



**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *E. COLI*
İZOLATLARININ GENOTİPLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Çetin KILINÇ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Melek İNCİ**

HATAY - 2013

**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *E. COLI*
İZOLATLARININ GENOTİPLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Çetin KILINÇ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Melek İNCİ**

**Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Uzmanlık Grubu tarafından 1204U0103/2012 sayılı
proje numarası ile desteklenmiştir.**

TEZ ONAY SAYFASI
T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEZ ADI: KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *E. COLI*
İZOLATLARININ GENOTİPLENDİRİLMESİ**

TEZİ HAZIRLAYANIN ADI: Dr. Çetin KILINÇ

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

(İmza).....
Prof.Dr. Sadık BÜYÜKBAŞ
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(İmza).....
Doç.Dr. Nizami DURAN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

(İmza).....
Yrd.Doç.Dr. Melek İNCİ
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1.(İsim ve imza).....
2.(İsim ve imza).....
3.(İsim ve imza).....
4.(İsim ve imza).....
5.(İsim ve imza).....

I. İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY SAYFASI

| | |
|--|----------|
| I.İÇİNDEKİLER | iii |
| II. TABLO LİSTESİ | vii |
| III. ŞEKİL LİSTESİ | viii |
| IV. KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ | ix |
| V. İTHAF | xi |
| VI. TEŞEKKÜR..... | xii |
| VII. ÖZET | xiii |
| VIII. ABSTRACT | xiv |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Tarihçe..... | 3 |
| 2.2. Morfoloji ve biyokimyasal özellikleri..... | 3 |
| 2.3. Antijenik özellikler | 4 |
| 2.3.1. O antijeni..... | 4 |
| 2.3.2. H antijeni..... | 5 |
| 2.3.3. K antijeni..... | 5 |
| 2.4. Virülans faktörleri..... | 5 |
| 2.4.1. Fimbria..... | 5 |
| 2.4.2. Kapsül | 6 |
| 2.4.3. Ekzotoksinler | 6 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.4. Hemolizinler | 6 |
| 2.5. Epidemiyolojisi ve yaptığı enfeksiyonlar | 5 |
| 2.5.1. Barsaklarda oluşturdukları enfeksiyonlar | 7 |
| 2.5.1.1. Enterotoksijenik <i>E. coli</i> (ETEC)..... | 7 |
| 2.5.1.2. Enteroinvazif <i>E. coli</i> (EIEC) | 7 |
| 2.5.1.3. Enterohemorajik <i>E. coli</i> (EHEC)..... | 7 |
| 2.5.1.4. Enteropatojenik <i>E. coli</i> (EPEC)..... | 7 |
| 2.5.1.5. Enteroaggregatif <i>E. coli</i> (EaggEC)..... | 7 |
| 2.5.2. Barsak dışında oluşturdukları enfeksiyonlar..... | 7 |
| 2.6. Bakterilerin hücre duvarı ve peptidoglikan sentezi | 8 |
| 2.7. Beta-laktamlar | 8 |
| 2.7.1. Beta-laktamlara karşı direnç gelişimi ve direncin mekanizmaları..... | 9 |
| 2.7.1.1. Beta-laktamazlara bağlı direnç | 9 |
| 2.7.1.2. Hedef moleküllerinde oluşan değişikliklere bağlı direnç | 9 |
| 2.7.1.3. Hücre içine girişinin engellenmesi ile oluşan direnç..... | 9 |
| 2.7.1.4. Aktif pompa sistemi ile dışarı atılması yoluyla oluşan direnç | 9 |
| 2.8. Beta-laktamazlar..... | 9 |
| 2.8.1. İsimlendirme | 10 |
| 2.8.2. Sınıflandırma | 10 |
| 2.9. GSBL tanımı ve sınıflandırılması..... | 11 |
| 2.9.1. TEM grubu enzimler..... | 11 |
| 2.9.2. SHV gurubu enzimler | 11 |
| 2.9.3. CTX-M gurubu enzimler | 11 |
| 2.9.4. OXA grubu enzimler | 12 |
| 2.9.5. PER grubu enzimler..... | 12 |
| 2.9.6. İnhibitör dirençli beta-laktamazlar..... | 12 |

| | |
|--|-----------|
| 2.9.7. Diğer GSBL enzimleri | 13 |
| 2.10. GSBL saptama yöntemleri..... | 13 |
| 2.10.1. Tarama testleri | 13 |
| 2.10.2. Fenotipik doğrulama testleri | 13 |
| 2.10.2.1. Sefalosporin/klavulanik asit kombinasyon diskleri..... | 13 |
| 2.10.2.2. Sıvı (broth) mikrodilüsyon | 14 |
| 2.10.2.3. E-test..... | 14 |
| 2.10.2.4. GSBL saptanmasında kullanılan diğer fenotipik testler | 14 |
| 2.10.3. GSBL saptanmasında moleküler yöntemler | 14 |
| 2.11. GSBL üreten izolatların yayılımını etkileyen faktörler | 15 |
| 2.12. Kinolonlar..... | 16 |
| 2.12.1. Kinolonların etki mekanizması | 16 |
| 2.12.2. Kinolonlara karşı direnç..... | 16 |
| 2.12.3. Direnç gelişimi için başlıca risk faktörleri..... | 17 |
| 2.13. GSBL üreten kinolona dirençli <i>E. coli</i>'lerin klinik önemi | 17 |
| 2.14. Kontrol ve tedavi seçenekleri..... | 18 |
| 2.14.1. Tedavide kullanılacak başlıca antibiyotikler | 19 |
| 2.14.1.1. Beta-laktam / beta-laktamaz inhibitörleri | 19 |
| 2.14.1.2. Aminoglikozidler..... | 19 |
| 2.14.1.3. Karbapenemler | 19 |
| 2.14.1.4. Üçüncü kuşak sefalosporinler..... | 20 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 21 |
| 3.1. Bakteri kökenleri | 21 |
| 3.2. Bakterilerin seçimi..... | 21 |
| 3.3. Kinolon direncinin saptanması..... | 22 |
| 3.4. GSBL varlığının çift disk sinerji testi ile saptanması | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5. Enfeksiyonun kökeninin belirlenmesi..... | 22 |
| 3.6. Risk faktörlerinin araştırılması..... | 22 |
| 3.7. Bakteriler arasındaki klonal yakınlığın belirlenmesi..... | 23 |
| 3.7.1. Rep-PCR yönteminin uygulanması | 23 |
| 3.7.1.1. DNA ekstraksiyonu | 23 |
| 3.7.1.2. DNA yoğunluğunun belirlenmesi..... | 24 |
| 3.7.1.3. Diversilab parmakizi kiti kullanılarak Rep-PCR uygulanması | 25 |
| 3.7.1.4. Biyoanalizör kullanılarak otomatik mikroakışkan elektroforez | 26 |
| 3.7.1.5. Rep-PCR işlemi için kullanılan kitlerin içerikleri | 27 |
| 4. BULGULAR | 28 |
| 5. TARTIŞMA | 38 |
| 6. SONUÇLAR | 43 |
| 7. KAYNAKLAR..... | 44 |
| 8. ÖZGEÇMİŞ..... | 54 |

II. TABLO LİSTESİ

| <u>Tablo no</u> | <u>Sayfa no</u> |
|------------------------|--|
| Tablo 1 | DNA parmakizi kiti master miks.....25 |
| Tablo 2 | PCR siklusları25 |
| Tablo 3 | Hastaların karakteristik özellikleri.....28 |
| Tablo 4 | İzolatların elde edildiği ünitelere göre dağılımı.....29 |
| Tablo 5 | Hastalarda mevcut olan risk faktörleri30 |

III. ŞEKİL LİSTESİ

| <u>Şekil no</u> | | <u>Sayfa no</u> |
|------------------------|--|------------------------|
| Şekil 1 | Hasta sayısının risk faktörü sayısına göre değerlendirilmesi..... | 29 |
| Şekil 2 | <i>E. coli</i> kökenlerine ait dendrogramve jel benzeri görüntü..... | 31 |
| Şekil 3 | Tüm <i>E. coli</i> izolatlarına ait yüzde benzerlik matriksi...32 | |
| Şekil 4 | Tüm izolatların orijinlerine ait ait noktalama grafiği...34 | |
| Şekil 5 | P4 klonuna ait yüzde benzerlik matriksi | 35 |
| Şekil 6 | P5 klonuna ait yüzde benzerlik matriksi..... | 36 |

IV. KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

| | |
|--------|---|
| ATCC | : American Type Culture Collection |
| bp | : Base pair |
| BPH | : Benign prostat hiperplazisi |
| CDC | : Centers for Disease Control |
| CLSI | : Clinical and Laboratory Standarts Institute |
| CLED | : Cysteine Lactose Electrolyte Deficient |
| CYBÜ | : Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| DYBÜ | : Dahili Yoğun Bakım Ünitesi |
| EaggEC | : Enteroaggregatif <i>E. coli</i> |
| EPEC | : Enteropatojenik <i>E. coli</i> |
| EHEC | : Enterohemorajik <i>E. coli</i> |
| EIEC | : Enteroinvazif <i>E. coli</i> |
| ETEC | : Enterotoksijenik <i>E. coli</i> |
| EMB | : Eozin-metilen mavisi |
| g | : Gravite |
| GSBL | : Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz |
| HÜS | : Hemolitik üremik sendrom |
| İYE | : İdrar Yolları Enfeksiyonu |
| LCR | : Ligaz Zincir Reaksiyonu |
| LT | : Heat-Labile toxin |
| MİK | : Minimal İnhibitör Konsantrasyon |
| MLST | : Multilocus sekans tiplendirme |
| NAG | : N-asetil glukozamin |
| NAM | : N-asetil muramik asit |
| PBP | : Penisilin bağlayan protein |

| | |
|---------|---|
| PCR | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| PFGE | : Pulsed Field Gel Electroforesis |
| pI | : İzoelektrik nokta |
| Rep-PCR | : Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction |
| RFLP | : Restriction Fragment Length Polymorphism |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| SSCP | : Single-Stranded Conformational Polymorphism |
| SS | : Salmonella-Shigella |
| ST | : Heat-Stable Toxin |
| TSB | : Tryptic Soy Broth |
| TBE | : Tris Borik asit-EDTA |
| UV | : Üreterovezikal |
| UPGMA | : Unweighted Pairwise Grouping Matemathical Avenaging |
| XLD | : Xylose Lysine Deoxycholate |
| VUR | : Vezikoüreteral reflü |
| YBÜ | : Yoğun Bakım Ünitesi |
| µl | : Mikrolitre |

V. İTHAF

CANIM KIZIM VE SEVGİLİ EŞİME

VI. TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca hem bilimsel hemde hayat tecrübesi açısından bana yön veren karşılaştığım her türlü maddi ve manevi sıkıntıda ağabeylik yapan ve memleketimden uzakta olduğumu bana hissettirmeyen değerli hocam ve bölüm başkanımız sayın Doç. Dr. Nizami DURAN'a, asistanlığım süresince benden yardımlarını, bilgilerini ve güler yüzlerini esirgemeyen değerli hocalarım sayın Doç. Dr. Burçin ÖZER'e, sayın Doç.Dr Meryem ÇETİN'e ve sayın Yrd.Doç.Dr. Erkan YULA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın ilk başladığı günden itibaren yoğun olan işlerine rağmen kendisini her rahatsız ettiğimde bana zaman ayıran, tezin her aşamasında büyük emeği, özverisi, fedakarlığı olan ve tezin bütün detaylarıyla tek tek ilgilenen değerli hocam ve tez danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Melek İNCİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bölümde beraber çalıştığım asistan arkadaşlarıma, çalıştığım süre boyunca yardımlarını esirgemeyen teknisyen arkadaşlarıma, her sıkıntılı durumumda yanımda olan Arş. Gör. Dr. Kemal Türker ULUTAŞ'a ve Enfeksiyon hastalıkları rotasyonumda her konuda bana yardımcı olan başta sayın Doç. Dr. Yusuf ÖNLEN olmak üzere enfeksiyon hastalıklarındaki tüm hocalarım ve asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan yaptığım bütün işlerde beni cesaretlendiren, benden hiçbir zaman güvenlerini sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen çok değerli anneme, babama ve kardeşlerim Sezgin, Mustafa ve Şerife'ye teşekkürlerimi sunarım.

