	3 (4,2)	3 (4,2)
Gentamisin	51 (70,8)	21 (29,2)	
Piperasilin/Tazobaktam	55 (76,3)	17 (23,7)	
Sefoksitin	55 (76,3)	12 (16,6)	5 (7,1)
Amoksisilin/Klavulanat	45 (62,5)	27 (37,5)	
Seftriakson	39 (54,1)	33 (45,9)	
Seftazidim	39 (54,1)	29 (40,2)	4 (5,7)
TMP/SMZ	38 (52,7)	34 (47,3)	
Sefiksim	33 (45,8)	39 (54,2)	
Sefuroksim Aksetil	29 (40,2)	43 (59,8)	
Siprofloksasin	25 (34,7)	37 (51,4)	10 (13,9)
Sefepim	20 (60,6)	11 (33,3)	2 (6,1)
Ampisilin	13 (18,1)	59 (81,9)	
Sefuroksim	6 (8,3)	44 (61,1)	22 (30,5)

4.3. FOSFOMİSİN DİRENÇ GENLERİ VE BETA-LAKTAMAZ GENLERİ

Çalışmamızda fosfomisine dirençli 72 *E. coli* izolatında *fosA3*, *fosA*, *fosC2*, *fosX* ve *fosB* olmak üzere beş adet fosfomisin direnç geni araştırılmıştır. Çalışılan 72 izolatta *fosA*, *fosC2*, *fosX* ve *fosB* geni saptanmazken üç izolatta (%4,2) *fosA3* geni tespit edildi.

fosA3 geni saptanan üç izolatın antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 4' te gösterildi. Her üç izolat; ampisilin, sefuroksim, sefuroksim aksetil, seftriakson, TMP/SMZ, sefiksim antibiyotiklerine dirençliydi.

fosA3 saptanan iki izolat agar dilüsyon, otomatize sistem ve disk difüzyon yöntemiyle dirençli saptandı. Üçüncü izolat hem agar dilüsyon hem disk difüzyon yöntemiyle dirençli saptandı.

Tablo 4. *fosA3* geni saptanan izolatların antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotikler	<i>fosA3</i> geni saptanan örnekler		
	1. örnek	2. örnek	3. örnek
Ampisilin	Dirençli	Dirençli	Dirençli
Gentamisin	Dirençli	Dirençli	Duyarlı
Siprofloksasin	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
Sefuroksim	Dirençli	Dirençli	Dirençli
Piperasilin/Tazobaktam	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
Seftazidim	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
Amikasin	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
Sefoksitin	Duyarlı	Duyarlı	Orta duyarlı
Ertapenem	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
Sefuroksim Aksetil	Dirençli	Dirençli	Dirençli
Seftriakson	Dirençli	Dirençli	Dirençli
TMP/SMZ	Dirençli	Dirençli	Dirençli
Sefiksim	Dirençli	Dirençli	Dirençli
İmipenem	Duyarlı	Duyarlı	Veri yok
Meropenem	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
Nitrofurontain	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
Amoksisilin/ Klavulanat	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı
Sefepim	Veri yok	Veri yok	Dirençli

Yetmiş iki fosfomisin dirençli *E. coli* izolatının %40,2 (29/72) 'sinde *bla*_{CTX-M}, %91,6 (66/72)'sında *bla*_{TEM} ve %20,8 (15/72)'inde *bla*_{SHV} geni saptandı. Yirmi sekiz izolatta *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{EM}, on üç izolatta *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV}, dört izolatta *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{SHV} genleri beraber bulunurken, üç örnekte ise her üç gen beraber saptandı.

fosA3 geni saptanan üç izolatın ikisinde hem *bla*_{CTX-M} hem de *bla*_{TEM} genleri saptanırken diğer izolatta sadece *bla*_{TEM} geni saptandı. Üç izolatta *bla*_{SHV} geni tespit edilmedi (Tablo 7).

Tablo 5. *fosA3* geni saptanan izolatlarda beta-laktamaz genlerinin varlığı

<i>fosA3</i> + izolatlar	Beta- laktamaz genleri		
	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}
1.	+	+	-
2.	+	+	-
3.	-	+	-

GSBL pozitif/negatif izolatların antibiyotik duyarlılıklarının karşılaştırılmasında GSBL pozitif olanlarda negatif olanlara göre ampisilin, gentamisin, siprofloksasin, sefuroksim, seftazidim, sefuroksim aksetil, seftriakson ve sefiksim antibiyotiklerine direnç oranı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Diğer antibiyotiklerin direnç oranlarında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

CTX-M geni varlığı ile antibiyotik direnç oranları karşılaştırıldığında CTX-M geni negatif olanlarda pozitif olanlara göre ampisilin ve sefuroksime daha dirençliydi ve bu da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). CTX-M geni pozitif olanlarda negatif olanlara göre seftriakson ve sefiksim antibiyotiklerinde direnç oranları istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Diğer antibiyotiklerin direnç oranlarında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$).

TEM geni varlığı ile antibiyotik direnç oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$).

SHV geni varlığı ile antibiyotik direnç oranları karşılaştırıldığında yalnızca amoksisilin/klavulanat antibiyotiği açısından anlamlı fark bulundu. SHV geni negatif olanlarda pozitif olanlara göre amoksisilin/klavulanat direnç oranı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

5. TARTIŞMA

Üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE), tüm yaş gruplarında en sık görülen enfeksiyonlar arasındadır ve yaşlı bireylerde hastaneye yatışların en yaygın nedenlerinden biridir (115). Çocukluk yaş döneminde yaşamın ilk 7 yılında erkeklerin yaklaşık %2'sini ve kızların %8'ini etkilemektedir (116). ÜSE'ler kadınlarda erkeklerden daha fazla görülür ve tüm ÜSE'lerin yaklaşık %81'i kadınlarda rapor edilmiştir (117). Yaptığımız çalışmada da hastaların büyük çoğunluğunu kadın hastalar oluşturmaktadır. İzolatların 68 (%70)'i kadın hastalara aitti. Çalışmamıza dahil ettiğimiz 97 izolatın 11 (%11,3)' i çocuk hastalara, 48 (%49,5)' i genç erişkin hastalara ve 38 (%39,2)' i yaşlı hastalara aitti.

Kadın cinsiyet ÜSE gelişimi açısından önemli bir risk faktörüdür. Ayrıca daha önce ÜSE geçirmiş olmak, diyabet, obezite, travma, kalıcı kateter, anatomik anormallikler, vajinal enfeksiyon, cinsel aktivite gibi çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır. Tüm bu risk faktörleri konağın potansiyel üropatojenlere maruziyetini arttırarak ve kolonizasyona neden olarak hastalık gelişimine yol açmaktadır (5). Bu sebeple çok çeşitli hasta gruplarında ÜSE gelişimini görebilmekteyiz. Çalışmamızda çok farklı klinik bölümlerden (çocuk/erişkin üroloji, iç hastalıkları, evde sağlık, jinekoloji, çocuk/erişkin nefroloji, endokrin, enfeksiyon hastalıkları, nöroloji, onkoloji vb.) hastalar yer almaktadır.

Örneklerin gönderildiği kliniklerin 73 (%75,3)'ünü poliklinik 18 (%18,5)'ini servis ve 6 (%6,2)'sini yoğun bakım üniteleri oluşturmaktaydı ve poliklinikler arasında üroloji polikliniği (19/73) ilk sıradaydı.

ÜSE'de en sık görülen patojen *E. coli* 'dir. *E. coli* tüm yaş gruplarında üriner sistem enfeksiyonlarının çoğuna neden olur ve yaştan bağımsız olarak ayaktan tedavi gören hastaların %74,4 'ü, hastane kaynaklı enfeksiyonların %65'i ve sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonların %47'si *E. coli* ile ilişkilidir (118). Ülkemizde yapılan birçok çalışmada üriner sistem enfeksiyon etkeni olarak sıklıkla *E. coli* karşımıza çıkmaktadır (119-122). Çalışmamıza ÜSE etkeni olarak kabul edilen ve idrar örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatları dahil edilmiştir. Komplike olmayan ÜSE etkeni UPEC'i yaygınlık açısından *K. pneumoniae*, *S. saprophyticus*, *E. faecalis*, grup B

Streptococcus (GBS), *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *Candida spp.* takip etmektedir (5,28,123).

ÜSE'ler birinci basamakta en sık antibiyotik reçete edilen enfeksiyonlardan biridir (1). Hem alt hem üst üriner sistem enfeksiyonlarının çok sık görülmesi, tekrarlayan ÜSE atakları ve dünya çapında artan antibiyotik direnci, bu enfeksiyonların uygun tanısını ve etkili tedavisini oldukça zorlaştırmaktadır (124). Üriner sistem enfeksiyonu tanısında altın standart yöntem kültürdür (125). Kültür ve antibiyogram işlemlerinin sonucunun birkaç günü bulması, klinisyeni ampirik tedaviye yönlendirmektedir. Ampirik tedavide kullanılacak antibiyotığın doğru seçilebilmesi için direnç oranlarının bilinmesi önem arz etmektedir.

Fosfomisin direnç prevalansı ülkeler arasında ve ülkelerdeki bakteri türleri arasında değişiklik göstermekle beraber tüm ülkeler fosfomisin direncine ilişkin veri bildirmemişlerdir ve belirli ülkeler için sınırlı veriler mevcuttur. Mevcut veriler, uzun yıllar kullanılmasına rağmen tüm Avrupa ülkeleri için düşük fosfomisin direnci oranları olduğunu göstermiştir (126). Pullukçu ve ark.'nın (127) yaptığı bir çalışmada ülkemizdeki fosfomisin çalışmalarının analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalara dahil edilen 6439 *E. coli* izolatında fosfomisin direnci %1,9 olarak saptanmıştır. Bu direnç oranı GSBL üretmeyen suşlarda %0,5 iken GSBL üreten suşlarda %5 olarak bulunmuştur. Ankara Bilkent Şehir Hastanesi'nde 1 Ocak 2021- 31 Aralık 2021 tarihleri arasında idrar kültürlerinden izole edilen 11500 *E. coli* suşunun otomatize sistemle belirlenen antibiyogram sonuçlarına göre fosfomisin direnci %6,72 olarak bulunmuştur (128). Ülkemizde Avcıoğlu ve ark.'nın (129) yaptığı retrospektif bir çalışmada idrar örneklerinden izole edilen 1.466 *E. coli* izolatının otomatize sistem (Vitek 2) belirlenen antibiyotik duyarlılık sonuçları incelenmiştir. Çalışmada fosfomisine direnç %4 olarak bulunmuştur. Karamanlıoğlu ve ark.'nın (130) 2019 yılında yaptığı retrospektif bir çalışmada idrar kültürlerinde üreyen *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları incelenmiştir. Ayaktan başvuran hastalara ait 3.213 idrar örneğinden *E. coli* izole edilmiş ve bu izolatların fosfomisin direnci %0,5 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda Ağustos 2022-Şubat 2023 tarihleri arasında Ankara Şehir Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na kültür için gönderilmiş 117.667 idrar örneğinin 5.759'unda *E. coli* izole edildi. Otomatize sistem ve/veya disk difüzyon yöntemiyle fosfomisine dirençli saptanan 97 *E. coli* izolatının 72'si agar dilüsyon

yöntemiyle fosfomisine dirençli saptandı. Fosfomisin için direnç oranı %1,25 (72/5.759) olarak bulundu.