Beni her zaman destekleyen sevgili eşim Nurgül'e ve tez çalışmam süresince yeterince ilgilenemediğim için beni affetmesini istediğim canım kızım Betül Ahsen'e çok teşekkür ederim.

Dr. Çetin KILINÇ
HATAY- 2012

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *E. COLI* İZOLATLARININ GENOTİPLENDİRİLMESİ

VII. ÖZET

Amaç: Bu çalışmada idrar örneklerinden izole edilen genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten ve kinolona dirençli *E. coli* kökenlerinin epidemiyolojisinin ve risk faktörlerinin araştırılması, bunun yanı sıra rep-PCR (repetitive-sequence-based polymerase chain reaction) yöntemiyle izolatlar arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve yöntem: Çalışmaya idrar örneklerinden izole edilen ve etken olarak kabul edilen, GSBL üreten ve kinolona dirençli 96 *E. coli* kökeni çalışmaya dâhil edildi. İzolatlarda GSBL varlığı çift disk sinerji testiyle, kinolon direnci siprofloksasin diski kullanılarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı. GSBL üreten *E. coli* ile enfeksiyon geçirmek için hastalarda mevcut olan risk faktörleri belirlendi. Hastaya ait kayıtların incelenmesi sonucu, CDC kriterleri esas alınarak enfeksiyonun toplum veya hastane kökenli olduğu belirlendi. İzolatların klonal yakınlıkları rep-PCR yöntemiyle saptandı.

Bulgular: Çalışmaya alınan 96 suşun 52'sinin (%54.2) hastane kaynaklı, 44'ünün (%45.8) ise toplum kaynaklı enfeksiyonlardan izole edildiği belirlendi. Hastaların GSBL pozitif *E. coli* ile enfeksiyon geçirmek için ortalama 3 risk faktörüne sahip olduğu ve en sık karşılaşılan risk faktörünün son 6 ayda hastanede yatış olduğu saptandı. Rep-PCR ile 9'u ana klonları ve 20 si sporadik olmak üzere toplam 29 farklı klon belirlendi.

Sonuç: Toplum kökenli enfeksiyonlara sebep olan izolatlar hastane ile ilişkili olabilir. Bu kökenler uzun süre hastanede kolonize olarak değişik ünitelerde enfeksiyonlara neden olabilir. Çoklu ilaca dirençli üriner system enfeksiyonlarına neden olan *E. coli* kökenlerinin epidemiyolojisinin belirlenebilmesi için klonal ilişkinin araştırılması faydalıdır.

Anahtar kelimeler: *Escherichia Coli*, GSBL, Kinolon direnci, Klonal yakınlık, Rep-PCR

GENOTYPING OF E.COLI STRAINS WHICH WERE ISOLATED FROM CLINICAL SPECIMENS

VIII. ABSTRACT

Aim: In this study, it was aimed to investigate the epidemiology and risk factors in Expanded Spectrum Beta Lactamase (ESBL) positive and quinolone resistant *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections. In addition, the clonal relationships among *Escherichia coli* strains was aimed to determine by repetitive-sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) method.

Materials & methods: A total of 96 *E. coli* strains isolated from urine samples and identified as the infection agent were included. All of strains were ESBL positive and quinolone resistant. **ESBL production and quinolone** resistance in *E. coli* isolates were tested by the Kirby-Bauer disk diffusion method according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). ESBL production was evaluated by the double disc synergy test. Risk factors for infection by ESBL-producing *E. coli* in patients. Based on the Centers for Disease Control criteria, whether community hospital acquired infections were identified. The clonal proximity of the isolates was determined rep-PCR method.

Results: It was found that 52 of 96 isolates (54.2%) were isolated from nosocomial infections whereas totally 44 (45.8%) isolates were isolated from community acquired infections. Usually the three risk factors in patients with regard to ESBL-positive *E. coli* infections were identified. The most common risk factors in patients assessed as the hospitalization in the last 6 months. It was shown to be a total of 29 clones including 9 major clones and 20 sporadic clones by Rep-PCR technique.

Conclusion: Community-acquired isolates that cause infections may be associated with the hospitalization. These strains colonized in hospital for along time can cause infections in various departments. It is useful to investigate the clonal relationship to determine multi-drug resistant *E. coli* epidemiology which causes urinary tract infections.

Key words: *Escherichia coli*, ESBL, Quinolone resistance, Clonal proximity, Rep-PCR

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Enterobacteriaceae ailesinin üyesi olan *Escherichia coli* hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlardan sıklıkla izole edilen bir bakteridir. Son yıllarda bu enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik direnci giderek büyüyen bir sorundur. *E. coli*'nin sebep olduğu enfeksiyonlarda sıklıkla kullanılan beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı gelişen direnç, uygunsuz ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımının artması, yasal olarak sınırlama olmaması, direncin bakteriler arasında aktarılabilmesi ve daha birçok nedenden dolayı hızla artmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisinde tercih edilen beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direncin en önemli ve sık rastlanan sebebi sayıları 500'ü bulan beta-laktamaz enzimlerinin bakteriler tarafından üretilmesidir. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) olarak isimlendirilen enzimlerin üretimi geniş spektrumlu beta-laktamların tedavide kullanılmasını sınırlandırmakta ve tedavi seçeneklerinin azalmasına neden olmaktadır. Beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç mekanizmaları arasında en önemlisi GSBL üretimidir. GSBL oluşturan kökenler ile meydana gelen enfeksiyonlar, uzun süreli hastanede yatışa, yüksek tedavi maliyetine ve yüksek mortaliteye yol açmaktadır. Günümüzde GSBL üreten kökenler artan sıklıkta izole edilmektedir (1-4).

GSBL'ler penisilinlere, sefamisinler haricindeki tüm sefalosporinlere ve aztreonama dirence yol açan, klavulanik asit, sulbaktam ya da tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile inaktive edilebilen, TEM ve SHV enzimlerinden çeşitli aminoasit değişikliklerinin olması sonucu oluşan ve genellikle de plazmidler tarafından kodlanan enzimlerdir. Bu enzimi üretebilen enterik bakterilerin bu enzimleri plazmidler yoluyla başka bakterilere kolayca aktarılabilmelerinden dolayı bu enzimi üretebilen bakteri sayısı her geçen gün artmaktadır (5-7).

Diğer taraftan GSBL'yi kodlayan plazmidler aynı zamanda beta-laktamlar dışındaki birçok antibiyotiğe karşı da genetik materyal taşımaktadır. Dolayısıyla GSBL üreten bakterilerde başta aminoglikozidler olmak üzere kinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim-sülfametoksazol direnci de eş zamanlı olarak bulunabilmektedir (8,9). Özellikle idrar yolları enfeksiyonları olmak üzere toplumda birçok enfeksiyonda yaygın olarak kullanılan kinolon grubu ilaçlara karşı oluşan dirençle GSBL birlikteliği birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Ülkemizde ve dünyada giderek artmakta olan ve gelecek açısından endişe verici boyutlara ulaşan antibiyotik direncine karşı mücadele edebilmek için çeşitli epidemiyolojik çalışmalar yapılmaktadır (2,5,8).

Bu çalışmada laboratuvarımıza gönderilen idrar örneklerinden izole edilen GSBL üreten ve kinolona dirençli *E. coli* izolatlarının epidemiyolojisinin ve risk faktörlerinin araştırılması, ayrıca son zamanlarda hızlılığı ve kullanım kolaylığı ile ön plana çıkan Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction (Rep-PCR) yöntemiyle klonal yakınlığın belirlenmesi amaçlanmıştır. Hastanemizde GSBL üreten ve kinolona dirençli *E. coli* izolatları arasındaki klonal ilişkinin araştırılması, enfeksiyon kaynağının, yayılma yollarının ve rezervuarlarının saptanması açısından faydalı olabileceği gibi, enfeksiyonlara bağlı olarak ortaya çıkan ekonomik kayıpların en aza indirilmesinde de son derece yararlı olacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *E. coli* 1885'de ishalli süt çocuklarının dışkılarından Theodor Escherich tarafından izole edilmiştir. 1919'da Castellani ve Chalmer tarafından *Escherichia* cins ismi önerilene kadar *Bacterium coli commune* adı ile anılmıştır (10,11). Doğumu takiben kısa bir süre içerisinde sıcak kanlı hayvanların gastrointestinal sistemine yerleşen *E. coli* kökenlerinin büyük bir kısmı ince bağırsağın distal bölgesinde bulunur. *E. coli* aynı zamanda kalın barsak florası içinde de en yaygın olarak bulunan fakültatif anaerob bakteridir (12). Bu bakterinin serolojik tiplendirilmesi ilk defa Goldschmidt tarafından 1933 yılında süt çocuğu gastroenteritininin epidemiyolojisini aydınlatmak amacı ile yapılmıştır. Serolojik tiplendirmedeki asıl gelişme ise 1944 yılında Kauffman tarafından *E. coli*'nin serotiplerinin detaylı olarak şematize edilmesiyle gösterilmiştir (13).

2.2. Morfoloji ve biyokimyasal özellikleri

Enterobacteriaceae ailesindeki diğer bakterilere benzeyen *E. coli* gram negatif, sporsuz ve çomak şeklinde bir bakteridir. Seyrek olarak kapsül oluşturmakla beraber, pek çok izolat polisakkarit yapıda M antijeni içeren bir mikrokapsül veya yine aynı yapıda K antijeni içeren slime tabaka içerebilir (11). Katı besiyerinde 18-24 saatte düzgün kenarlı, 2-3 mm çapında, konveks, çoğunlukla metalik yeşil röfle veren S tipi koloniler oluşturan *E. coli*, sıvı besiyerinde yoğun üreyerek bulanıklık yapar. Katı besiyerinde tekrarlayan pasajlarında granüler R tipi koloniler oluşturabilir (14,15).