ÇİD *Enterobacteriaceae*'nin neden olduğu enfeksiyonlar, sağlık sistemleri üzerinde büyük bir yük oluşturmaya devam etmektedir. Özellikle ampirik tedavilere olan direncin artması veya birinci basamak tedavilerde artan başarısızlık ve GSBL üreten veya karbapenem dirençli *E. coli*'nin artan prevalansı göz önüne alındığında, klinisyenlerin daha etkili alternatif tedavilere yöneleceği aşikardır. Fosfomisin bu konuda önemli bir antimikrobiyal ajan olarak yerini korumaktadır (131).

Fosfomisin, peptidoglikan sentezinin ilk aşamasında görev alan MurA enzimine kovalent bağlanarak bu aşamayı geri dönüşümsüz olarak bloke edip bakteriyel ölüme sebep olmaktadır. Oldukça geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ajan olan fosfomisin hem gram pozitif hem gram negatif bakterilere karşı etki göstermektedir (74,76,77). Klinik uygulamada hemen hemen her dokuda mükemmel dağılımı, yan etkisinin az olması ve vücuttan kolaylıkla atılımı önemli özelliklerindendir (132). Fosfomisinin ÜSE tedavisindeki avantajları olarak; tek doz (3 gr) oral formu ile kullanımı nedeniyle hasta uyumunun iyi olması, idrarda yüksek konsantrasyona ulaşması, gebelerde ve çocuklarda güvenle kullanılabilmesi ve düşük direnç oranları sayılabilir (133). Fosfomisinin klinik kullanımı arttıkça, bu antimikrobiyal ajanın başta *E. coli* olmak üzere diğer patojenler için in vitro duyarlılık testlerine olan ihtiyacın giderek artacağı düşünülmektedir.

Klinik uygulamada fosfomisin kullanımındaki ana kısıtlamalardan biri, bu antibiyotik direncinin saptanması için ucuz, kolay ve hızlı bir yöntemin olmamasıdır. CLSI üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen *E. coli* izolatlarında fosfomisin direncini test etmek için 25 mg/L G-6-P ile desteklenmiş agar dilüsyon testi ve fosfomisin (200 µg fosfomisin /50 µg G-6-P) diskleri kullanarak yapılan disk difüzyon testi için sınır değerler belirlemiştir. MİK belirlemek için yalnızca agar dilüsyon metodu önerilmiş olup broth dilüsyon önerilmemiştir (108) EUCAST, fosfomisin için referans yöntem olarak agar dilüsyon yöntemini önermektedir. Fosfomisin (200 µg fosfomisin /50 µg G-6-P) disk difüzyon testini sadece *E.coli* için önerirken diğer *Enterobacterales* türleri için MİK yöntemi kullanılması gerektiği belirtilmektedir. EUCAST, CLSI 'ya göre daha düşük sınır değerler önermektedir (109).

Fosfomisin duyarlılık testlerinden referans yöntem olan agar dilüsyon yöntemi uygulaması zor ve uzun süre gerektiren maliyetli bir testtir. Bu testin dezavantajları göz önünde bulundurulduğunda klinik laboratuvarların daha ucuz, kolay ve hızlı alternatif testlere yönelmesi kaçınılmazdır. Bu konuda çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Van den Bijllaardt ve ark.'nın (134) Hollanda 'da 2018 yılında yaptığı ve toplamda 775 *E. coli* ve 201 *K. pneumoniae* izolatının dahil edildiği çok merkezli bir çalışmada fosfomisin duyarlılığının belirlenmesi için çeşitli testler (Etest, MİK test strip, Vitek2, Phoenix ve disk difüzyon) kullanılmış ve referans yöntem olan agar dilüsyon ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada dirençli *E. coli* izolatlarında, gradient testi için %23,3, MİK test strip için %18,5, Vitek2 için %18,8, Phoenix için %12,5 ve disk difüzyon için %12,9 gibi çok yüksek hata oranları bulunmuş. Genel olarak, test yöntemlerinden hiçbirinin rutin laboratuvarda agar dilüsyonuna alternatif olarak uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

Karlowsky ve ark.'nın (131) 2020 yılında Kanada'da yaptığı bir çalışmada ise *E. coli* izolatlarının fosfomisin duyarlılığını araştırmak için disk difüzyon, agar dilüsyon, gradient test ve VİTEK2 yöntemleri kullanılmıştır. Toplamda 554 (162 'si idrar örnekleri) *E. coli* izolatı çalışmaya dahil edilmiş. Test sonuçları EUCAST sınır değerleri baz alınarak değerlendirildiğinde disk difüzyon ve gradient test için %99' luk kategorik uyum gözlenirken, disk difüzyon için %44,4, gradient test için %33,3 gibi çok büyük hata oranları saptanmış. Vitek 2 MİK değerleri agar dilüsyon sonuçlarına göre daha düşük bulunmuş ve 9 izolattan 5'inde çok büyük hataya rastlanmıştır. Çalışmamızda fosfomisin direnci saptanması için üç farklı yöntem kullanıldı (agar dilüsyon, Vitek 2 ve disk difüzyon). Otomatize sistemle ve/veya disk difüzyon yöntemiyle fosfomisine dirençli bulunan 97 *E. coli* izolatının 72'si agar dilüsyon yöntemiyle dirençli saptandı. Disk difüzyon ve otomatize sistemlerin fosfomisine duyarlı izolatları gözden kaçırabildiği görüldü.

Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda ise yöntemlerin daha uyumlu sonuç verdiği gözlenmektedir. Öcal ve ark.'nın (133) *E. coli* izolatlarında fosfomisin duyarlılıklarının saptanmasında agar dilüsyon, disk difüzyon yöntemi, fosfomisin diskleri ile tüpte makrodilüsyon yöntemi ve hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testleri karşılaştırılmıştır. Disk difüzyon, agar dilüsyon ile karşılaştırıldığında %100 duyarlılık ve %97,6 özgüllük bulunmuş ve 4/175 izolatta büyük hata saptanmıştır. Aktaş ve

ark.'nın (135) yaptığı bir çalışmada da yine fosfomisin zon çapları ile gradient test MİK leri arasında zayıf korelasyon tespit etmişlerdir. Yine benzer şekilde Soydan ve ark.'nın (120) yaptığı çalışmada da disk difüzyon ve agar dilüsyon testlerinin kategorik uyumu yüksek bulunmuş ve düşük oranda büyük hata saptanmıştır. İrvem ve ark.'nın (136) yaptığı çalışmada Vitek 2 ile dirençli bulunan tüm izolatlar disk difüzyon ile de dirençli bulunmuştur.

Çalışmamızda fosfomisine dirençli saptanan izolatların dahil edilip, fosfomisine duyarlı bulunan izolatların elenmesi nedeniyle elde ettiğimiz verilerin, ülkemizde yapılan birçok çalışma verisiyle uyumsuz olduğu görüldü. Test yöntemlerinin karşılaştırılmasında daha verimli sonuçların elde edilebilmesi için fosfomisin dirençli ve fosfomisin duyarlı izolatların çalışılması şarttır.

Fosfomisinin etki mekanizması ve yapısı benzersizdir, bu da çapraz direnci nadir hale getirmektedir. Fosfomisin direncine neden olan çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır. Fosfomisinin hücre içine alınmasında görevli taşıma sistemindeki mutasyonlar, antibiyotiğin hedef bölgesi olan MurA'daki modifikasyonlar ve fosfomisin modifiye edici enzimlerle antibiyotiğin inaktivasyonu gibi mekanizmalar fosfomisinde kazanılmış dirence neden olmaktadır (74,76).

Fosfomisin direncinin kazanılmasındaki ana mekanizmalardan biri fosfonat taşınması veya alımı sırasında gelişen inaktivasyondur. *E. coli*'de iki ana taşıma sistemi, gliserol-3-fosfat taşıyıcı (GlpT) ve glukoz-6-fosfatransporter (UhpT), fosfomisin alımından sorumludur (137). GlpT ve UhpT membran taşıyıcılarını kodlayan genlerdeki kromozomal mutasyonları takiben fosfomisine karşı direnç gelişmektedir. Bu mutasyonlar sıklıkla eski çalışmalarda en yaygın direnç mekanizmaları olarak karşımıza çıkmaktadır (94).

glpT ve *uhpT* genlerinin ekspresyonu sırasında cAMP varlığı gerekmektedir. *ptsI* veya *cyaA* genlerindeki mutasyonlar hücre içi cAMP seviyelerinin azalmasına yol açarak bakteriler tarafından fosfomisinin alınımını azaltmaktadır (138). Ayrıca *uhpA* geni, *uhpT* promotörünün transkripsiyonel aktivasyonu için gerekli olan bir yanıt düzenleyici proteini kodlar. Dolayısıyla *uhpA* genindeki modifikasyonlar *uhpT*'nin daha düşük ekspresyonuyla sonuçlanmaktadır. Bu yolların her bir düzenleyici genindeki mutasyonlar antibiyotik alımını azaltarak farklı seviyelerde fosfomisin direnci sağlamaktadır (139).

Yapılan birçok çalışma ile *glpT* mutasyonu sonucu fosfomisine azalmış geçirgenlik ve artmış fosfomisin MİK değerleri raporlanmıştır (140-143). *uhpT* genindeki mutasyonlar yine *glpT* genindeki mutasyonlara benzer şekilde fosfomisin geçirgenliğini azaltarak fosfomisin direncine sebep olmaktadır. Yapılan birçok çalışmayla yüksek fosfomisin MİK değerleri bu mutasyonlarla ilişkili bulunmuştur (88,140,141,144,145).

glpT ve *uhpT* genlerindeki mutasyonların aksine *cyaA* genindeki mutasyonların araştırılması ve bunun fosfomisin MİK'leri üzerindeki etkisi, *E. coli* suşlarında yürütülen sadece birkaç çalışma ile incelenmiş olup ancak hala netlik kazanamamıştır (146).

Fosfomisin direnç mekanizmalarından bir diğeri antibiyotiğin hedef bölgesi olan MurA proteinindeki modifikasyonlardır. Kim ve ark. (90) 1996 yılında in vitro olarak yaptıkları bir çalışmada MurA'nın 115. pozisyonundaki sistenin aspartat ile yer değiştirmesi sonucu *E. coli*'de fosfomisin direncinin geliştiğini göstermişlerdir. Japonya'da 2010 yılında yapılan bir çalışma ile ilk defa bir klinik izolatta MurA'daki farklı iki mutasyon (Asp369Asn ve Leu370Ile) sonucu gelişen fosfomisin direnci rapor edilmiştir (89). Daha sonra Çin, Tayvan ve Güney Kore'de klinik *E. coli* izolatlarında fosfomisin direncine sebep olan MurA mutasyonları tespit edilmiştir (68,140,145). Lu ve ark. (142) Tayvan'da yaptıkları bir çalışmada GSBL üreten *K. pneumoniae* klinik izolatlarında yüksek fosfomisin MİK değerleri ile ilişkili MurA mutasyonları tespit etmişlerdir. Bununla birlikte MurA'daki mutasyonlar klinik izolatlarda daha nadir olarak görülmektedir (14).

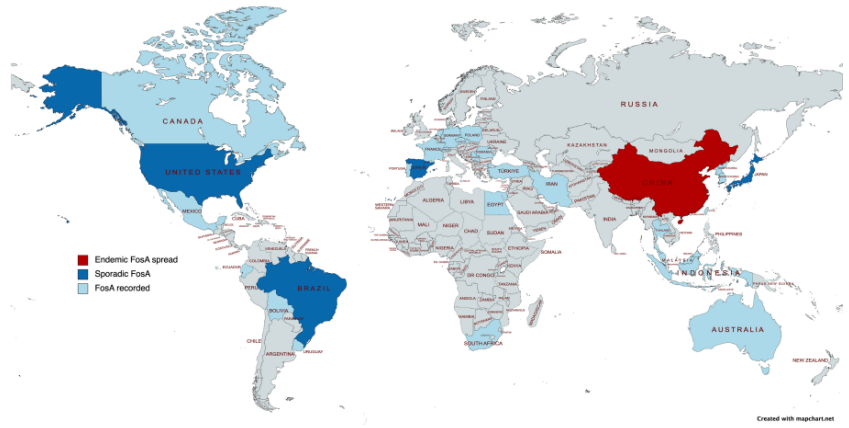
Fosfomisin direncine sebep olan çeşitli kromozomal gen mutasyonlarının (*glpT*, *uhpT*, *uhpA*, *ptsI*, *cyaA* ve MurA) klinik izolatlarda daha nadir olarak görülmeleri ve nokta mutasyonları şeklinde açığa çıkmaları nedeniyle bu araştırmaya dahil edilmemişlerdir. Çalışmamızda bu genler yerine plazmidlerle taşınabilmesi nedeniyle başka direnç genleriyle birlikte (*bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* vb.) çeşitli bakteriler arasında aktarılabilen ve bu yüzden de epidemiyolojik olarak büyük öneme sahip olan fosfomisin modifiye edici enzim genlerindeki mutasyonların araştırılması tercih edilmiştir. Bu enzimler fosfomisine kovalent olarak bağlanıp fosfomisin inaktivasyonuna neden olmaktadır. Fosfomisin modifiye edici enzimler; FosA,

FosB ve FosX olmak üzere 3 metalloenzim ve FomA ve FomB olmak üzere 2 kinaz grubu enzimden oluşmaktadır (77).

Fosfomisine direnç kazandıran glioksalaz süper ailesine ait *fosB* 'nin amino asit dizisi *fosA* ile %38 benzerlik göstermesine rağmen Mg^{+2} bağımlı bir enzim olması ve fizyolojik tiol donörü olarak l-sisteini kullanması bakımından *fosA*'dan farklıdır (104). Mevcut veriler, *fosB* geninin ağırlıklı olarak gram-pozitif bakterilerde ifade edildiğini; ya plazmid (*Staphylococcus spp.* ve *Enterococcus spp.*'de) ya da kromozomal olarak kodlanmış (*Bacillus subtilis*'te) olduğunu göstermektedir (104-106). Bu gen, vankomisine dirençli *Enterokok*'larda *vanA* geni ile birlikte konjugatif plazmidlerin aynı transpozonunda bulunmuştur (105). Daha eski bir çalışmada ise fosfomisine dirençli *S. aureus* izolatlarının %46'sında *fosB* tanımlanmıştır (106). Çin'de 2016 yılında yapılan bir çalışmada kan ve BOS klinik örneklerinden izole edilen fosfomisin dirençli 67 metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) çalışılmış ve 9 (%13) izolatta *fosB* geni saptanmıştır (147). Yaptığımız bu çalışmada ise izolatların hiçbirinde *fosB* geni saptanamamıştır. *fosB* geninin daha çok gram pozitif bakterilerde bulunması nedeniyle bizim çalışmamızda saptanamamış olabilir.

fosX, Mn^{+2} bağımlı bir fosfomisine özgü epoksit hidrolazdır ve *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum* ve *Brucella melitensis*'te bulunmuştur. *fosX* geni hem gram pozitif hem gram negatif bakterilerde bulunabilmektedir (77). Çin'de 2022 yılında yapılan çok merkezli bir çalışmada *E. faecium* klinik izolatlarında *fosX* geni varlığı araştırılmıştır. Fosfomisin dirençli 153 *E. faecium* klinik izolatin büyük çoğunluğunda (%66) *fosX* geni saptanmıştır (148). Yine 2022 yılında İran'da yapılan bir çalışmada ise üriner sistem örneklerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* klinik izolatlarında çeşitli *fos* direnç genleri araştırılmıştır. Çalışmada *fosB* ve *fosC* genleri saptanmazken, fosfomisin dirençli 15 izolatin 3'ünde (2'si *E. coli*) *fosX* geni saptanmıştır (149). İran'da 2021 yılında yapılmış bir çalışmada ise 16 fosfomisin dirençli *K. pneumoniae* klinik izolatin 6'sında *fosX* geni saptanmıştır (150).

Fosfomisin inaktivasyonu mekanizması ilk olarak, *fosA* tarafından kodlanan glutatyon S-transferaz adlı bir metaloenzim ile açığa kavuşturulmuştur (91). Günümüzde, GenBank Veri Tabanında 11 farklı ve genetik olarak ilişkili *fosA* varyantı depolanmıştır ve bunlardan 10 tanesinin küresel yayılım gösterdiği rapor edilmiştir (şekil 6) (146).



Şekil 6 : *Enterobacteriales* türleri arasında FosA'nın epidemiyolojik haritası.

Ito ve ark.'nın (151) 2017 yılında yaptıkları sistematik bir araştırmada 18 farklı gram negatif bakteri türünün genom sekanslarını içeren 18 binden fazla çalışma incelenmiştir. Analiz edilen genomlardaki yüksek *fosA* prevalansına (>%80) dayanarak *P. stuartii*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P.s aeruginosa*, *E. aerogenes*, *K. oxytoca*, *M. morganii*, *P. rettgeri* ve *E. cloacae* genomlarında *fosA*'nın kromozomal yerleşim gösterdiği görülmüştür. Buna karşılık, *fosA*, *E. coli*, *C. freundii* ve *A. baumannii*'de nadiren (<%5) saptanmıştır. Yaptığımız bu çalışmada incelediğimiz hiçbir *E. coli* izolatında *fosA* geni saptanamamıştır. Bu genin *E. coli* izolatlarında daha nadir olarak bulunması bu sonucu almamıza neden olmuş olabilir. Daha yüksek sayılarda izolatın çalışmaya dahil edilmesi veya daha farklı bakteri türlerinin incelenmesiyle *fosA* geni saptama olasılığı yükseltilebilir.

İlk plazmit aracılı *fosA* geni *fosA1*, İspanya'daki bir klinik örnekten izole edilmiş *S. marcescens*'te tanımlanmıştır (152). *fosA1*, *E. cloacae*'nin kromozomunda bulunan fosfomisin modifiye edici enzim ile %100'e kadar benzerlik göstermektedir dolayısıyla *fosA1*'in muhtemel kaynağı olarak tahmin edilmektedir (151).

İlk plazmit aracılı *fosA* geni olan *fosA1*'in keşfinden günümüze kadar *fosA* ailesine ait kadar çok çeşitli gen varyantları tanımlanmıştır. Örneğin *fosA2* varyantı ilk olarak 2011 yılında Kanada'daki bir su örneğinden alınan *E. cloacae* kromozomunda rapor edilmiştir (98). Bunun dışında *fosA3*, *fosA4*, *fosA5*, *fosA6*, *fosA7*, *fosA8*, *fosA9*, *fosA10*, *fosL1*, *fosL2*, *fosC2* gibi genler de saptanmıştır (146). *fosA1* ve *fosA2* için *E. cloacae*; *fosA3* ve *fosA4* için *Kluyvera georgiana*; *fosA5*, *fosA6* ve *fosA10* için *K. pneumoniae*; *fosA8* için *Leclercia adecarboxylata* ve *fosA9* için *Klebsiella variicola*

dahil olmak üzere çeşitli gram-negatif bakterilerin bu fosfomisin direnç genleri için doğal rezervuar olduğu gösterilmiştir (153). Buna karşılık, daha yakın zamanda bildirilen *fosL1*, *fosL2* ve *fosC2* gibi fos direnç genlerinin doğal rezervuarları henüz bilinmemektedir (154).

fosC2 ilk kez 2010 yılında Japonya’da klinik bir izolat olan *E. coli*’de tanımlanmıştır (72). Daha sonra Wang ve ark. (155) 2015 yılında karbapenemaz üreten bir *E. cloacae* suşunda plazmid yoluyla yayılan ikinci bir klinik *fosC2* vakası bildirmişlerdir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise *Aliidiomarina shirensis*’in plazmit aracılı *fosC2* için olası bir kaynak olabileceği öne sürülmüştür (156). Çalışmamızda klinik isolatların hiçbirinde *fosC2* saptanamamıştır.

fosA3 ilk olarak Japonya’da 2010 yılında rapor edilmiştir (72). Daha sonra Çin’de yapılan çalışmalarla plazmid aracılı yayıldığı gösterilmiştir (70,103). Şu anda Çin, plazmid aracılı *fosA3*’ün hem klinikte hem de veterinerlikte en yaygın olarak gözlemlendiği ülkedir (146). Aynı zamanda *fosA3*, dünya çapında en sık bulunan fosfomisin modifiye edici enzimdir (157).

Çalışmamızda fosfomisin dirençli 72 *E. coli* izolatının üçünde (%4,2) *fosA3* geni saptanmıştır. Avrupa’ da yapılan çalışmalarda çeşitli *fosA3* saptama oranları (%2,3-42,8) bulunmuştur (17,158-162). Muller ve ark.’nın (17) 2019 yılında İsviçre’de yaptığı bir çalışmada GSBL üreten ve fosfomisine dirençli olan 17 *E. coli* izolatının 4’ünde (%23,5) *fosA3* saptanmıştır. Mendes ve ark.’nın (159) 2016 yılında Portekiz’de yaptığı bir çalışmada ise 3. kuşak sefalosporinlere dirençli 461 *Enterobacteriaceae* izolatının 43’ü (21 *E. coli*-21 *K. pneumoniae*-1 *M. morganii*) fosfomisine dirençli olarak saptanmış ve 1 izolatta (%2,3) *fosA3* bulunmuştur. Uzak doğu ülkelerinde yapılan çalışmalarda ise *fosA3* saptama oranları %8-100 arasında değişmekle beraber oldukça yüksek bulunmuştur (70,72,103,163,164).

Ülkemizde Nigiz ve ark.’nın (165) yaptığı çalışmada üriner sistem örneklerinden izole edilen gram negatif bakterilerde çeşitli fos genleri (*fosA*, *fosA3*, *fosC2*) ve *bla_{CTX-M}* geni varlığı araştırılmıştır. 16 fosfomisin dirençli izolattan birinde (*K. pneumoniae*) *fosA3* geni (%6,25) saptanmıştır. Bu izolatın aynı zamanda *bla_{CTX-M}* genini taşıdığı bulunmuştur. Çalışmada *fosA* ve *fosC2* geni saptanamamıştır. Ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada ise yine üriner sistem örneklerinden izole edilen *E.coli* isolatlarında fosfomisin ve karbapenem direnç

genleri varlığı araştırılmıştır. Fosfomisin dirençli 8 izolatın dördünde *fosA3* (%50) tespit edilirken, *fosC2* hiçbir izolatta saptanamamıştır. *fosA3* tespit edilen bir örneğin aynı zamanda *bla_{NDM}* yönünden pozitif olduğu belirtilmiştir (166). Çalışmamızda *fosA3* saptama oranımız %4,2 olarak bulunmuş olup bazı Avrupa ülkelerinin verileriyle (%1-5) benzerlik göstermektedir (159-161).

fosA3 geninin yayılması, GSBL geni *bla_{CTX-M}* ile yakından ilişkilidir. Geçtiğimiz birkaç on yılda TEM ve SHV tiplerinin en yaygın β -laktamaz gen tipleri olduğu bildirilmişse de günümüzde CTX-M grubu β -laktamaz enzimleri artık hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde olmak üzere dünya çapında açık ara en yaygın olan GSBL varyantıdır (167). Fransa (168), İspanya (169), Romanya (170) gibi Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalarda GSBL üreten suşlarda baskın olarak *bla_{CTX-M}* varlığı görülmekle beraber Portekiz (171) gibi bazı ülkelerde *bla_{TEM}* daha sıklıkla görülebilmektedir. Uzak doğu ülkelerine baktığımızda Çin (172), Tayland (173), Japonya (174), Sri Lanka (175) gibi ülkelerde *bla_{CTX-M}* yaygın olarak saptanırken Hindistan'da yapılan birçok çalışmada *bla_{TEM}* daha sık bulunmakla beraber *bla_{CTX-M}* prevelansı giderek artmış ve bazı bölgelerde baskın hale gelmiştir (176-178). Ülkemizde yapılan birçok çalışmaya baktığımızda yine baskın olarak *bla_{CTX-M}* varlığı olduğu görülmektedir (179-186). Çalışmamızda fosfomisine dirençli 72 *E. coli* izolatında baskın olarak (%91,6) *bla_{TEM}* saptanmıştır. Sıklık sırası olarak *bla_{TEM}* 'i sırasıyla *bla_{CTX-M}* (%40,2) ve *bla_{SHV}* (%20,8) izlemektedir. Çalışmamızdaki veriler ülkemizdeki verilerle farklılık göstermektedir. Çalışmamızda fosfomisine dirençli izolatların seçilmesi bu farklılığa neden olmuş olabilir.