E. coli fakültatif anaerop bir bakteri olup peptonlu su, buyyon ve jelöz gibi genel besiyerlerinde rahatlıkla ürer. Optimal üreme ısısı 37°C ve optimal pH 7-7,2 olmakla beraber 18- 45°C ve pH 5-8 aralıklarında da üreyebilir. Optimal şartların var olduğu durumlarda 20 dakikada ikiye bölünebilir. Eozin-Metilen Blue (EMB) agar ve McConkey agar gibi seçici besiyerlerinde bariz bir şekilde ürer. EMB besiyerinde laktozu fermente ettiklerinden metalik refle veren koloniler oluşturlar. Salmonella-Shigella (SS) agar ve McConkey agarda laktoz fermentasyonu sonucu kırmızı renkte ve etraflarında zon oluşan (safra yı prespite ettiğinden dolayı) koloniler yaparlar. CLED (Cysteine Lactose Electrolyte Deficient) agar ve XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) agar besiyerlerinde sarı koloniler meydana getirirler. Bazı *E. coli* izolatları kanlı agarda hemoliz yapabilir (11,14,15).

E. coli türleri glukozdan asit ve gaz oluşturlar. Laktoz, D-mannitol, D-sorbitol, L-arabinoz, maltoz, D-ksiloz, trehaloz ve D-mannozu fermente ederler. İnositol, sellobioz, eritol, D-arabitolü fermente etmezler. Katalaz, metil kırmızısı, lizin dekarboksilaz reaksiyonları olumlu iken, oksidaz, Voges-Proskauer, fenilalanin deaminaz, lipaz, 25°C'de DNaz aktiviteleri olumsuzdur. Çoğunlukla indol pozitif iken, H₂S ve üreaz negatiftirler. Tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanmazlar ve jelatini hidrolize etmezler (16,17).

2.3. Antijenik özellikleri

Karmaşık bir antijenik yapıya sahip olan *E. coli* 1944 yılında Kauffman tarafından antijenik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritlerdeki O-spesifik polisakkarit zincirine göre serolojik guruplara, H ve K antijenlerine göre serolojik tiplere ayrılırlar. Şimdiye kadar 170'i aşkın O antijeni, 50'yi aşkın H antijeni ve 100'den fazla K antijeni tanımlanmıştır. Toplamda ise 1000'in üzerinde antijenik tipi mevcuttur (18-20).

2.3.1. O antijeni: Somatik bir antijen olup ısı ve alkole dayanıklı, formole karşı hassastır. *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Citrobacter* ve *Providencia* cinsi bakterilerin O antijenleri ile *E. coli* antijenleri arasında çapraz reaksiyonlar meydana gelebilir. *E. coli*'nin yol açtığı üriner sistem enfeksiyonlarının üçte ikisine bilinmekte olan bütün *E. coli* serotiplerinin sadece %8-10'luk kısmı sebep olur. Üriner sistem enfeksiyonlarına en sık yol açan serotip 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 18a, 18b, 22, 25, 50 ve 75'tir (21-23).

2.3.2.H antijeni: Kirpik antijeni olup protein yapısındadır. Formole dayanıklı olmasına rağmen 100°C'ye kadar ısıtılmaya, proteolitik enzimlere ve alkole karşı hassastır. Başka bakterilerin H antijenleri ile çapraz reaksiyon oluşturmazlar (24).

2.3.3. K antijeni: Polisakkarit yapıda olan K antijeni kapsül antijenidir. Isıya karşı hassastır. Bu gurubun antijenleri L, A, B harfleri ile gösterilir. Bazı B antijenleri fimbriyaya benzer. 100°C'ye 1 saat dayanabilen B antijeni patojeniteden sorumlu başlıca kapsül antijenidir. L antijenleri ise çoğunlukla hemolitik olan antijenlerdir (15). K 1, 2, 3, 5, 12 ve 13 antijenlerini içeren suşlar büyük oranda piyelonefrit etkenidir. K1 en sık saptanan antijen olup, bakteri hücre yüzeyinde hidrofilik ve negatif yüklü özellik oluşturarak opsonizasyon ve fagositoza engel olur. Ayrıca alternatif kompleman yolunu inhibe ederek kompleman sisteminin bakterisidal etkisini ortadan kaldırır (25).

2.4. Virülans faktörleri

Virülans faktörleri mikroorganizmanın patojenite seviyesini göstermekte olup, mikroorganizmaların hastalık oluşturabilme kabiliyetidir. Bu kabiliyet mikroorganizmanın konağa girişi, konak savunmasından kaçışı, konağa zarar vermesi, çoğalması, yayılması ile ilişkilidir (26). *E. coli*'nin başlıca virülans faktörleri; fimbria varlığı, kapsül oluşturma, hücrelere yapışma, siderefor üretimi, sitotoksik nekrotizan faktör-1 üretimi, hemolizin varlığı, kolisin V üretimi, idrarda hızlı üreme ve antimikrobiyallere direnç göstermesidir (27).

2.4.1. Fimbria: Konak hücrelerine tutunmaya yarayan aynı zamanda pili de denilen fimbrialar antijenik ve fonksiyonel özellik gösterirler. Mannoza karşı olan duyarlılığına göre Tip 1 ve Tip 2 diye ikiye ayrılır. Tip 1'de yer alan fimbrialar kolon mukozası vajinal mukozaya ve ağız boşluğuna tutunmaya yardım eder. Tip 2'de ise S fimbria, P fimbria ve X faktör bulunur. P kan grubu antijenlerine bağlananlara P fimbria adı verilir. P fimbrialar üriner sistem enfeksiyonlarında rol alır. S fimbrialar ise bakteriyemi yapan suşlarda görülür ve damar endoteliliyle beyin ventriküllerine tutunmayı sağlar. X faktör de denilen heterolog adezinler ise üropatojenitede rol alır.

2.4.2. Kapsül: Bakterinin dışında bulunan bakterinin tanınmasını ve imha edilmesini engelleyen koruyucu bir tabakadır. İnsan serumunun ve nötrofillerin öldürücü etkileri

karşısında bakteriye direnç kazandırır. Yenidoğan menenjitli olgularından izole edilen *E. coli* suşlarının büyük bir kısmında kapsül bulunmaktadır (27,28).

2.4.3. Ekzotoksinler: Enterotoksijenik *E. coli*'lerin yol açtığı ishallerin patojenezinde rol alan ST ekzotoksini barsak epitel hücrelerinin su emilimini engeller. LT ekzotoksini ise bunun aksine su ve elektrolit salınımını artırır. Bu ekzotoksinleri bulundurmayan Enterohemorajik *E. coli*'de (EHEC) ise barsak hücrelerinin ölümüne yol açarak barsağın su emme yeteneğini bozan ve kanlı ishale yol açan shiga toksin denen bir ekzotoksin vardır (28).

2.4.4. Hemolizinler: Lipopolisakkarit veya fosfolipid komponent içeren, filtre edilebilen ve ısıya dayanıksız bir makromolekül olan hemolizin, *E. coli* tarafından alfa-hemolizin, beta-hemolizin, gama-hemolizin ve entero-hemolizin şeklinde olmak üzere değişik tiplerde üretilir. Hemolitik suşların hemoliz yapmayan suşlara göre insan serumunun öldürücü etkisi karşısında daha dayanıklı oldukları ve lökositler tarafından fagosite edildikleri zaman diğer *E. coli* suşlarına göre daha yüksek oranda canlı kaldıkları görülmüştür. Demir miktarının düşük olduğu durumlarda hemolizin üretiminin arttığı, demir miktarının arttığı zamanlarda da baskılandığı görülmüştür (29,30).

2.5. Epidemiyolojisi ve yaptığı enfeksiyonlar

Kuşların ve memelilerin normal barsak florasında bulunan pütrefaksiyon ve fermentasyon dengesinin düzenlenmesi ve besinlerin sindirilmesi gibi pek çok durumda rol alan *E. coli* sindirim sisteminde diğer flora bakterileri ile dengede kaldığı sürece hastalığa neden olmaz. Ancak bu dengenin bozulması halinde barsak hastalıklarına neden olduğu gibi, barsak dışına çıkıp diğer dokularda da enfeksiyonlara yol açabilir (14). *E. coli*'nin neden olduğu bu enfeksiyonlar, barsaklar ve barsak dışında oluşanlar şeklinde ikiye ayrılabilir (12,14).

2.5.1. Barsaklarda oluşturdukları enfeksiyonlar

E. coli’ler barsaklarda oluşturdukları hastalıkların fizyopatolojilerine göre çeşitli tiplere ayrılmaktadırlar.

2.5.1.1. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC): Yüzeyel antijenleri ve pilusları aracılığıyla barsak epiteline tutunarak, LT ve ST enterotoksinleri vasıtasıyla, hafif klinik formdan ağır kolera benzeri kliniğe kadar çok geniş bir yelpazede seyreden hastalık yapabilirler. *E. coli*’nin bu tipi 2 yaş altındaki cocuklarda bakteriyel diyarenin ve turist diyaresinin en önemli etkenidir.

2.5.1.2. Enteroinvazif *E. coli* (EIEC): Enterotoksin salınımında bulunmayan bu tip, sıklıkla cocuklarda barsak mukozasında ülserlere ve pürülan sıvı salınımının artışına yol aarak dizanteriform ishallere yol açar.

2.5.1.3. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC): Su ve gıda kaynaklı ishallere neden olurlar. O157:H7 kökenleri ile hemorajik kolite sebep olurlar. Verotoksin adı verilen toksinleri Shiga toksin ile oldukça benzerdir. Salgıladıkları bu toksin vasıtasıyla cocuklarda akut kanlı ishale ve takiben böbrek yetmezliği, trombositopeni ve hemolitik anemi ile seyreden hemolitik üremik sendroma (HS) yol aabilirler.

2.5.1.4. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC): Patogenezi tam olarak anlaşılmayan bu tip, süt cocuklarında ishallere neden olur.

2.5.1.5. Enteroaggregatif *E. coli* (EaggEC): Enterotoksin salınımı yoktur ve invazyon yapmaz. Sıklıkla kronik diyareye neden olur ve her yaşta akut diyareye sebep olabilir.

2.5.2. Barsak dışında oluşturdukları enfeksiyonlar

Üriner sistem enfeksiyonlarına, 50 yaşın üzerindeki kişilerde oluşan ve hastane kaynaklı olan pnömonilere, yeni doğan menenjitine, yaşlılarda meydana gelen yüksek mortaliteli menenjite, travma ya da apandisit sonrası oluşan peritonite yol aabilirler. Bunların yanısıra, sepsis, septik artrit, endoftalmit, karaciğer absesi, sinüzit, osteomyelit, prostatla ilgili enfeksiyonlar gibi pek çok hastalığın etkeni olarak da karşımıza çıkabilirler (12,14,31).