Avrupa'da yapılan çeşitli çalışmalarla *E. coli* izolatlarında *bla_{CTX-M-15}* ve *bla_{CTX-M-55}* gibi GSBL genleri, *fosA3* ile birlikte saptanmıştır (158-161). Uzak Doğu ülkelerinde yapılan benzer çalışmalarla da *fosA3* ve *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* grubu genlerin aynı plazmid üzerinde taşınarak yayıldığı saptanmıştır (67,68,70,72,163,164,). Avrupa ve Uzak Doğu ülkelerinde yapılan çalışmalarla benzer şekilde çalışmamızda *fosA3* geni saptanan üç izolatın ikisinde hem *bla_{CTX-M}* hem de *bla_{TEM}* genleri saptanırken diğer örnekte sadece *bla_{TEM}* geni bulundu. *fosA3*, *bla_{CTX-M}* ve *bla_{TEM}* genlerinin birlikte saptanması, bu genlerin aynı plazmid üzerinde taşınmış olabileceklerini düşündürmektedir. Bu konuda ülkemizdeki veriler yetersiz olduğu için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

fosA3 geni bulunduran üç izolatın antibiyotik duyarlılık test sonuçları incelendiğinde her üç izolat, ampisilin, sefuroksim, sefuroksim aksetil, seftriakson, TMP/SMZ ve sefiksim'e dirençliydi. Her üç izolatın duyarlı olduğu antibiyotikler ise piperasilin/tazobaktam, amikasin, ertapenem, meropenem ve nitrofurantindir. Avrupa'da yapılan bir çalışmada üriner sistem örneğinden izole edilen ve *fosA3* saptanan bir örneğin sefotaksim, sefepim, siprofloksasin, gentamisin ve trimetoprim'e dirençliyken sefoksitin, karbapenem ve amoksisilin/klavunik asit'e duyarlı olduğu bulunmuştur (159). Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise *fosA3* pozitif *E. coli* O25b-ST131 izolatının karbapenem, nitrofurantoin, TMP/SMZ ve gentamisine duyarlıyken, sefalosporinlere, piperasilin/tazobaktam, siprofloksasin ve amoksisilin/klavulanat'a dirençli olarak bulunmuştur (166).

Antimikrobiyal direnç, çok çeşitli bakteriyel enfeksiyonların önlenmesini ve tedavisini etkileyen, 21. yüzyıldaki en büyük küresel halk sağlığı tehditlerinden biridir (187). 2020 yılında yayınlanan DSÖ raporuna göre, şu anda 43 antibiyotik ve kombinasyon klinik geliştirme aşamasındadır ve 2017'den bu yana 11 yeni antimikrobiyal ilaç klinik kullanım için onaylanmıştır. Bununla birlikte, DSÖ, 43 antibiyotiğin hiçbirinin klinik olarak en sorunlu bakterilerde (örn. *E. coli*, *K.pneumoniae*) bu direnç sorununu yeterince çözemediğini belirtmektedir. Bu yüzden bazı ÇİD patojenlere karşı etkinliğini koruyan eski antibiyotikler yeniden piyasaya sürülmüştür (188). Fosfomisin de bu antibiyotiklerden biridir

Sonuç olarak çalışmamızda idrar örneklerinden izole edilen 72 fosfomisin dirençli *E. coli* izolatının 3 (%4,2)'ünde *fosA3* geni saptanmış olup *fosA*, *fosC2*, *fosX* ve *fosB* geni saptanamamıştır. Fosfomisin direncine sebep olan çeşitli kromozomal gen mutasyonlarının (GlpT, UhpT, uhpA, ptsI, cyaA ve MurA) ve diğer *fosA* varyantı direnç genlerinin çalışmamıza dahil edilmemesi nedeniyle düşük sayıda fosfomisin direnç geni saptamış olabileceğimiz için bu konuda daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÇİD etkenlere bağlı gelişen enfeksiyonlarda, özellikle GSBL üreten suşlarda fosfomisin kullanılması yeniden gündeme gelmiştir. Plazmid aracılı *fos* direnç genlerinin beta-laktamaz genleriyle aynı plazmid üzerinde taşındığı çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu birlikteliğin ilerde fosfomisin direncinin yayılmasında önemli bir rol oynayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Yaptığımız bu çalışmada da *fosA3*,

*bla*_{CTX-M} ve *bla*_{TEM} genlerinin beraber saptanması, bu genlerin aynı plazmid üzerinde taşınmış olabileceğini göstermektedir. GSBL üreten suşlarda fosfomisin direnç mekanizmalarının bilinmesi tedavinin yönlendirilmesinde ve direncin takibinde önemli olacaktır. Ülkemizdeki baskın fosfomisin direnç profillerinin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



6. SONUÇLAR

- 1- Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na kültür için gönderilmiş idrar örneklerinden izole edilen ve fosfomisine dirençli bulunan 97 *E. coli* izolatının çoğunluğu kadın hastalardan gelen örneklerle aitti. Bu izolatların en sık polikliniklerden gönderilen örneklerden izole edildiği belirlenmiştir. Poliklinikler arasında da en sık üroloji polikliniği yer almaktaydı.
- 2- Ağustos 2022-Şubat 2023 tarihleri arasında Ankara Şehir Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na kültür için gönderilmiş 117.667 idrar örneğinin 5.759'unda *E. coli* izole edildi. Otomatize sistem ve/veya disk diffüzyon yöntemiyle fosfomisine dirençli saptanan 97 *E. coli* izolatının 72'si agar dilüsyon yöntemiyle fosfomisine dirençliydi. Fosfomisin için direnç oranı %1,25 olarak bulundu.
- 3- Agar dilüsyon yöntemiyle fosfomisine dirençli bulunan 72 *E. coli* izolatı, imipenem, meropenem, ertapenem, nitrofurantoin ve amikasin antibiyotiklerine yüksek oranda duyarlı saptanmıştır. İzolatların, sefuroksim, ampisilin, siprofloksasin, sefuroksim aksetil, sefiksim ve TMP/SMZ antibiyotiklerine karşı yüksek direnç oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir.
- 4- Çalışmamızda fosfomisin dirençli izolatların 52'si otomatize sistemle, 45'i disk diffüzyon yöntemiyle saptanmıştır. Otomatize sistemle fosfomisine dirençli bulunan 52 izolatın 39'u agar dilüsyon yöntemiyle fosfomisine dirençliydi. Elli iki izolatın 20'si disk diffüzyon yöntemiyle fosfomisine dirençli bulundu.
- 5- Agar dilüsyon yöntemiyle fosfomisine dirençli bulunan 72 izolatın %91,6 (66/72)'sında *bla*_{TEM}, %40,2 (29/72) 'sinde *bla*_{CTX-M}, %20,8 (15/72)'inde *bla*_{SHV} saptandı.
- 6- GSBL pozitif/negatif izolatların antibiyotik duyarlılıklarının karşılaştırılmasında GSBL pozitif olanlarda negatif olanlara göre ampisilin, gentamisin, siprofloksasin, sefuroksim, seftazidim, sefuroksime/aksetil, seftriakson ve sefiksim antibiyotiklerine direnç oranı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Diğer antibiyotiklerin direnç oranlarında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

- 7- Çalışmamızda idrar örneklerinden izole edilen ve 72 fosfomisin dirençli *E. coli* izolatının 3'ünde (%4,2) *fosA3* geni saptanmış olup hiç *fosA*, *fosC2*, *fosX* ve *fosB* geni bulunamamıştır.
- 8- *fosA3* saptanan iki izolat agar dilüsyon, otomatize sistem ve disk diffüzyon yöntemiyle fosfomisine dirençli saptandı. Üçüncü izolat hem agar dilüsyon hem disk diffüzyon yöntemiyle dirençli saptandı. Üç izolatın agar dilüsyon testine göre MİK değeri 128 mg/l olark bulundu.
- 9- *fosA3* geni saptanan örneklerin ikisinde hem *bla*_{CTX-M} hem de *bla*_{TEM} genleri saptanırken diğer örnekte sadece *bla*_{TEM} geni bulundu. Her üç izolatta da *bla*_{SHV} tespit edilmedi.
- 10- Sonuç olarak özellikle GSBL üreten izolatlarda fosfomisin alternatif ilaç olarak yerini korumaktadır. *fos* direnç genlerinin beta-laktamaz genleriyle birlikte aynı plazmid üzerinde taşınıp yayılması, ilerde fosfomisin direncinin artmasına sebep olabilecektir. Fosfomisin direnç mekanizmalarının bilinmesi dirençli enfeksiyonların tedavisinin yönlendirilmesinde ve direncin takibinde önemli olacaktır. Ülkemizdeki baskın fosfomisin direnç profillerinin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Wagenlehner, F. M., Pilatz, A., Naber, K., & Weidner, W. (2014). Harnwegsinfektionen [Urinary tract infections]. *Aktuelle Urologie*, 45(2), 135–146. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1368176>.
2. Waller, T. A., Pantin, S. A. L., Yenior, A. L., & Pujalte, G. G. A. (2018). Urinary Tract Infection Antibiotic Resistance in the United States. *Primary care*, 45(3), 455–466. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.005>.
3. Millner, R., & Becknell, B. (2019). Urinary Tract Infections. *Pediatric clinics of North America*, 66(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2018.08.002>.
4. Bonkat G, Pickard R, Bartoletti R, Cai T, Bruyère F, Geerlings SE, Köves B, Wagenlehner F (2018) Guidelines on urological infections 2018, <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-on-Urological-Infections-2018-large-text.pdf>
5. Foxman B. (2014). Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious disease clinics of North America*, 28(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.003>.
6. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews. Microbiology*, 13(5), 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>.
7. Yamamoto, S., Tsukamoto, T., Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y., & Yoshida, O. (1997). Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. *The Journal of urology*, 157(3), 1127–1129.
8. Subashchandrabose, S., & Mobley, H. L. T. (2015). Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 3(4), 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012>
9. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections : virulence factors, bladder responses, antibiotic and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Front Microbiol*. 2017;8:1566. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>.
10. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
11. Galindo-Méndez M, Navarrete-Salazar H, Baltazar-Jiménez F, et al (2022). Emergence of Fosfomycin Resistance by Plasmid-Mediated *fos* Genes in Uropathogenic ESBL-Producing *E. coli* Isolates in Mexico. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(10), 1383. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101383>.
12. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires de l'adulte [cited 2017 Jun

- 21]. <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/infections-urinaires-spilf.pdf>External Link
13. Brown, E. D., Vivas, E. I., Walsh, C. T., & Kolter, R. (1995). MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 177(14), 4194–4197. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4194-4197.1995>.
 14. Castañeda-García, A., Blázquez, J., & Rodríguez-Rojas, A. (2013). Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomycin Resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 2(2), 217–236. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2020217>.
 15. Cao, X. L., Shen, H., Xu, Y. Y., Xu, X. J., Zhang, Z. F., Cheng, L., Chen, J. H., & Arakawa, Y. (2017). High prevalence of fosfomycin resistance gene fosA3 in bla CTX-M-harboring *Escherichia coli* from urine in a Chinese tertiary hospital during 2010-2014. *Epidemiology and infection*, 145(4), 818–824. <https://doi.org/10.1017/S0950268816002879>.
 16. Benzerara, Y., Gallah, S., Hommeril, B., Genel, N., Decré, D., Rottman, M., & Arlet, G. (2017). Emergence of Plasmid-Mediated Fosfomycin-Resistance Genes among *Escherichia coli* Isolates, France. *Emerging infectious diseases*, 23(9), 1564–1567. <https://doi.org/10.3201/eid2309.170560>.
 17. Mueller, L., Cimen, C., Poirel, L., Descombes, M. C., & Nordmann, P. (2019). Prevalence of fosfomycin resistance among ESBL-producing *Escherichia coli* isolates in the community, Switzerland. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 38(5), 945–949. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03531-0>.
 18. Bischoff S, Walter T, Gerigk M, Ebert M, Vogelmann R. Empiric antibiotic therapy in urinary tract infection in patients with risk factors for antibiotic resistance in a German emergency department. *BMC Infect Dis*. 2018 Dec;18(1):56. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-2960-9>
 19. Stamm, W. E., & Norrby, S. R. (2001). Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *The Journal of infectious diseases*, 183 Suppl 1, S1–S4. <https://doi.org/10.1086/318850>.
 20. Gupta, K., Hooton, T. M., & Stamm, W. E. (2001). Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Annals of internal medicine*, 135(1), 41–50. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-135-1-200107030-00012>.
 21. Micali, S., Isgro, G., Bianchi, G., Miceli, N., Calapai, G., & Navarra, M. (2014). Cranberry and recurrent cystitis: more than marketing?. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(8), 1063–1075. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.625574>.
 22. Schappert, S. M., & Rechtsteiner, E. A. (2011). Ambulatory medical care utilization estimates for 2007. *Vital and health statistics. Series 13, Data from the National Health Survey*, (169), 1–38.
 23. Hekimoğlu, CH., Batır E., Yıldırım Gözel E., Altun D. (2022) T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Bulaşıcı Hastalıklar ve Erken Uyarı Dairesi Başkanlığı-Ulusal

Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı (USHİESA) Etken Dağılımı Ve Antibiyotik Direnç Raporu 2021.
https://www.researchgate.net/publication/364113878_ULUSAL_SAGLIK_HIZMETI_ILISKILI_ENFEKSIYONLAR_SURVEYANS_AGI_USHIESA_ETKEN_DAGILIMI_ve_ANTIBIYOTIK_DIRENC_RAPORU_2021

24. Hooton T. M. (2012). Clinical practice. Uncomplicated urinary tract infection. *The New England journal of medicine*, 366(11), 1028–1037. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1104429>.
25. Hannan, T. J., Totsika, M., Mansfield, K. J., Moore, K. H., Schembri, M. A., & Hultgren, S. J. (2012). Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS microbiology reviews*, 36(3), 616–648. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00339.x>.
26. Levison, M. E., & Kaye, D. (2013). Treatment of complicated urinary tract infections with an emphasis on drug-resistant gram-negative uropathogens. *Current infectious disease reports*, 15(2), 109–115. <https://doi.org/10.1007/s11908-013-0315-7>.
27. Tabasi, M., Karam, M. R., Habibi, M., Mostafavi, E., & Bouzari, S. (2016). Genotypic Characterization of Virulence Factors in *Escherichia coli* Isolated from Patients with Acute Cystitis, Pyelonephritis and Asymptomatic Bacteriuria. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 10(12), DC01–DC07. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/21379.9009>.
28. Nielubowicz, G. R., & Mobley, H. L. (2010). Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature reviews. Urology*, 7(8), 430–441. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.101>.
29. Kline, K. A., Schwartz, D. J., Lewis, W. G., Hultgren, S. J., & Lewis, A. L. (2011). Immune activation and suppression by group B streptococcus in a murine model of urinary tract infection. *Infection and immunity*, 79(9), 3588–3595. <https://doi.org/10.1128/IAI.00122-11>.
30. Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., & Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 19(1), 37–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>.
31. Russo, T. A., & 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), 449–456. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(03\)00049-2](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00049-2).
32. Bruyand, M. et al. (2019). Paediatric haemolytic uraemic syndrome related to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, an overview of 10 years of surveillance in France, 2007 to 2016. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 24(8), 1800068. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.8.1800068>.
33. Mann, R., Mediati, D. G., Duggin, I. G., Harry, E. J., & Bottomley, A. L. (2017). Metabolic Adaptations of Uropathogenic *E. coli* in the Urinary Tract. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 241. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00241>.

34. Asadi Karam MR, Habibi M, Bouzari S. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic Escherichia coli. *Mol Immunol.* 2019 Apr;108:56–67. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.007>
35. McLellan, L. K., & Hunstad, D. A. (2016). Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends in molecular medicine*, 22(11), 946–957. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.003>.
36. Shah, C., Baral, R., Bartaula, B., & Shrestha, L. B. (2019). Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC microbiology*, 19(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1587-3>
37. Lane, M. C., Alteri, C. J., Smith, S. N., & Mobley, H. L. (2007). Expression of flagella is coincident with uropathogenic Escherichia coli ascension to the upper urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(42), 16669–16674. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607898104>.
38. Johnson J. R. (1991). Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. *Clinical microbiology reviews*, 4(1), 80–128. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.1.80>.
39. Totsika, M., Moriel, D. G., Idris, A., Rogers, B. A., Wurpel, D. J., Phan, M. D., Paterson, D. L., & Schembri, M. A. (2012). Uropathogenic Escherichia coli mediated urinary tract infection. *Current drug targets*, 13(11), 1386–1399. <https://doi.org/10.2174/138945012803530206>
40. Caza, M., & Kronstad, J. W. (2013). Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 80. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00080>
41. Kostakioti, M., Hultgren, S. J., & Hadjifrangiskou, M. (2012). Molecular blueprint of uropathogenic Escherichia coli virulence provides clues toward the development of anti-virulence therapeutics. *Virulence*, 3(7), 592–594. <https://doi.org/10.4161/viru.22364>.
42. Czaja, C. A., Scholes, D., Hooton, T. M., & Stamm, W. E. (2007). Population-based epidemiologic analysis of acute pyelonephritis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45(3), 273–280. <https://doi.org/10.1086/519268>.
43. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, et al (2011). International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52(5), e103–e120. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq257>.
44. Bartoletti R, Cai T, Wagenlehner FM, Naber K, Bjerkklund Johansen TE. Treatment of urinary tract infections and antibiotic stewardship. *Eur Urol Suppl.* 2016 Jul;15(4):81–87. <https://doi.org/10.1016/j.eursup.2016.04.003>

45. Grabe M, Bartoletti R, Bjerklund-Johansen TE, et al. Guidelines on urological infections. European Association of Urology Web site. <http://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-GuidelinesUrological-Infections-v2.pdf>. Updated 2015.
46. Kot B. (2019). Antibiotic Resistance Among Uropathogenic *Escherichia coli*. *Polish journal of microbiology*, 68(4), 403–415. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-048>.
47. Sanchez, G. V., Babiker, A., Master, R. N., Luu, T., Mathur, A., & Bordon, J. (2016). Antibiotic Resistance among Urinary Isolates from Female Outpatients in the United States in 2003 and 2012. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(5), 2680–2683. <https://doi.org/10.1128/AAC.02897-15>.
48. Noyal, M. J., Menezes, G. A., Harish, B. N., Sujatha, S., & Parija, S. C. (2009). Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of nonfermentative Gram-negative bacteria. *The Indian journal of medical research*, 129(6), 707–712.
49. Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(6), 1211–1233. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211>.
50. Ambler RP. 1980. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289:321–331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>.
51. Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>.
52. Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>.
53. Datta, N., & Kontomichalou, P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*, 208(5007), 239–241. <https://doi.org/10.1038/208239a0>.
54. Medeiros A. A. (1984). Beta-lactamases. *British medical bulletin*, 40(1), 18–27. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071942>.
55. Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-antimicrobial resistance*, 3(3), dlab092. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>.
56. Stürenburg, E., & Mack, D. (2003). Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *The Journal of infection*, 47(4), 273–295. [https://doi.org/10.1016/s0163-4453\(03\)00096-3](https://doi.org/10.1016/s0163-4453(03)00096-3).
57. Livermore D. M. (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews*, 8(4), 557–584. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.4.557>.
58. Huletsky, A., Knox, J. R., & Levesque, R. C. (1993). Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. *The Journal of biological chemistry*, 268(5), 3690–3697.

59. Perilli M, Dell'Amico E, Segatore B et al. (2002). Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from an Italian nationwide survey. *Journal of clinical microbiology*, 40(2), 611–614. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.611-614.2002>.
60. Oliver, A., Pérez-Díaz, J. C., Coque, T. M., Baquero, F., & Cantón, R. (2001). Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(2), 616–620. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.2.616-620.2001>.
61. Poirel, L., Kämpfer, P., & Nordmann, P. (2002). Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(12), 4038–4040. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.4038-4040.2002>.
62. Bauernfeind, A., Grimm, H., & Schweighart, S. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, 18(5), 294–298. <https://doi.org/10.1007/BF01647010>.
63. Cantón, R., & Coque, T. M. (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current opinion in microbiology*, 9(5), 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011>.
64. Bhat MA, Sageerabanoo S, Kowsalya R, Sarkar G. (2012). The occurrence of CTX-M3 type extended spectrum beta lactamases among *Escherichia coli* causing urinary tract infections in a tertiary care hospital in puducherry. *J Clin Diagn Res*. 6(7):1203–1206.
65. Ho, P. L., Lo, W. U., Yeung, M. K., Li, Z., Chan, J., Chow, K. H., Yam, W. C., Tong, A. H., Bao, J. Y., Lin, C. H., Lok, S., & Chiu, S. S. (2012). Dissemination of pHK01-like incompatibility group IncFII plasmids encoding CTX-M-14 in *Escherichia coli* from human and animal sources. *Veterinary microbiology*, 158(1-2), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.004>.
66. Naseer, U., & Sundsfjord, A. (2011). The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 17(1), 83–97. <https://doi.org/10.1089/mdr.2010.0132>.
67. Lee, S. Y., Park, Y. J., Yu, J. K., Jung, S., Kim, Y., Jeong, S. H., & Arakawa, Y. (2012). Prevalence of acquired fosfomycin resistance among extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Korea and IS26-composite transposon surrounding *fosA3*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(12), 2843–2847. <https://doi.org/10.1093/jac/dks319>.
68. Tseng, S. P., Wang, S. F., Kuo, C. Y., Huang, J. W., Hung, W. C., Ke, G. M., & Lu, P. L. (2015). Characterization of Fosfomycin Resistant Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Human and Pig in Taiwan. *PloS one*, 10(8), e0135864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135864>.
69. Sato, N., Kawamura, K., Nakane, K., Wachino, J., & Arakawa, Y. (2013). First detection of fosfomycin resistance gene *fosA3* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from healthy