2.6. Bakterilerde hücre duvarı ve peptidoglikan sentezi

Bakteri için önemli yapılardan biri olan hücre duvarı bakteriyi lizisten korur ve bakteriye şeklini verir. Yapısında antijenik yapıda pek çok antijen ve virülans faktörü barındırarak, bakterinin yaşam döngüsü ve patojenitesi açısından önemli bir komponent oluşturur. Bakterilerin tanımlanmasında çok önemli bir basamak olan Gram boyama işlemi de bakterinin hücre duvarı ile ilişkilidir. Hücre duvarının dayanıklılığını ve sağlamlığını asıl oluşturan esas komponent peptidoglikandır. Peptidoglikan tabaka hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerin hücre duvar yapısının en önemli komponentidir. Peptidoglikan yapısını zayıflatan ya da bozan unsurlar bakterinin ölümüne yol açabilir. Bakterinin hücre duvarı sentezini etkileyen ajanlar peptidoglikan sentezini değişik aşamalarda etkilemektedir. Fosfomisin ve sikloserin gibi ajanlar erken basamakları etkilerken, beta-laktam antibiyotikler geç basamakları etkilemektedirler (32-34).

2.6.1. Peptidoglikan sentezi

Tekrarlayan N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAM) ünitelerinin birbirlerine β -1,4 glikozid bağlarıyla bağlanmasıyla oluşturulan bir glikan omurganın NAM'a bağlı kısa peptid zincirleriyle birleşmesiyle peptidoglikan oluşur. Peptidoglikan sentezinde temel basamaklar;

- 1-Sitoplazmada peptidoglikan öncüllerinin sentezlenmesi,
- 2-Sitoplazmik membranda yer alan bir lipid taşıyıcıya ilk aşamada sentezlenen öncüllerin iletilmesi, disakkarid pentapeptid yapıların oluşturulması ve membranın iç yüzünden dışarı doğru iletilmesi,
- 3-Yeni yapının peptidoglikan zincire bağlanması ve zincirin uzaması,
- 4-Peptidoglikan polimerleri arasında çapraz bağların meydana gelmesi ve taşıyıcı lipidin fosfatının uzaklaştırılarak rejenere edilmesi (10,33,35).

2.7. Beta-laktamlar

Kimyasal yapılarında ortak bir beta-laktam halkası içeren ve antibakteriyel etkisini hücre duvarı sentezini inhibe ederek gösteren beta-laktam grubu antibiyotikler günümüzde en yaygın olarak kullanılan antibiyotik gruplarından. Bakterisidal etkili olan bu grup, sadece üreme fazındaki bakterilere etki eder. Bu antibiyotikler beta-laktam halkasına bağlanan diğer halkalara ve yan zincirlere göre penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktamlar olmak üzere 4 grupta incelenir.

Bunlarla birlikte beta-laktamaz inhibitörleri de antibakteriyel etkilerinin olmamasına rağmen, beta-laktam antibiyotik grubu içerisinde dirler (32,36).

Beta-laktamlar bakteriyi dış etkilerden ve basınçtan koruyarak bakterinin yapısal bütünlüğünü ve canlılığının devamını sağlayan hücre duvarınının yapısında bulunan peptidoglikan tabakanın yapımından sorumlu olan proteinlere bağlanarak peptidoglikan sentezini bozar ve bakteride lizise yol açar (37).

2.7.1. Beta-laktamlara karşı direnç gelişimi ve direncin mekanizmaları

Bakterisid etkilerinin yüksek, toksisitelerinin düşük olması ve birçok enfeksiyonun tedavisinde başarılı olmalarından dolayı günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılmalarının sonucunda beta-laktam antibiyotiklere karşı hızla gelişen bir direnç problemi ortaya çıkmıştır (38). Beta-laktam antibiyotiklere karşı bakterilerin direnç geliştirmesi için bilinen başlıca 4 mekanizma vardır.

2.7.1.1. Beta-laktamazlara bağlı direnç: Bakterilerin oluşturduğu beta-laktamazların antibiyotikdeki, beta-laktam halkasını hidrolize etmesiyle ortaya çıkar.

2.7.1.2. Hedef moleküllerinde oluşan değişikliklere bağlı direnç: Penisilin bağlayan proteinlerdeki (PBP) değişiklik sonucunda beta-laktam antibiyotiklerin hücre duvarı setezinde rol alan bu proteinlere bağlanamaması sonucu meydana gelir.

2.7.1.3. Hücre içine girişinin engellenmesi ile oluşan direnç: Gram negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotiklerin bakterinin içine girerken kullandıkları bakterinin dış membranında bulunan porin adı verilen kanalların bakteri tarafından sayılarının azaltılması ya da yapılarının değiştirilmesi yoluyla bakteri içine antibiyotiğin girişinin engellenmesi veya kısıtlanması yoluyla oluşan dirençtir.

2.7.1.4. Aktif pompa sistemi ile dışarı atılması yoluyla oluşan direnç: Bakterinin içine girmiş olan antibiyotiğin aktif bir pompa sistemi ile hücre dışına atılması yoluyla oluşur. Sadece beta-laktamlar değil birçok antibiyotik bu yolla dışarı atılabilir (5,39,40).

2.8. Beta-laktamazlar

Beta-laktam antibiyotiklerde bulunan beta-laktam halkasını parçalayarak bu antibiyotikleri işlevsiz hale getiren beta-laktamaz enzimi ilk kez 1940 yılında bir *E. coli* suşunda saptanmıştır. 1960 yılında ise plazmidde kodlanan bir beta-laktamaz olan ve penisilinleri inaktive eden TEM -1 gösterilmiştir (5,41).

Penisilin, sefalosporin ve diğer beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek bunlara karşı direnç gelişiminden sorumlu olan beta-laktamazlar, beta-laktam halkasında bulunan karbinol grubu ile bir ester köprüsü oluşturup, siklik amid bağını bozarak bir açil enzim türevi oluşturmak yoluyla etki gösterirler (42).

2.8.1. İsimlendirme

Beta-laktamazların isimlendirilmesinde sabit bir sistem yoktur. Bu enzimlerin bazıları enzimleri bulan kişilerin isimlerine göre (HMS), bazıları genlerine göre (AMP), bazıları izole edildikleri bakterilere göre (PSE), bazıları kullandığı substrata göre (IMP, OXA), bazıları biyokimyasal özelliklerine göre (SHV, NBC), bazıları hasta isimlerine göre (TEM), bazıları izole edildikleri hastaneye göre (MIR) ve bazıları da eyaletlere göre (OHIO) isimlendirilmiştir (41,43).

2.8.2. Sınıflandırma

Beta-laktamazların sayılarının zamanla artmasıyla farklı araştırmacılar tarafından değişik sınıflandırma şemaları öne sürülmüştür. Genel anlamda kabul gören ilk sınıflandırma 1960'larda Richmond ve Sykes tarafından ortaya konmuştur. 1976 yılında bu şema Sykes ve Matthew tarafından izoelektrik odaklama kullanılarak genişletilmiştir. İlerleyen yıllarda bu sınıflandırmadaki hatalar ve eksiklikler görülüp, 1989 yılında Bush ve ark. tarafından sınıflama değiştirilmiş ve 1995 yılında da güncellenmiştir. Bu şemaya göre beta-laktamazlar 4 ana grup altında sınıflandırılmışlardır (44,45). Kabul gören bir diğer sınıflandırma ise Bush ve arkadaşlarının yaptığı fonksiyonel sınıflandırmanın aksine 1980 yılında Ambler tarafından yapılmış olan moleküler temelli sınıflandırmadır. Bu sınıflandırmada beta-laktamazlar moleküler benzerliklerine göre (amino asit ve nükleotid dizileri) A, B, C ve D olmak üzere 4 grupta incelenmektedir. A sınıfı penisilinazları, B sınıfı metallo beta-laktamazları, C sınıfı sefalosporinazları, D sınıfı ise oksasilini hidroliz eden beta-laktamazları içerir. A, C, D grupları serin beta-laktamazlar, B grubu ise metallo beta-laktamazlar olarak isimlendirilir (46,47).

2.9. GSBL tanımı ve sınıflandırması

GSBL'ler penisilinlere, sefamisinler haricindeki tüm sefalosporinlere ve aztreonama dirence yol açan, klavulanik asit sulbaktam ya da tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile inaktive edilebilen, TEM ve SHV enzimlerinde çeşitli aminoasitlerde değişiklik sonucu oluşan ve genellikle de plazmidler tarafından kodlanan enzimlerdir. Bu enzimler plazmidler aracılığıyla başka bakterilere kolayca transfer edilebilmelerinden dolayı bu enzimi üretebilen bakterilerin türleri her geçen gün artmaktadır (5,6,8).

2.9.1. TEM grubu enzimler

Plazmidlerle aktarıldığı bilinen ilk enzimlerden olan TEM-1 1965 yılında Yunanistan'daki bir hastadan izole edilen bir *E. coli* suşunda saptanmıştır. Bu grupta bulunan enzimler başta *E. coli* ve *K. pneumoniae* olmak üzere bazı *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde sıklıkla bulunmaktadır. Bu enzim gram negatiflerde sıklıkla bulunabilmekle beraber ampisiline dirençli *E. coli*'lerin büyük çoğunluğunda bu dirençten sorumludur. *H. influenza* ve *N. gonorrhoe*'de bulunan penisilin ve ampisilin dirençlerinden de bu enzim sorumludur. TEM-1'deki tek aminoasit değişikliği ile TEM-2 oluşmuştur. Günümüze kadar 120'nin üzerinde TEM tipi enzim bildirilmiş olup, bunların 98'inin GSBL özelliği bulunmaktadır (48-50).

2.9.2. SHV grubu enzimler

Ampisilin, piperasilin ve tikarsiline direnç oluşturan SHV-1 enzimi en sık *K. pneumoniae*'de bulunmaktadır. 1983 yılında bulunan SHV-2, bu grubun belirlenen ilk geniş spektrumlu enzimidir. Bu grupta bulunan enzim sayısı TEM grubunda bulunan enzimlere kıyasla daha azdır (51).

2.9.3. CTX-M grubu enzimler

Substrat olarak sefotaksimi kullanan CTX-M grubu enzimler GSBL grubuna son yıllarda katılmış olup, ilk kez 1989 yılında Almanya'da bir *E. coli* suşunda saptanmıştır. Tazobaktamın bu gruba karşı gösterdiği inhibitör etki Klavulanik asit ve Sulbaktama göre daha fazladır (51,52). Bu enzimler 5 ana grupta toplanabilir (53).

Grup 1 (CTX-M-1); CTX-M-1, 3, 10, 12, 15, FEC-1, 22, 23, 28, 29, 30

Grup 2 (CTX-M-2); CTX-M-2, 4, 4L, 5, 6, 7, 20, TOHO-1

Grup 3 (CTX-M-8); CTX-M-8

Grup 4 (CTX-M-9); CTX-M-9, 13, 14, 16, 17, 19, 21, 27, TOHO-2, 24

Grup 5 (CTX-M-25); CTX-M-25, 26

TEM ve SHV tipi GSBL'ler hastane kökenli enfeksiyon etkenlerinde daha çok saptanırken, toplum kökenli enfeksiyonlarda da CTX-M tipi beta-laktamaz üreten bakterilere eskiye nazaran daha sık rastlanmaya başlanmıştır (6).

2.9.4. OXA grubu enzimler

Kromozomal kaynaklı olan ve plazmiddeki genlerle aktarılan, en sık *P. aeruginosa* olmak üzere pek çok bakteride saptanan bir enzim olan OXA'nın bildirimi tüm dünyada her geçen gün artmaktadır. Bu enzimlerin bakteriye ampisilin ve sefalotine karşı direnç kazandırmaları, oksasilin ve kloksasiline karşı yüksek hidrolitik aktiviteleri ve klavulanik asitle inhibe olmamaları önemli özelliklerindedir (48).

2.9.5. PER grubu enzimler

İlk kez 1993 yılında bir Türk hastadan soyutlanan *Pseudomonas aeruginosa* izolatında saptanan bu enzim penisilin ve sefalosporinleri hidroliz edebilmesinin yanında klavulanik aside karşı duyarlıdır. PER-1 tipi ülkemizde daha sık görülürken İtalya'dan da bu enzimi üreten *P. aeruginosa* salgını bildirilmiştir. PER-2 enzimine sıklıkla Güney Amerika'da rastlanır. PER grubu beta-laktamazlar TEM ve SHV grubu beta-laktamazlarla % 25-27 oranında benzerlik gösterirler (6,54).

2.9.6. İnhibitör dirençli beta-laktamazlar

Bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç göstermeleri üzerine bu antibiyotikler beta-laktamaz inhibitörleri ile birlikte kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle 1987 yılından itibaren idrar yolları enfeksiyonlarına neden olan *E. coli* kökenlerinde klavulanik asit/beta-laktam kombinasyonlarına direnç artışı gözlenmiştir. Bu direnç, TEM enzimlerinin aşırı sentezi, permeabilitede azalma veya OXA tipi enzim sentezleme gibi mekanizmalar ile oluşabilmektedir. GSBL'lerden birkaç aminoasit değişikliğinin meydana gelmesi ile ortaya çıkan bu enzimler, Bush

sınıflamasında 2br grubunda yer alırlar. Beta-laktamaz inhibitörlerine direnç oluşturabilmelerine rağmen, GSBL aktivitesi içermemektedirler. Diğer GSBL sentezleyebilen bakterilerin aksine, bu enzimi içeren bakterilere toplumdan kazanılmış enfeksiyonlarda da rastlanabilmektedir (48).

2.9.7. Diğer GSBL enzimleri

VEB-1 ilk olarak Vietnam'da bir *E. coli* suşunda saptanmıştır. PER-1 ve PER-2 ile yüksek oranda benzerliği mevcuttur. Seftazidim, sefotaksim, aztreonama yüksek oranda direnç gösterir. TLA-1 enzimi Meksika'da bir *E. coli* suşunda saptanmıştır. *Serratia fonticola* kökeninden izole edilen SFO-1 grubu enzimlerin sentezi imipenem tarafından uyarılır. Bu grup enzimler sefamisinleri hidrolize edemez ve klavulanik asit tarafından rahatlıkla inhibe edilebilirler. GES-1 *Proteus mirabilis*'teki karbenisilnaz enzimiyle büyük oranda yapısal benzerlik gösteren enzimlerdir (6,48,55).

2.10. GSBL saptama yöntemleri

Bütün dünyada yaygın olarak kullanılan antibiyotik grubu beta-laktamlara karşı oluşan beta-laktamazlar, bu antibiyotik grubuna karşı oluşan direncin en önemli sebebidir. Bundan dolayı bu beta-laktamazları belirlemek oldukça önemlidir. Bunların saptanması için pek çok yöntem kullanılmaktadır (56).

2.10.1.GSBL tarama testleri

Disk difüzyon ve dilüsyon yöntemleri ile üçüncü kuşak sefalosporinlere veya aztreonama direnç veya azalmış duyarlılığın araştırıldığı bu testlerde sefotaksim, seftriakson, seftazidim, aztreonam veya sefpodoksim kullanılmakta olup sadece *E. coli*, *Klebsiella spp.* ve *Proteus mirabilis* kökenlerinde tarama yapılabilmektedir (57).

2.10.2. Fenotipik doğrulama testleri

2.10.2.1. Sefalosporin-klavulanik asit kombinasyon diskleri

CLSI'nın (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarif ettiği gibi Mueller-Hinton agarda klavulanik asit (10 µg) içeren ve içermeyen sefotaksim (30 µg) veya seftazidim (30 µg) diskleri kullanılarak yapılır. Sefalosporin diski ve

sefalosporin/klavulanik asit diski zon çapları arasında ≥ 5 mm'lik fark olması fenotipik olarak GSBL varlığını gosterir (58).

2.10.2.2. Sıvı (broth) mikrodilüsyon

Klavulanik asit içeren ve içermeyen sefotaksim ve seftazidim Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenir. Klavulanik asit varlığındaki MİK değerlerinde 8 kat azalmanın gorulmesi GSBL pozitifliğini gosterir (6).

2.10.2.3. E-test

GSBL stripleri kullanılarak yapılan bu testte Seftazidim MİK değeri, seftazidim/klavulanik asit MİK değerinin en az 8 katı ise GSBL varlığı gosterilmiş olur (59).

2.10.2.4. GSBL saptanmasında kullanılan diğer fenotipik testler

Teknik olarak diğer testlere gore yapılması daha kolay olan çift disk sinerji testinde Mueller-Hinton agar besiyerinde amoksisilin/klavulanik asit (20 μ g/10 μ g) diski ortaya, seftazidim (30 μ g), seftriakson (30 μ g), sefotaksim (30 μ g) ve aztreonam diskleri ise bu diskin 25 mm uzağına konur. Bu antibiyotiklerin inhibisyon zonlarının amoksisilin/klavulanik asit içeren disk yönünde uzaması sinerji olarak değerlendirilir ve GSBL varlığınının işaretidir. 3 boyutlu test, klavulanik asit eklenmiş Mueller-Hinton agar, disk replasman yöntemi gibi diğer testler rutin olarak yapılması zor olan testlerdir. Ayrıca VITEK, Microscan, BD Phoenix gibi otomatize sistemlerde, bakterinin 3. kuşak sefalosporin ve beta-laktamaz inhibitörü ile kombine edilmiş 3. kuşak sefalosporin MİK değerlerine bakılarak da GSBL saptanabilmektedir (6,51,60).

2.10.3. GSBL saptanmasında moleküler yöntemler

Kullanılan başlıca metodlar oligotiplendirme, PCR (Polymerase Chain Reaction), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), SSCP (Single-Stranded Conformational Polymorphism), LCR (ligase chain reaction) ve nükleotid dizi analizidir.

GSBL'lerin saptanmasında kullanılan ilk moleküler metod oligotiplendirmedir. Yoğun miktarda işgücü ve emeğin gerektiği ve oligonükleotid problemlerinin kullanıldığı bu metotta hibridizasyon sonucu nokta mutasyonlarının saptanması

hedeflenmiştir. Özgün DNA problemleri kullanılarak TEM ve SHV tipi GSBL enzimlerinin saptanmasına çalışılmaktadır. PCR beta-laktamazların belirlenmesi için spesifik beta-laktamaz genlerine özgü oligonükleotid primerleri kullanılarak yapılan ve en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Nükleotid dizi analizi yoğun emek gerektirmesi ve yorumunun zor olmasına rağmen tüm türlerin başarı ile saptanmasında altın standart olan bir metoddur (38,55). İzoelektrik odaklama yöntemi saf bakteriden elde edilen beta-laktamazların poliakrilamid jelde tanımlanabileceği bir yöntemdir. Bu yöntemde göre enzimler, poliakrilamid jel üzerinde elektroforetik olarak oluşan pH gradyentinde izoelektrik noktalarına (pI) odaklanmakta ve kromojenik bir sefalosporin olan nitrosefin kullanılarak görünür hale gelmektedir. Enzimlerin saflaştırılmasına gerek duyulmayan bu yöntemde aynı bakteride bulunan birden fazla beta-laktamaz enziminin belirlenmesi mümkün olmaktadır (61).

2.11. GSBL üreten izolatların yayılımını etkileyen faktörler

Hastanede yatan hastalardan izole edilen GSBL üreten bakteri sayıları toplum kökenli GSBL üreten bakterilere oranla çok daha fazladır. Bu durum öncelikle hastanede yatan hastalar arasındaki GSBL pozitif bakterilerin yayılımını ve kolonizasyonunu etkileyebilecek risk faktörlerini akla getirmektedir. Hastanede kullanılan tıbbi cihazlar bu bakterileri taşıyan önemli bir kaynak olmakla beraber, bu bakteriler hastane personelleri tarafından da hastadan hastaya taşınabilmektedir. Bununla birlikte diğer faktörler; kinolonlar, 3. kuşak sefalosporinler, aminoglikozidler gibi antibiyotiklerin uzun süreli kullanımı, hastanede yatış süresinin uzaması, altta yatan ciddi hastalıklar, yoğun bakım servisinde kalma, hemodiyaliz, damar içi ya da üriner kateter uygulanması ve mekanik ventilasyondur. Hastane kökenli GSBL üreten bakterilerin yayılımını etkileyen bu risk faktörlerinin yanı sıra toplum kökenli GSBL üreten bakterilerin yayılımını etkileyen risk faktörleri de mevcuttur. Bunların başlıcaları; 65 yaş üzeri olma, önceden hastanede kalma hikayesi, diyabetin olması, özellikle gastrointestinal sistem ve üriner sistem operasyonları geçirme, uzun süre florokinolon kullanımı ve sık sık üriner sistem enfeksiyonlarına maruz kalmadır (48,51,62,63).

2.12. Kinolonlar

Kinolonlar 1962 yılında malarya tedavisinde kullanılan klorokinin sentezi sırasında bulunan nalidiksik asitin klinik kullanıma girmesiyle hayatımıza girmiştir. İdrarda yüksek konsanrasyona ulaşabilme özelliklerinden dolayı, üriner sistem enfeksiyonlarının tedavilerinde kullanılmaya başlanan nalidiksik asit, *Enterobacteriaceae* üyesi olan birçok bakteri üzerinde bakterisidal etki göstermiştir. Kimyasal yapı olarak 1. pozisyondaki nitrojen, 3. pozisyondaki karboksil grubu ve 4. pozisyondaki karbona çift bağla bağlanmış oksijenin bulunduğu ikili halkadan oluşan kinolonlar tamamen sentetik yapıda olan ilaçlardır. İlk florokinolon olan norfloksasin kinolon molekülünün C-6 pozisyonuna bir flor atomunun eklenmesiyle aktivitesi artırılarak elde edilmiş ve 1986 yılında klinik kullanıma girmiştir. İlerleyen yıllarda ise kinolonların yapılarına değişik kimyasal gruplar eklenerek daha güçlü ve etkili formları ortaya çıkarılmıştır (64-66). Sadece bazı gram negatif bakteriler üzerinde etki gösterebilen ilk kinolon gurubu antibiyotiklerin aksine, florokinolonlar gram negatif bakterilerin yanısıra gram pozitif ve anaerop bakterilere de etki göstermektedirler (67).