- individuals in Japan. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 19(6), 477–482. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0061>.
70. Ho, P. L., Chan, J., Lo, W. U., Law, P. Y., Li, Z., Lai, E. L., & Chow, K. H. (2013). Dissemination of plasmid-mediated fosfomycin resistance fosA3 among multidrug-resistant *Escherichia coli* from livestock and other animals. *Journal of applied microbiology*, 114(3), 695–702. <https://doi.org/10.1111/jam.12099>.
 71. Ho, P. L., Chan, J., Lo, W. U., Lai, E. L., Cheung, Y. Y., Lau, T. C. K., & Chow, K. H. (2013). Prevalence and molecular epidemiology of plasmid-mediated fosfomycin resistance genes among blood and urinary *Escherichia coli* isolates. *Journal of medical microbiology*, 62(Pt 11), 1707–1713. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.062653-0>.
 72. Wachino, J., Yamane, K., Suzuki, S., Kimura, K., and Arakawa, Y. (2010). Prevalence of fosfomycin resistance among CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (7), 3061–3064. <https://doi.org/10.1128/AAC.01834-09>.
 73. Lv L, Huang X, Wang J, Huang Y, Gao X, Liu Y, Zhou Q, Zhang Q, Yang J, Guo J-Y, Liu J-H. 2020. Multiple plasmid vectors mediate the spread of fosA3 in extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacterales isolates from retail vegetables in China. *mSphere* 5:e00507-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00507-20>.
 74. Sastry, S., & Doi, Y. (2016). Fosfomycin: Resurgence of an old companion. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 22(5), 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2016.01.010>.
 75. Falagas, M. E., Kastoris, A. C., Karageorgopoulos, D. E., & Rafailidis, P. I. (2009). Fosfomycin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies. *International journal of antimicrobial agents*, 34(2), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.03.009>.
 76. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. 2016. Fosfomycin. *Clin Microbiol Rev* 29:321–347 doi:<https://doi.org/10.1128/CMR.00068-15>.
 77. Silver L. L. (2017). Fosfomycin: Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(2), a025262. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025262>.
 78. Díez-Aguilar, M., & Cantón, R. (2019). New microbiological aspects of fosfomycin. *Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 32 Suppl 1(Suppl 1), 8–18.
 79. Falagas, M. E., Giannopoulou, K. P., Kokolakis, G. N., & Rafailidis, P. I. (2008). Fosfomycin: use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(7), 1069–1077. <https://doi.org/10.1086/527442>.
 80. Roussos, N., Karageorgopoulos, D. E., Samonis, G., & Falagas, M. E. (2009). Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomycin for

- the treatment of patients with systemic infections. *International journal of antimicrobial agents*, 34(6), 506–515. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.08.013>.
81. Dijkmans, A. C., Zacarías, N. V. O., Burggraaf, J., Mouton, J. W., Wilms, E. B., van Nieuwkoop, C., Touw, D. J., Stevens, J., & Kamerling, I. M. C. (2017). Fosfomycin: Pharmacological, Clinical and Future Perspectives. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 6(4), 24. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6040024>.
 82. Bergan, T., Thorsteinsson, S. B., & Albini, E. (1993). Pharmacokinetic profile of fosfomycin trometamol. *Chemotherapy*, 39(5), 297–301. <https://doi.org/10.1159/000239140>.
 83. Patel, S. S., Balfour, J. A., & Bryson, H. M. (1997). Fosfomycin tromethamine. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections. *Drugs*, 53(4), 637–656. <https://doi.org/10.2165/00003495-199753040-00007>.
 84. Bergan T. (1990). Degree of absorption, pharmacokinetics of fosfomycin trometamol and duration of urinary antibacterial activity. *Infection*, 18 Suppl 2, S65–S69. <https://doi.org/10.1007/BF01643430>.
 85. Zambon Switzerland Ltd. Monurol (fosfomycin tromethamine) package insert. St. Louis, MO. 2007
 86. Lepak, A. J., Zhao, M., VanScoy, B., Taylor, D. S., Ellis-Grosse, E., Ambrose, P. G., & Andes, D. R. (2017). *In Vivo* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ZTI-01 (Fosfomycin for Injection) in the Neutropenic Murine Thigh Infection Model against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(6), e00476-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00476-17>.
 87. Tajik, S., Shokri, F., Rostamnezhad, M., Khoshnood, S., Mortazavi, S. M., Sholeh, M., & Kouhsari, E. (2020). Fosfomycin: A look at its various aspects. *Gene Reports*, 100640. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100640>.
 88. Falagas, M. E., Athanasiaki, F., Voulgaris, G. L., Triarides, N. A., & Vardakas, K. Z. (2019). Resistance to fosfomycin: Mechanisms, Frequency and Clinical Consequences. *International journal of antimicrobial agents*, 53(1), 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.013>
 89. Takahata S, Ida T, Hiraishi T, Sakakibara S, Maebashi K, Terada S, et al. (2010). Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4), 333–337. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.011>.
 90. Kim, D. H., Lees, W. J., Kempell, K. E., Lane, W. S., Duncan, K., & Walsh, C. T. (1996). Characterization of a Cys115 to Asp substitution in the *Escherichia coli* cell wall biosynthetic enzyme UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase (MurA) that confers resistance to inactivation by the antibiotic fosfomycin. *Biochemistry*, 35(15), 4923–4928. <https://doi.org/10.1021/bi952937w>.

91. Venkateswaran, P. S., & Wu, H. C. (1972). Isolation and characterization of a phosphonomycin-resistant mutant of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 110(3), 935–944. <https://doi.org/10.1128/jb.110.3.935-944.1972>.
92. Horii, T., Kimura, T., Sato, K., Shibayama, K., & Ohta, M. (1999). Emergence of fosfomycin-resistant isolates of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O26. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(4), 789–793. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.4.789>.
93. Arca, P., Rico, M., Braña, A. F., Villar, C. J., Hardisson, C., & Suárez, J. E. (1988). Formation of an adduct between fosfomycin and glutathione: a new mechanism of antibiotic resistance in bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32(10), 1552–1556. <https://doi.org/10.1128/AAC.32.10.1552>.
94. Arca, P., Reguera, G., & Hardisson, C. (1997). Plasmid-encoded fosfomycin resistance in bacteria isolated from the urinary tract in a multicentre survey. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 40(3), 393–399. <https://doi.org/10.1093/jac/40.3.393>.
95. Bernat, B. A., Laughlin, L. T., & Armstrong, R. N. (1997). Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochemistry*, 36(11), 3050–3055. <https://doi.org/10.1021/bi963172a>.
96. Roberts, A. A., Sharma, S. V., Strankman, A. W., Duran, S. R., Rawat, M., & Hamilton, C. J. (2013). Mechanistic studies of FosB: a divalent-metal-dependent bacillithiol-S-transferase that mediates fosfomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Biochemical journal*, 451(1), 69–79. <https://doi.org/10.1042/BJ20121541>.
97. Fillgrove, K. L., Pakhomova, S., Newcomer, M. E., & Armstrong, R. N. (2003). Mechanistic diversity of fosfomycin resistance in pathogenic microorganisms. *Journal of the American Chemical Society*, 125(51), 15730–15731. <https://doi.org/10.1021/ja039307z>.
98. Xu, H., Miao, V., Kwong, W., Xia, R., & Davies, J. (2011). Identification of a novel fosfomycin resistance gene (fosA2) in *Enterobacter cloacae* from the Salmon River, Canada. *Letters in applied microbiology*, 52(4), 427–429. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03016.x>.
99. Nakamura G, Wachino J, Sato N, Kimura K, Yamada K, Jin W, et al. (2014). Practical agar-based disk potentiation test for detection of fosfomycin-nonsusceptible *Escherichia coli* clinical isolates producing glutathione S-transferases. *Journal of clinical microbiology*, 52(9), 3175–3179. <https://doi.org/10.1128/JCM.01094-14>.
100. Ma, Y., Xu, X., Guo, Q., Wang, P., Wang, W., & Wang, M. (2015). Characterization of fosA5, a new plasmid-mediated fosfomycin resistance gene in *Escherichia coli*. *Letters in applied microbiology*, 60(3), 259–264. <https://doi.org/10.1111/lam.12366>.
101. Guo Q, Tomich AD, McElheny CL, Cooper VS, Stoesser N, Wang M, et al. (2016). Glutathione-S-transferase FosA6 of *Klebsiella pneumoniae* origin conferring fosfomycin resistance in ESBL-producing *Escherichia coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 71(9), 2460–2465. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw177>.

102. Rehman, M. A., Yin, X., Persaud-Lachhman, M. G., & Diarra, M. S. (2017). First Detection of a Fosfomycin Resistance Gene, *fosA7*, in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolated from Broiler Chickens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(8), e00410-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00410-17>.
103. Hou, J., Huang, X., Deng, Y., He, L., Yang, T., Zeng, Z., Chen, Z., & Liu, J. H. (2012). Dissemination of the fosfomycin resistance gene *fosA3* with CTX-M β -lactamase genes and *rmtB* carried on IncFII plasmids among *Escherichia coli* isolates from pets in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(4), 2135–2138. <https://doi.org/10.1128/AAC.05104-11>.
104. Villa, L., Guerra, B., Schmoger, S., Fischer, J., Helmuth, R., Zong, Z., García-Fernández, A., & Carattoli, A. (2015). IncA/C Plasmid Carrying bla(NDM-1), bla(CMY-16), and *fosA3* in a *Salmonella enterica* Serovar Corvallis Strain Isolated from a Migratory Wild Bird in Germany. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(10), 6597–6600. <https://doi.org/10.1128/AAC.00944-15>.
105. Thompson, M. K., Keithly, M. E., Goodman, M. C., Hammer, N. D., Cook, P. D., Jagessar, K. L., Harp, J., Skaar, E. P., & Armstrong, R. N. (2014). Structure and function of the genomically encoded fosfomycin resistance enzyme, FosB, from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, 53(4), 755–765. <https://doi.org/10.1021/bi4015852>.
106. Butcher, B. G., & Helmann, J. D. (2006). Identification of *Bacillus subtilis* sigma-dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by Bacilli. *Molecular microbiology*, 60(3), 765–782. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05131.x>.
107. García, P., Arca, P., & Evaristo Suárez, J. (1995). Product of *fosC*, a gene from *Pseudomonas syringae*, mediates fosfomycin resistance by using ATP as cosubstrate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(7), 1569–1573. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.7.1569>.
108. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 32nd ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA CLSI, 2022.
109. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. <http://www.eucast.org>.
110. Antibiyotik duyarlılık testleri, EUCAST: Uygulama, yorum ve uzman kuralları. Türk Mikrobiyol Cem Derg. Ek sayı 46 (http://tmc.dergisi.org/pdf/tmc_supplement_2016.pdf):2-10, 19-22.
111. Zhang, X., Bi, W., Chen, L., Zhang, Y., Fang, R., Cao, J., & Zhou, T. (2020). Molecular mechanisms and epidemiology of fosfomycin resistance in enterococci isolated from patients at a teaching hospital in China, 2013-2016. *Journal of global antimicrobial resistance*, 20, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.006>
112. Nigiz, Ş. (2020). *Yatan hastaların idrar kültürlerinden izole edilen Klebsiella spp., Escherichia coli, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının in vitro yöntemlerle saptanması ve fosfomisine direnç mekanizmalarının*

https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=rq8ILCIWfnRv08yVu8UXSA&no=fp9AyY5MAcwKSwK_mxWag Tez no:625005.

113. Kiratisin, P., Apisarnthanarak, A., Laesripa, C., & Saifon, P. (2008). Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(8), 2818–2824. <https://doi.org/10.1128/AAC.00171-08>.
114. Gundran, R. S., Cardenio, P. A., Villanueva, M. A., Sison, F. B., Benigno, C. C., Kreausukon, K., Pichpol, D., & Punyapornwithaya, V. (2019). Prevalence and distribution of bla_{CTX-M}, bla_{SHV}, bla_{TEM} genes in extended- spectrum β - lactamase- producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. *BMC veterinary research*, 15(1), 227. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1975-9>.
115. Curns, A. T., Holman, R. C., Sejvar, J. J., Owings, M. F., & Schonberger, L. B. (2005). Infectious disease hospitalizations among older adults in the United States from 1990 through 2002. *Archives of internal medicine*, 165(21), 2514–2520. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.21.2514>
116. Becknell, B., Schober, M., Korbel, L., & Spencer, J. D. (2015). The diagnosis, evaluation and treatment of acute and recurrent pediatric urinary tract infections. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(1), 81–90. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.986097>
117. Salvatore, S., Salvatore, S., Cattoni, E., Siesto, G., Serati, M., Sorice, P., & Torella, M. (2011). Urinary tract infections in women. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 156(2), 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.01.028>
118. Laupland, K. B., Ross, T., Pitout, J. D., Church, D. L., & Gregson, D. B. (2007). Community-onset urinary tract infections: a population-based assessment. *Infection*, 35(3), 150–153. <https://doi.org/10.1007/s15010-007-6180-2>
119. Çelikkilek N, Gözalan A, Özdem B, Kırca F, Açıkgöz Z C. Ayaktan Başvuran Hastaların İdrar Kültürlerinde Üretilen Enterobacteriaceae İzolatlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üretimi: Yedi Yıllık İzlem Sonuçları. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(2): 259-265
120. Soydan G, Görgülü Y, Öztürk C. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten Enterik Bakterilerde Fosfomisin Duyarlılığının Disk Difüzyon, Otomatize Sistem ve Agar Dilüsyon Kiti ile Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2021;55(4):617-625/doi: 10.5578/mb.20219712
121. Altıparlak Ü, Özbek A, Aktaş F. Üriner Sistem Enfeksiyonlarından İzole Edilen Bakterilerin Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 32: 167-173
122. Keskin BH, Çalışkan E, Kaya S, Köse E, Şahin İ. Üriner sistem enfeksiyonlarında etken bakteriler ve antibiyotik direnç oranları. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg*. 2021;51(3):254-62.
123. Ronald A. (2002). The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *The American journal of medicine*, 113 Suppl 1A, 14S–19S. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(02\)01055-0](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(02)01055-0)

124. Masajtis-Zagajewska, A., & Nowicki, M. (2017). New markers of urinary tract infection. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 471, 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.06.003>
125. Chu, C. M., & Lowder, J. L. (2018). Diagnosis and treatment of urinary tract infections across age groups. *American journal of obstetrics and gynecology*, 219(1), 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.12.231>
126. Aghamali, M., Sedighi, M., Zahedi Bialvaei, A., Mohammadzadeh, N., Abbasian, S., Ghafouri, Z., & Kouhsari, E. (2019). Fosfomycin: mechanisms and the increasing prevalence of resistance. *Journal of medical microbiology*, 68(1), 11–25. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000874>.
127. Pullukçu H, Aydemir, SŞ, Taşbakan MI, Sipahi OR. (2013) "Is there a rise in resistance rates to fosfomycin and other commonly used antibiotics in Escherichia coli-mediated urinary tract infections? A perspective for 2004 – 2011," *Turkish Journal of Medical Sciences*: Vol. 43: No. 4, Article 8. <https://doi.org/10.3906/sag-1210-75>.
128. Güler, E., Doğan, A., Büyükberber SG., Cebeci, Sİ., Çöplü, N ve Dinç, B. (2022, Kasım). Ankara Şehir Hastanesi'nde İdrar Kültürlerinden İzole Edilen Bakterilerin Kümülatif Antibiyogram Sonuçlarının Değerlendirilmesi. Poster sunumu, 40. Uluslararası Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya.
129. Avcıoğlu F ve Behçet M. Üriner sistem enfeksiyonu etkeni Escherichia coli izolatlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranlarının değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2020;50(3):172-7.
130. Karamanlioğlu D, Aysert-Yıldız P, Kaya M, Sarı N. İdrar Kültürlerinden İzole Edilen Enterik Bakterilerde Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamaz Oluşturma Sıklığı ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *Klinik Derg.* 2019; 32(3): 233-9.
131. Karlowsky JA, Lagacé-Wiens PRS, Laing NM, Baxter MR, Adam HJ, Zhanel GG. 2020. Susceptibility of clinical isolates of Escherichia coli to fosfomycin as measured by four in vitro testing methods. *J Clin Microbiol* 58:e01306-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01306-20>.
132. Hashemian, S. M. R., Farhadi, Z., & Farhadi, T. (2019). Fosfomycin: the characteristics, activity, and use in critical care. *Therapeutics and clinical risk management*, 15, 525–530. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S199119>
133. Öcal D, Türk AH, Lale ES, Bayansar Z, Margün Z, Namlı C ve ark. Escherichia coli izolatlarında fosfomisin duyarlılığının çeşitli yöntemler ile saptanması. *FLORA* 2022;27(1):94-102.
134. van den Bijllaardt, W., Schijffelen, M. J., Bosboom, R. W., Cohen Stuart, J., Diederer, B., Kampinga, G., Le, T. N., Overdeest, I., Stals, F., Voorn, P., Waar, K., Mouton, J. W., & Muller, A. E. (2018). Susceptibility of ESBL Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae to fosfomycin in the Netherlands and comparison of several testing methods including Etest, MIC test strip, Vitek2, Phoenix and disc diffusion. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(9), 2380–2387. <https://doi.org/10.1093/jac/dky214>

135. Aktaş SÇ, Gençer S, Batırel A, Haciseyitoğlu D, Özer S. CLSI ve EUCAST Önerilerine Göre Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Escherichia coli* İdrar İzolatlarında Fosfomisin Duyarlılığı. *Mikrobiyol Bul.* 2014; 48(4): 545-555
136. İrvem A, Küçük EV, Pala E, Çomoğlu Ş, Dede B, Karagöz G, Yücel FM. Üriner Sistem enfeksiyonlarından İzole edilen *Escherichia coli* Suşlarında Fosfomisin Trometamol Duyarlılığının Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 45(2):88-91, 2015 doi:10.5222/TMCD.2015.088
137. Nilsson, A. I., Berg, O. G., Aspevall, O., Kahlmeter, G., & Andersson, D. I. (2003). Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(9), 2850–2858. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2850-2858.2003>.
138. Tsuruoka, T., Miyata, A., & Yamada, Y. (1978). Two kinds of mutants defective in multiple carbohydrate utilization isolated from in vitro fosfomycin-resistant strains of *Escherichia coli* K-12. *The Journal of antibiotics*, 31(3), 192–201. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.31.192>
139. Scortti, M., Lacharme-Lora, L., Wagner, M., Chico-Calero, I., Losito, P., & Vázquez-Boland, J. A. (2006). Coexpression of virulence and fosfomycin susceptibility in *Listeria*: molecular basis of an antimicrobial in vitro-in vivo paradox. *Nature medicine*, 12(5), 515–517. <https://doi.org/10.1038/nm1396>.
140. Li, Y., Zheng, B., Li, Y., Zhu, S., Xue, F., & Liu, J. (2015). Antimicrobial Susceptibility and Molecular Mechanisms of Fosfomycin Resistance in Clinical *Escherichia coli* Isolates in Mainland China. *PloS one*, 10(8), e0135269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135269>
141. Ohkoshi, Y., Sato, T., Suzuki, Y., Yamamoto, S., Shiraishi, T., Ogasawara, N., & Yokota, S. I. (2017). Mechanism of Reduced Susceptibility to Fosfomycin in *Escherichia coli* Clinical Isolates. *BioMed research international*, 2017, 5470241. <https://doi.org/10.1155/2017/5470241>
142. Lu, P. L., Hsieh, Y. J., Lin, J. E., Huang, J. W., Yang, T. Y., Lin, L., & Tseng, S. P. (2016). Characterisation of fosfomycin resistance mechanisms and molecular epidemiology in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *International journal of antimicrobial agents*, 48(5), 564–568. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.013>
143. Mattioni Marchetti, V., Kraftova, L., Finianos, M., Sourenian, T., Hrabak, J., & Bitar, I. (2023). Polyclonal Spread of Fosfomycin Resistance among Carbapenemase-Producing Members of the Enterobacterales in the Czech Republic. *Microbiology spectrum*, 11(3), e0009523. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00095-23>
144. Ortiz-Padilla, M., Portillo-Calderón, I., Velázquez-Escudero, A., Rodríguez-Baño, J., Pascual, Á., Rodríguez-Martínez, J. M., & Docobo-Pérez, F. (2022). Effect of Glycerol on Fosfomycin Activity against *Escherichia coli*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(11), 1612. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111612>
145. Seok, H., Choi, J. Y., Wi, Y. M., Park, D. W., Peck, K. R., & Ko, K. S. (2020). Fosfomycin Resistance in *Escherichia coli* Isolates from South Korea and in vitro Activity of Fosfomycin

- Alone and in Combination with Other Antibiotics. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 9(3), 112. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030112>
146. Mattioni Marchetti, V., Hrabak, J., & Bitar, I. (2023). Fosfomycin resistance mechanisms in Enterobacterales: an increasing threat. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13:1178547. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1178547>
 147. Fu, Z., Liu, Y., Chen, C., Guo, Y., Ma, Y., Yang, Y., Hu, F., Xu, X., & Wang, M. (2016). Characterization of Fosfomycin Resistance Gene, fosB, in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *PloS one*, 11(5), e0154829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154829>.
 148. Xin, L., Xu, X., Shi, Q., Han, R., Wang, J., Guo, Y., & Hu, F. (2022). High Prevalence and Overexpression of Fosfomycin-Resistant Gene fosX in *Enterococcus faecium* From China. *Frontiers in microbiology*, 13, 900185. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.900185>.
 149. Lalezadeh, A., Ghotaslou, P., & Ghotaslou, R. (2023). The Detection of Fosfomycin-Modifying Enzymes (fos) in Uropathogenic Enterobacterales, Azerbaijan, Iran. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 2023, 3766269. <https://doi.org/10.1155/2023/3766269>.
 150. Kashefieh, M., Hosainzadegan, H., Baghbanijavid, S., & Ghotaslou, R. (2021). The Molecular Epidemiology of Resistance to Antibiotics among *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Azerbaijan, Iran. *Journal of tropical medicine*, 2021, 9195184. <https://doi.org/10.1155/2021/9195184>.
 151. Ito, R., Mustapha, M. M., Tomich, A. D., Callaghan, J. D., McElheny, C. L., Mettus, R. T., Shanks, R. M. Q., Sluis-Cremer, N., & Doi, Y. (2017). Widespread fosfomycin resistance in <https://doi.org/10.1128/mBio.00749-17>.
 152. Navas, J., Leon, J., Arroyo, M., & Garcia Lobo, J. M. (1990). Nucleotide sequence and intracellular location of the product of the fosfomycin resistance gene from transposon Tn2921. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(10), 2016–2018. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.10.2016>.
 153. Zurfluh K, Treier A, Schmitt K, Stephan R. (2020). Mobile fosfomycin resistance genes in Enterobacteriaceae: an increasing threat. *Microbiologyopen* 9:e1135. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1135>
 154. Kieffer N, Poirel L, Descombes MC, Nordmann P. 2020. Characterization of FosL1, a plasmid-encoded fosfomycin resistance protein identified in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e02042-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02042-19>
 155. Wang, Y., Lo, W. U., Lai, E. L., Chow, K. H., and Ho, P. L. (2015). Complete sequence of the multidrug-resistant IncL/M plasmid pIMP-HB623 cocarrying bla_{IMP-34} and fosC2 in an enterobacter cloacae strain associated with medical travel to China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (9), 5854–5856. <https://doi.org/10.1128/AAC.00375-15>