2.12.1. Kinolonların etki mekanizması

Hücre içine pasif difüzyonla veya gram negatiflerin dış membranlarında bulunan porinlerden giren kinolonlar DNA sentezini bozarak etkilerini gösterirler. Gram pozitif bakterilerde genellikle topoizomeraz-4 ilk hedef iken, gram negatif bakterilerde ise bu hedef DNA giraz enzimidir. Bu enzimlere bağlanarak bunların etkilerini inhibe eden kinolonlar bakterisidal etki gösterirler. Bunların dışında kinolonların çok yüksek konsantrasyonda RNA ve protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etki gösterdikleri de bilinmektedir (46,63,68).

2.12.2. Kinolonlara karşı direnç

Özellikle ürolojik enfeksiyonlarda yüksek oranda başarı sağladığı için kinolonların oldukça yaygın kullanılması hem hastane kaynaklı hem de toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarında kinolonlara karşı direnç artışına yol açmıştır (69,70). Bu antibiyotik grubuna karşı oluşan direnç, doğal ya da kazanılmış olabilmektedir. Bakterilerde bulunan enerji bağımlı pompalar kinolonlar, beta-laktamlar ve aminoglikozidler gibi birçok antimikrobiyali hücre dışına atabilmektedir. Bakteride

meydana gelen kromozomal mutasyonların sonucunda kinolonların hedef aldığı DNA giraz ve topoizomerez-4'ün alt birimlerinde değişiklikler meydana gelir. Bunun neticesi olarak, hücre içine giren antibiyotik miktarı azalır. Bakteride sonradan kazanılmış kinolon direncinin çoğunluğu da bu kromozomal mutasyonların neticesinde oluşmaktadır (71-73). Gram negatif bakterilerde oluşan kinolon direncinin çoğunlukla DNA girazın yapı elemanlarından olan gyrA alt ünitesindeki değişimlerden kaynaklandığı, parC ve parE alt ünitelerinde meydana gelen mutasyonların da gyrA alt ünitesindeki mutasyonun varlığında görüldüğü belirtilmiştir. Her üç alt birimde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan kinolon direnci sadece gyrA alt bölgesindeki mutasyon sonucu oluşan kinolon direncine göre çok daha yüksek oranda direnç meydana getirmektedir (72,74). 1998 yılında Amerika'da bir hastadan izole edilen siprofloksasine dirençli *K. pneumoniae* suşunda gösterilene kadar kinolon direncinin plazmidlerle aktarılamadığı düşünülmekteydi. Bu hastadan elde edilen pMG522 plazmidine daha sonra *E. coli* suşunda da rastlanmıştır. Bu plazmiddeki tekrarlayan gen bölgesine qnr ismi verilmiştir. Alt grupları saptanınca qnrB, qnrC, qnrA1 gibi isimler de almıştır. Yapılan çalışmalarda bu plazmidlerin konjugasyonla başka bakterilere aktarılabilirdiği gösterilmiştir (65,73).

2.12.3. Direnç gelişimi için başlıca risk faktörleri

Kinolon direnci için başlıca risk faktörleri olarak; daha önce kinolon kullanımı, hastanede uzun süreli yatış, yoğun bakımda yatma, abdominal bölge ya da üriner sistemle ilgili tıbbi müdahaleye maruz kalma, üriner sistemle ilgili bir hastalığın olması, izole edilen bakterinin GSBL üretmesi ve ileri yaş sayılabilir (72).

2.13. GSBL üreten kinolona dirençli *E. coli* türlerinin klinik önemi

GSBL üreten gram negatif bakteriler başta sepsis, üriner sistem ve solunum sistemi enfeksiyonu olmak üzere pek çok enfeksiyona yol açabilmektedir. GSBL üreten bakteriler ilk kez 1983 yılında Almanya'dan bildirilmiştir. Bu bakterilerin yol açtığı ilk hastane kökenli salgın ise 1985 yılında Fransa'da ortaya çıkmıştır. Geniş spektrumlu beta-laktamların ilk kez Batı Avrupa'da kullanılmaya başlanmasıyla GSBL üreten suşların Batı Avrupa'da ortaya çıkması arasında bir bağ olup olmadığı insanları düşündürmüştür. İlerleyen tarihlerde ise tüm dünyadan pek çok salgın

bildirimi olmuştur. Zamanla GSBL enzimleri bütün dünyada hastane enfeksiyonlarında önemli bir sorun haline gelmiştir. GSBL üreten bakterilerle meydana gelen enfeksiyonların komplikasyon riskinin yüksek olması ciddi bir tehlike arz etmekte olup, GSBL'nin çeşitli türlerdeki bakteriler arasında taşınabilmesi, bu bakterilerin hastanelerde özellikle de yoğun bakımlarda salgınlara yol açabilmelerine neden olmaktadır. GSBL oranının ekonomik seviye ve sağlık hizmetlerindeki kalite ile yakından ilişkili olduğu, bu standartların düşük olduğu ülkelerdeki GSBL oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Dirençli suşların yol açtığı tablolara hastanelere özgü bir durum olarak düşünülse de yapılan çalışmalar toplum kaynaklı enfeksiyonların da bariz bir şekilde artmakta olduğunu göstermektedir (48,75,76).

Ülkemizde 8 hastanenin yoğun bakım ünitesinin dahil edildiği kapsamlı bir çalışmaya göre; bu hastanelerin yoğun bakım ünitelerinden toplanmış 193 gram negatif basilin %58'inde GSBL varlığı saptanmıştır (77). Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapılan başka bir çalışmada Mikrobiyoloji laboratuvarına 2002-2005 yılları arasında gönderilen örneklerden izole edilmiş olan *Enterobacteriaceae* kökenlerinde GSBL sıklığının her geçen yıl giderek arttığı gösterilmiştir (78). Başka bir çalışmada da bakteriyemili hastalardan elde edilen GSBL üreten ve üretmeyen suşların kinolon dirençleri karşılaştırılmış, GSBL üreten suşlarda kinolon direnci %82 GSBL üretmeyen suşlarda ise %29 oranında bulunmuştur (79). Bu çalışma GSBL üreten ve üretmeyen suşlar arasındaki kinolon direnci açısından çarpıcı farkı ortaya koymaktadır. GSBL'nin uygun bir şekilde raporlanmamasından dolayı klinisyenler meselenin öneminin farkında olmamaktadırlar. GSBL üreten bakterilerin yol açtığı enfeksiyonların uygun olmayan antibiyotiklerle tedavi edilmeye çalışılması tedavide başarısızlığa, morbidite ve mortalitede artışa yol açmaktadır (76,80).

2.14. Kontrol ve tedavi seçenekleri

GSBL üreten dirençli bakteriler bir hastadan diğerine hastanede kullanılan her türlü tıbbi malzemelerle ya da sağlık personelleri aracılığıyla taşınabilmektedirler. GSBL üreten bakteriler üretmeyenlere oranla aralarında kinolonlarında yer aldığı pek çok antibiyotiğe daha dirençlidirler. Bu durum antibiyotik seçimi için dar bir saha bırakmaktadır. Bundan dolayı hastanelerde kullanılacak malzemelerin sterilizasyon ve dezenfeksiyonunda büyük bir hassasiyet gösterilmeli, hastane personelinin el

temizliğine çok dikkat edilmelidir. Zira hastalar arası yayılım için bilinen en büyük risk faktörlerinden biri personellerin ellerinin aracılığı ile bakterilerin kişiden kişiye transferidir. El taşıyıcılığı sağlık çalışanlarının ellerini klorheksidin ve alkol bazlı antiseptiklerle yıkamalarıyla engellenebilmektedir. GSBL üreten bir bakterinin saptanmasından sonra bu bakterinin diğer antibiyotiklere karşı direnç durumu belirlenmeli, hastanede bir salgının var olup olmadığı araştırılmalı, eğer salgın var ise kaynak araştırılmalı, ortaya çıkan sonuca göre bir tedavi planlanmalı ve en kısa sürede gereken kontrol önlemleri alınmalıdır. Hastanelerde GSBL oranlarını düşürmek için enfeksiyon kontrol önlemlerine uyulmalıdır. Bunların başlıcaları; antibiyotik kullanımının kontrollü bir şekilde yapılması, meydana gelen dirençlerin izlenmesi ve dirençli suşlar ortaya çıktığı zaman izolasyon önlemlerinin uygulanmasıdır (6,48,51,62).

2.14.1. Tedavide kullanılabilecek başlıca antibiyotikler

2.14.1.1. Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri

Yapılan çeşitli çalışmaların sonucunda beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörlerinin GSBL pozitif mikroorganizmalara karşı etkili olduğu gösterilmiştir. GSBL üreten bakteriler genellikle klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam ile inhibe olurlar. GSBL'lere en etkilileri tazobaktamdır. Buna rağmen mikroorganizmalarda yüksek oranda beta-laktamaz yapımı, özellikle de inhibitör dirençli beta-laktamazların varlığı veya porin defekti olması gibi durumlarda etki göstermeyebilirler. Bunların aminoglikozitlerle birlikte kullanımları ciddi enfeksiyonlarda tedavi başarısını artırabilir (31).

2.14.1.1.1. Aminoglikozidler: GSBL üreten bakteriler sıklıkla aminoglikozidlere direnç gösterebilmekle beraber, duyarlılık durumuna göre GSBL üreten mikroorganizmaların yol açtıkları enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilirler (31,81).

2.14.1.1.2. Karbapenemler: Karbapenemler GSBL pozitif mikroorganizmalarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde tek başlarına kullanılabilen ilk seçenek antibiyotiklerdir (53).

2.14.1.1.3. Üçüncü kuşak sefalosporinler: Özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinin GSBL üreten kökenlerinde sıklıkla karbapenem gurubu ilaçların kullanılması sonucu oluşabilecek ciddi direnç sorunlarını engellemek amacı ile CLSI'da yeni sınır

değerleri belirlenmiş, GSBL pozitif suş eğer sefalosporinlere duyarlı ise sonucun duyarlı olarak verilmesi önerilmiştir (58).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bakteri Kökenleri

Çalışmaya Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Ocak 2010-Temmuz 2012 tarihleri arasında gönderilen poliklinik ve servis hastalarına ait idrar kültürlerinden soyutlanan, GSBL üreten ve kinolona dirençli 96 *E. coli* izolatu dahil edildi. Çalışmada kullandığımız tüm izolatlar farklı hastalardan izole edildi. İzole edilen suşlar çalışılncaya kadar %20 gliserin içeren TSB (Tryptic Soy Broth) (Merck, Almanya) besiyerine konularak -70°C'de saklandı.