156. Ortiz de la Rosa, J. M., Nordmann, P., Zong, Z., and Poirel, L. (2022). Aliidiomarina shirensis as possible source of the integron- and plasmid-mediated fosfomycin resistance gene fosC2. Antimicrob. Agents Chemother. 66 (3), e0222721. <https://doi.org/10.1128/aac.02227-21>.
157. Yang, T.-Y., Lu, P.-L., & Tseng, S.-P. (2019). Update on fosfomycin-modified genes in Enterobacteriaceae. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 52(1), 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.10.006>.
158. Baron, S., le Devendec, L., Lucas, P., Larvor, E., Jové, T., & Kempf, I. (2020). Characterisation of plasmids harbouring extended-spectrum cephalosporin resistance genes in Escherichia coli from French rivers. Veterinary Microbiology, 243, 108619. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108619>.
159. Mendes, A. C., Rodrigues, C., Pires, J., Amorim, J., Ramos, M. H., Novais, Â., & Peixe, L. (2016). Importation of Fosfomycin Resistance fosA3 Gene to Europe. Emerging infectious diseases, 22(2), 346–348. <https://doi.org/10.3201/eid2202.151301>
160. Lupo, A., Saras, E., Madec, J.-Y., & Haenni, M. (2018). Emergence of blaCTX-M-55 associated with fosA, rmtB and mcr gene variants in Escherichia coli from various animal species in France. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 73(4), 867–872. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx489>.
161. Loras, C., González-Prieto, A., Pérez-Vázquez, M., Bautista, V., Ávila, A., Campoy, P. S., Oteo-Iglesias, J., & Alós, J. I. (2021). Prevalence, detection and characterisation of fosfomycin-resistant Escherichia coli strains carrying fosA genes in Community of Madrid, Spain. Journal of global antimicrobial resistance, 25, 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.02.032>.
162. Freitag, C., Michael, G. B., Li, J., Kadlec, K., Wang, Y., Hassel, M., & Schwarz, S. (2018). Occurrence and characterisation of ESBL-encoding plasmids among Escherichia coli isolates from fresh vegetables. Veterinary microbiology, 219, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.028>.
163. Sun, H., Li, S., Xie, Z., Yang, F., Sun, Y., Zhu, Y., Zhao, X., & Jiang, S. (2012). A novel multidrug resistance plasmid isolated from an Escherichia coli strain resistant to aminoglycosides. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 67(7), 1635–1638. <https://doi.org/10.1093/jac/dks107>.
164. Jiang, W., Men, S., Kong, L., Ma, S., Yang, Y., Wang, Y., Yuan, Q., Cheng, G., Zou, W., & Wang, H. (2017). Prevalence of Plasmid-Mediated Fosfomycin Resistance Gene fosA3 Among CTX-M-Producing Escherichia coli Isolates from Chickens in China. Foodborne pathogens and disease, 14(4), 210–218. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2230>.
165. Nigiz, Ş., Hazırolan, G., Köseoglu Eser, Ö., & Gür, D. (2022). First Detection of Klebsiella pneumoniae Isolate Co-Harboring Fosfomycin Resistance Gene fosA3 and blaCTX-M Among Gram Negative Urine Isolates in a Turkish Hospital. Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.), 28(3), 317–321. <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0114>.

166. Tanrıverdi Çaycı, Y., Hacıeminoğlu Ülker, K., Karacan Temür, G., Güney, D. B., Ertokatlı, M., & Birinci, A. (2023). [Investigation of O25b-ST131 Clone Frequency and Presence of Carbapenem and Fosfomycin Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates: First Detection of fosA3 from *Escherichia coli* O25bSTf131 Clone from Türkiye]. *Mikrobiyoloji bulteni*, 57(3), 454–462. <https://doi.org/10.5578/mb.20239937>.
167. Doi, Y., Iovleva, A., & Bonomo, R. A. (2017). The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. *Journal of travel medicine*, 24(suppl_1), S44–S51. <https://doi.org/10.1093/jtm/taw102>.
168. Robin F, Beyrouthy R, Bonacorsi S, Aissa N, Bret L, Brieu N, Cattoir V, Chapuis A, Chardon H, Degand N, Doucet-Populaire F, Dubois V, Fortineau N, Grillon A, Lanotte P, Leyssene D, Patry I, Podglajen I, Recule C, Ros A, Colomb-Cotin M, Ponties V, Ploy MC, Bonnet R. 2017. Inventory of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in France as assessed by a multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e01911-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01911-16>.
169. Ojer-Usoz, E., González, D., & Vitas, A. I. (2017). Clonal Diversity of ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Environmental, Human and Food Samples. *International journal of environmental research and public health*, 14(7), 676. <https://doi.org/10.3390/ijerph14070676>.
170. Ghenea, A. E., Zlatian, O. M., Cristea, O. M., Ungureanu, A., Mititelu, R. R., Balasoiu, A. T., Vasile, C. M., Salan, A. I., Iliuta, D., Popescu, M., Udriștoiu, A. L., & Balasoiu, M. (2022). TEM, CTX-M, SHV Genes in ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Samples in a County Clinical Emergency Hospital Romania-Predominance of CTX-M-15. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(4), 503. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040503>.
171. Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Novais, A., Sousa, J. C., Baquero, F., Peixe, L., & Portuguese Resistance Study Group (2007). High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(6), 1370–1374. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm381>.
172. Wang, Z.; Lu, Q.; Mao, X.; Li, L.; Dou, J.; He, Q.; Shao, H.; Luo, Q. Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Resistant Genes in *Escherichia coli* Isolates from Central China during 2016–2019. *Animals* 2022, 12, 3191. <https://doi.org/10.3390/ani12223191>.
173. Bubpamala, J., Khuntayaporn, P., Thirapanmethee, K., Montakantikul, P., Santanirand, P., & Chomnawang, M. T. (2018). Phenotypic and genotypic characterizations of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Thailand. *Infection and drug resistance*, 11, 2151–2157. <https://doi.org/10.2147/IDR.S174506>.
174. Yamanaka, T., Funakoshi, H., Kinoshita, K., Iwashita, C., & Horikoshi, Y. (2020). CTX-M group gene distribution of extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae at a Japanese Children's hospital. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the*

175. Tillekeratne, L. G., Vidanagama, D., Tippalagama, R., Lewkebandara, R., Joyce, M., Nicholson, B. P., Nagahawatte, A., Bodinayake, C. K., De Silva, A. D., & Woods, C. W. (2016). Extended-spectrum β -Lactamase-producing Enterobacteriaceae as a Common Cause of Urinary Tract Infections in Sri Lanka. *Infection & chemotherapy*, 48(3), 160–165. <https://doi.org/10.3947/ic.2016.48.3.160>.
176. Jena, J., Sahoo, R. K., Debata, N. K., & Subudhi, E. (2017). Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M genes of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in adults. *3 Biotech*, 7(4), 244. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0879-2>.
177. Bajpai, T., Pandey, M., Varma, M., & Bhatambare, G. S. (2017). Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna journal of medicine*, 7(1), 12–16. <https://doi.org/10.4103/2231-0770.197508>.
178. Gautam, V., Thakur, A., Sharma, M., Singh, A., Bansal, S., Sharma, A., Kapil, A., Das, B. K., Sistla, S., Parija, S. C., Veeraraghavan, B., Prakash, J. A. J., Walia, K., Ohri, V. C., & Ray, P. (2019). Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae*: A multi-centric study from tertiary care hospitals in India. *The Indian journal of medical research*, 149(2), 208–215. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_172_18.
179. Kürekci, C., Aydin, M., Yipel, M., Katouli, M., & Gündoğdu, A. (2017). Characterization of extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in Asi (Orontes) River in Turkey. *Journal of water and health*, 15(5), 788–798. <https://doi.org/10.2166/wh.2017.257>.
180. Pehlivanlar Önen, S., Aslantaş, Ö., Şebnem Yılmaz, E., & Kürekci, C. (2015). Prevalence of β -Lactamase Producing *Escherichia coli* from Retail Meat in Turkey. *Journal of food science*, 80(9), M2023–M2029. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12984>.
181. Görgeç, S., Kuzucu, Ç., Otlı, B., Yetkin, F., & Ersoy, Y. (2015). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten nozokomiyal *Escherichia coli* izolatlarında beta-laktamaz gen oranları ve klonal ilişkinin araştırılması [Investigation of beta-lactamase genes and clonal relationship among the extended-spectrum beta-lactamase producing nosocomial *Escherichia coli* isolates]. *Mikrobiyoloji bulteni*, 49(1), 15–25. <https://doi.org/10.5578/mb.8437>.
182. Öksüz L, Gürler N. *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların tiplendirilmesi ve plazmid profil analizi. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(2): 183-94.
183. Copur Cicek, A., Saral, A., Ozad Duzgun, A., Yasar, E., Cizmeci, Z., Ozlem Balci, P., Sari, F., Firat, M., Altintop, Y. A., Ak, S., Caliskan, A., Yildiz, N., Sancaktar, M., Esra Budak, E., Erturk, A., Birol Ozgumus, O., & Sandalli, C. (2013). Nationwide study of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases TEM, SHV and CTX-M in Turkey. *The Journal of antibiotics*, 66(11), 647–650. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.72>.

184. Azap, Ö. K., Arslan, H., Şerefhanoglu, K., Çolakoglu, Ş., Erdoğan, H., Timurkaynak, F., & Senger, S. S. (2010). Risk factors for extended-spectrum β -lactamase positivity in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(2), 147–151. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02941>.
185. Dağlar, D., Ongüt, G., Oğünç, D., Ozhak Baysan, B., Demirbakan, H., Sepin Özen, N., & Gültekin, M. (2010). Toplum kaynaklı üriner sistem enfeksiyonu etkeni *Escherichia coli* suşlarında GSBL enzim tiplerinin izoelektrik odaklama ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri ile araştırılması [Investigation of ESBL types in community acquired urinary *Escherichia coli* isolates by isoelectric focusing and polymerase chain reaction]. *Mikrobiyoloji bulteni*, 44(3), 367–374.
186. Gür, D., Gülay, Z., Akan, O. A., Aktaş, Z., Kayacan, C. B., Cakici, O., Eraç, B., Gültekin, M., Oğünç, D., Söyletir, G., Unal, N., & Uysal, S. (2008). Türkiye'de hastane izolati gram-negatif bakterilerde yeni beta-laktam antibiyotiklere direnç ve GSBL tipleri: çok merkezli HITIT surveyansinin sonuçlari [Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicentre HITIT study]. *Mikrobiyoloji bulteni*, 42(4), 537–544.
187. Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and global health*, 109(7), 309–318. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>.
188. Theuretzbacher, U., & Paul, M. (2015). Revival of old antibiotics: structuring the re-development process to optimize usage. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21(10), 878–880. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.06.019>.