3.2. Bakterilerin Seçimi

Enfeksiyon şüphesi ile laboratuvarımıza gönderilen idrar örneklerinin kültür için kanlı agara (BioMérieux, Fransa) ve EMB agara (Biomeri  x, Fransa) ekimleri yapıldı.Kültürler 37°C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra üreme saptanan gram negatif bakterilere ait tür tayini için çeşitli fenotipik testler uygulandı. *E. coli* izolatları oksidaz enziminin olmaması, sitratı kullanamaması, indol   retebilmesi, glukozu, laktoz ve s  krozu fermente etmesi, lizin dekarboksilaz enziminin varlığı, üreaz enziminin olmaması, metil kırmızısı reaksiyonunun pozitif, Voges-Proskauer reaksiyonunun negatif olması, hareketli olması ve EMB agarda oluşturduğu kendine has yeşil metalik refle veren koloni görünümü gibi özelliklere göre tanımlandı.

Őüphede kalınan durumlarda tanımlama işlemi VITEK 2 (BioM  rieux, Fransa) otomatize sistemi ile doğrulandı.

3.3. Kinolon direncinin saptanması

Kinolon direnci Siprofloksasin (5 µg) (Oxoid, İngiltere) diski kullanılarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı ve sonuçlar CLSI kriterlerine göre değerlendirildi (58).

3.4. GSBL varlığının çift disk sinerji testi ile saptanması

Kültürde üremiş bakteri kolonilerinden steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığında inokulum hazırlandı. Oluşan bu süspansiyon steril eküvyon yardımıyla Mueller-Hinton agar (Oxoid, İngiltere) yüzeyine yayıldı. Merkeze amoksisilin-klavulanik asit diski (10 µg) (Oxoid, İngiltere); çevresine sefotaksim (30 µg) (Oxoid, İngiltere), seftazidim (30 µg) (Oxoid, İngiltere), seftriakson (30 µg) (Oxoid, İngiltere), sefepim (10 µg) (Oxoid, İngiltere) diskleri merkezden 25 mm uzaklıkta olacak şekilde yerleştirildi. Hazırlanan plaklar 37°C'de 18-20 saat inkübasyonunun sonunda sefepim, sefotaksim, seftriakson, seftazidime ait inhibisyon zonlarının klavulanik asit diski karşısında bozularak genişlemesi, arada hayali bir zon oluşması ya da iki inhibisyon zonu arasındaki bakteri üreyen alanda üreme olmayan bir bölgenin oluşması durumunda o izolatin GSBL enzimi ürettiğine karar verildi. Çalışmamızda GSBL üretimi için pozitif kontrol olarak *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşu, negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

3.5. Enfeksiyonun kökeninin belirlenmesi

Bu izolatlarla bağlı oluşan enfeksiyonlar, hastalara ait kayıtlar incelenerek CDC (Centers for Disease Control) kriterlerine göre hastane veya toplum kökenli olarak sınıflandırıldı. Enfeksiyon hastanın hastaneye yatışından 72 saat geçtikten sonra veya taburcu edildikten sonra ilk 10 gün içinde meydana gelmişse hastane kaynaklı değilse toplum kaynaklı enfeksiyon olarak değerlendirildi (82).

3.6. Risk faktörlerinin araştırılması

Hastalara ait kayıtlar incelenerek GSBL üreten *E. coli* ile enfeksiyona yatkınlık oluşturabilecek risk faktörleri kaydedildi. Bunlar;

- 65 yaşından büyük olma,
- Malign bir hastalığın olması,

- Kardiyovasküler hastalığın olması,
- Diyabet tanısının olması,
- Üriner hastalık ya da anomali varlığı (Benign prostat hiperplazisi (BPH), Veziköüreteral reflü (VUR), Üreterovezikal (UV) darlık, böbrek taşı, nörojenik mesane v.s),
- Üriner veya herhangi bir cerrahi girişim öyküsü,
- Üriner kateter varlığı
- Son 6 ay içinde hastanede yatış hikayesi,
- Steroid kullanımı
- Ciddi travma öyküsünün olması,
- Son 6 ayda kinolon veya beta-laktam grubu antibiyotik kullanımının olması,
- Serebrovasküler hastalık varlığı,
- Böbrek yetmezliği,
- Son bir yılda 3 ve daha fazla üriner sistem enfeksiyonu geçirme hikayesi.

3.7. Bakteriler arasındaki klonal yakınlığın belirlenmesi

GSBL üreten ve kinolona dirençli olan 96 *E. coli* suşunun genetik yakınlıklarının belirlenmesi için rep-PCR (Diversilab, BioMérieux, Fransa) yöntemi kullanıldı.

3.7.1. Rep-PCR yönteminin uygulanması

Çalışmaya başlamadan önce -70°C 'de saklanan *E. coli* suşlarını canlandırmak amacıyla kanlı ve EMB agara tek koloni pasajları yapılarak etüvde 37°C 'de 18-24 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra koloniler ikinci kez pasaj edilerek 24 saat inkübasyon sağlandı. Bu pasajlardan sonra elde edilen saf *E. coli* izolatları klonal yakınlığın saptanması için Rep-PCR yöntemi ile 4 basamakta genotiplendirildi.

3.7.1.1. DNA ekstraksiyonu

Üretici firmanın prosedürlerine uygun olarak bütün suşların DNA ekstraksiyonları için UltraClean™ Microbial DNA izolasyon kiti (MO-BIO, ABD) kullanılarak aşağıdaki adımlarda gerçekleştirildi.

1. İzolat sayısı kadar Microbial DNA kumlu tüp hazırlanıp numaralandırıldı ve kumlu tüplerin her birine 300 µL Microbial DNA Bead solüsyonu otomatik pipet ile dağıtıldı.
2. Bakteri kolonilerden (yaklaşık 2 µL) kumlu tüplere öze yardımı ile aktarıldı ve üzerine 50 µL Microbial DNA MD1 solüsyonu ilave edildi.
3. Karışım 10 dk boyunca maksimum hızda vortekslendikten sonra 30 saniye 10.000 x g'de santrifüj edildi.
4. Elde edilen süpernatant dikkatli bir şekilde alınıp 100 µL Microbial DNA MD2 solüsyonu içeren ependorf tüplere aktarıldı ve 5 sn vortekslendi.
5. Sonra tüpler +4°C'de yaklaşık 15-20 dk bekletildikten sonra örnekler 1 dk 10.000 x g'de santrifüj edildi ve 200 µL süpernatant 450 µL Microbial DNA MD3 solüsyonu içeren ependorf tüplere aktarıldı.
6. Kısa bir süre vortekslendikten sonra 30 sn 10.000 x g'de santrifüj edildi.
7. Elde edilen 650 µL süpernatant 2 mL'lik Microbial DNA filtreli tüplere aktarıldı ve 30 sn 10.000 x g'de santrifüj edildikten sonra filtreden aşağıya akan sıvı atık kabına atıldı
8. Üzerine 300 µL Microbial DNA MD4 solüsyonu filtreli tüplere ilave edildi.
9. Bundan sonra 30 sn 10.000 x g'de santrifüj edildi ve filtreden aşağı akan sıvı atık kabına atıldı.
10. Filtreli tüpler 1 dk kuru olarak 10.000 x g'de santrifüj edildikten sonra filtreler 2 mL'lik Microbial DNA toplama tüplerine yerleştirildi ve üzerine 35 µL Microbial DNA MD5 solüsyonu ilave edildi.
11. İki dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra 30 sn 10.000 x g'de santrifüj edildi. Daha sonra filtreler çıkartılıp atıldı ve toplama tüplerinde kalan örnek DNA ekstraktı olarak elde edilmiş oldu.

3.7.1.2. DNA yoğunluğunun belirlenmesi

Nanodrop cihazına (Thermo scientific NANODROP 2000, ABD) 1 µL DNA pipetlenerek DNA yoğunlukları tespit edildi. Beş µL sabit hacimde DNA kullanılarak 35ng/mL DNA yoğunluğu verecek şekilde dilüsyon oranını hesapladı. DNase, RNase free steril distile su ile istenilen oranda DNA'lar dilüe edildi. 25ng/mL'nin altında DNA yoğunluğu bulunan örnekler çalışma dışı bırakıldı.

3.7.1.3. Diversilab parmakizi kiti (fingerprinting kit) kullanılarak rep-PCR uygulanması

Amplifikasyon için Diversilab™ DNA parmakizi kiti (Biomeri ux, Fransa) derin dondurucudan çıkarıldı ve 13 örnek için iki hata payı olacak Şekilde master miks hazırlandı (Tablo 1).

Tablo 1. DNA parmakizi kiti master miks (13 suş için)

| Miktar ( L/reaksiyon) | DNA Parmak izi kitinin bileŐenleri | 13+2 örnek için Toplam ( L) |
|-----------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| 18.0 | rep-PCR MM1 | 270.0 |
| 2.5 | GeneAmp 10X PCR buffer | 37.5 |
| 2.0 | Primer Mix | 30.0 |
| 0.5 | AmpliTaq DNA Polymerase | 7.5 |
| | | 345.0 |

HazırlanmıŐ olan master miksten 200  L'lik eppendorf tüplerine 23'er  L dağıtıldı. Daha sonra izolatlardan elde edilen DNA ekstraktlarından 2  L eppendorf tüplerine kondu. Tüplerin ağzı kapatılarak örneklerdeki nükleik asitler PCR cihazında (Eppendorf, Almanya)  oğaltıldı. Amplifikasyon işlemi 94 C'de 2 dk ilk denatürasyondan sonra, 94 C'de 94 sn denatürasyon, 50 C'de 30 sn yapışma ve 70 C'de 90 sn uzama olmak üzere 35 siklus olarak gerçekleştirildi. Daha sonra 72 C'de 7 dk son uzama ile iŐlem sonlandırıldı (Tablo 2).

Tablo 2. PCR siklusları

| Adım | Sıcaklık ( C) | Zaman (saniye) |
|------------------|---------------|----------------|
| İlk denatürasyon | 94 | 120 |
| Denatürasyon | 94 | 94 |
| Yapışma | 50 | 30 |
| Uzama | 70 | 90 |
| Son uzama | 70 | 180 |
| Bekleme | 4 |   |

3.7.1.4. Biyoanalizör kullanılarak otomatik mikroakışkan elektroforez

Rep-PCR yapılarak örneklerdeki nükleik asitler çoğaltıldıktan sonra Diversilab™ DNA LabChip kiti (BioMeri  ux, Fransa) kullanılarak mikroakışkan elektroforez yapıldı.

Testin yapılışı;

1. Steril ependorf t  pleri içerisinde 200 μ L jel matriksi ile 10 μ L jel boyası karıştırlılıp vortekslendi ve kısa bir süre santrifüj edildi.
2. Karışım filtreli tüpe aktarılıp 10 dk 1500 x g'de santrifüj edildi.
3. Diversilab™ DNA LabChip   zerindeki siyah daire içerisindeki 'G' kuyucuğuna jel-boya karışımından 9 μ L kondu.
4. DNA LabChip yükleme istasyonuna alınarak şıringa pistonu 1 mL   zgisine kadar   kilip pozitif basınçla yüklendikten sonra 30 sn beklendi.
5. İstasyon kapağı a  ılarak şıringa pistonu dengeye gelinceye kadar beklendikten sonra DNA LabChip   zerindeki diğer iki 'G' kuyucuğunun her birine 9 μ L jel karışımı kondu.
6. DNA izolatlarının koyulacağı kuyucuklara 5 μ L marker pipetlendi. Rep-PCR ile elde edilen DNA ekstraktlarından 1 μ L bu kuyucuklara ilave edildi.
7. Daha sonra DNA LabChip karıştırtıcıya yerleştirilip 2200 x g'de bir dk. vortekslendikten sonra DNA LabChip, Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, ABD) cihazına yüklendi.

Tüm izolatların rep-PCR tabanlı parmak izi kalıpları DiversiLab'ın 3.4 versiyonlu internet tabanlı yorumlama ve yazılım programı kullanılarak jel benzeri görüntüler elde edildi. Değerlendirme için benzerlik hesaplarının yapılmasında DiversiLab yazılımı Pearson korelasyon kat sayısı ve UPGMA (Unweighted Pairwise Grouping Mathematical Avenaging); matematiksel ortalamayla ağırlıksız çiftlerin gruplandırılması yöntemi, rep-PCR profillerini otomatik olarak karşılaştırmak amacıyla kullanıldı. İzolatlar ayırt edilemez (benzerlik >95 , hiçbir band farkı yok ya da en fazla 1 band farkı), benzer (benzerlik $90-95$ arasında, 1-2 band farkı) ve farklı (benzerlik <90 ve ≥ 3 band farkı) olarak sınıflandırıldı. Birbirleriyle 90 'ın üzerinde benzeyen izolatlar ana klon olarak kabul edildi. Benzerlik oranları 90 'ın altında olan izolatlar ise farklı klon olarak değerlendirildi.

3.7.1.5 . Rep-PCR işlemi için kullanılan kitlerin içerikleri

-UltraClean™ Microbial DNA ekstraksiyon kiti (MO-BIO, ABD)

Microbial DNA kumlu tüp

Microbial DNA Bead solüsyonu

Microbial DNA MD1 solüsyonu

Microbial DNA MD2 solüsyonu

Microbial DNA MD3 solüsyonu

Microbial DNA MD4 solüsyonu

Microbial DNA MD5 solüsyonu

Microbial DNA filtreli tüp (2 mL'lik)

Microbial DNA toplama tüpü (2 mL'lik)

-DiversiLab parmakizi kiti (Biomeri  ux, Fransa)

rep-PCR MM1

Primer Mix

AmpliTaq DNA polymerase,

10X PCR Buffer (Applied Biosystems Roche)

- Diversilab™ DNA LabChip kiti (Biomeri  ux, Fransa)

Chip reaktifleri

Marker

Jel boyası

Jel matriksi

4. BULGULAR

Çalışmadaki izolatların elde edildiği hastaların yaş ortalaması 56.18 ± 23.6 olarak bulunmuştur. Bunların 33'ünün (%34.37) erkek, 63'ünün (%65.63) kadın ve 9'unun (%9.38) çocuk, 87'sinin (%90.62) erişkin olduğu belirlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Hastaların karakteristik özellikleri

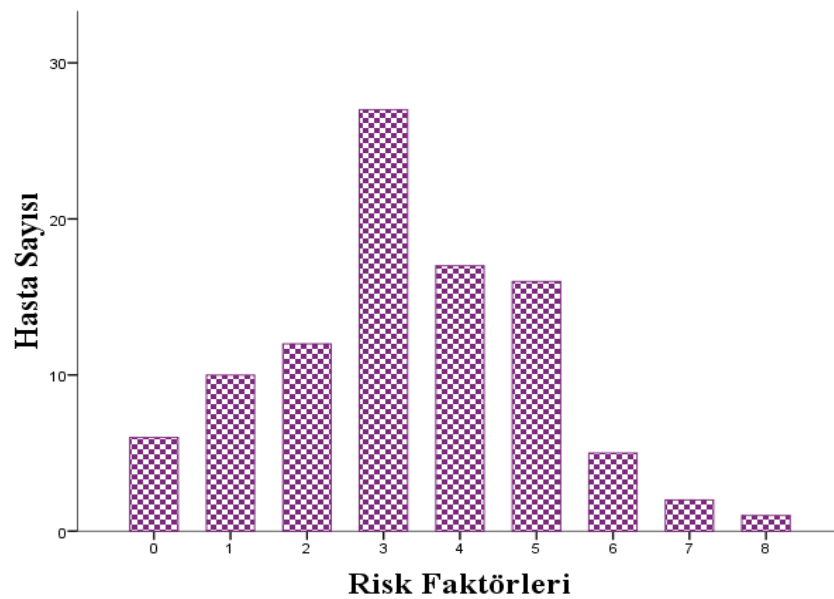
| Hastalar | n | % |
|----------------------------|------------------|-------|
| Yaş ortalaması (\pm SD) | 56.18 \pm 23.6 | |
| Cinsiyet | | |
| Erkek | 33 | 34.37 |
| Kadın | 63 | 65.63 |
| Erişkin/Çocuk | | |
| Erişkin | 87 | 90.62 |
| Çocuk | 9 | 9.38 |

Çalışmaya dahil edilen izolatların elde edildiği örneklerin 54'ünün (%56.24) dahili ünitelerden, 42'sinin (% 43.76) ise cerrahi bölümlerden geldiği belirlenmiştir. İzolatların geldiği birimlere göre oranları Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. İzolatların elde edildiği ünitelere göre dağılımı

| Klinikler | n | % |
|-------------------------|----------|----------|
| Dahili bölümler | | |
| Servis | 31 | 32.29 |
| Poliklinik | 12 | 12.50 |
| Yoğun bakım ünitesi | 11 | 11.46 |
| Cerrahi bölümler | | |
| Servis | 16 | 16.67 |
| Poliklinik | 23 | 23.96 |
| Yoğun bakım ünitesi | 3 | 3.12 |

Çalışılan kökenlerin 52'sinin (%54.17) hastane kökenli, 44'ünün ise (%45.83) toplum kökenli enfeksiyonlardan soyutlandığı saptanmıştır. GSBL üreten *E. coli* ile enfeksiyon geçirmek için risk faktörleri varlığı incelenmiş 6 (%6.25) hastanın hiçbir risk faktörü taşımadığı bulunmuş olup, 90 (%93.75) hastada da ise 1-8 arasında değişen risk faktörünün mevcut olduğu ve ortalama risk faktörü sayısının 3 olduğu bulunmuştur. En fazla rastlanan risk faktörünün son 6 ayda hastanede yatış öyküsünün olduğu ve bunun 65 (%67.70) hastada mevcut olduğu belirlenmiştir. Risk faktörlerinin hastalara göre dağılımı Tablo 5'de ve kaç hastanın ne kadar risk faktörüne sahip olduğu Şekil 1'de gösterilmiştir.



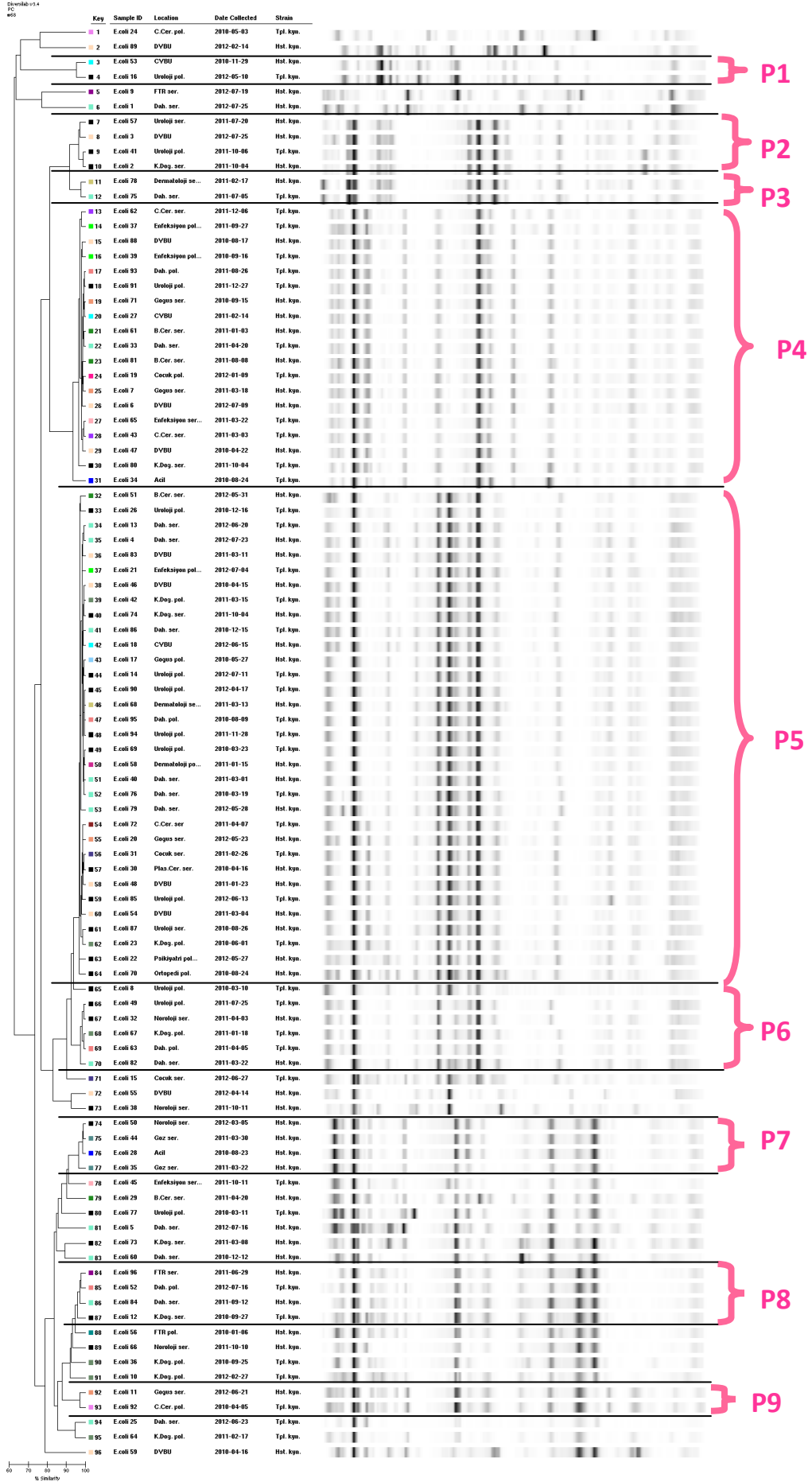
Şekil 1. Hasta sayısının risk faktörü sayısına göre değerlendirilmesi

Tablo 5. Hastalarda mevcut olan risk faktörleri

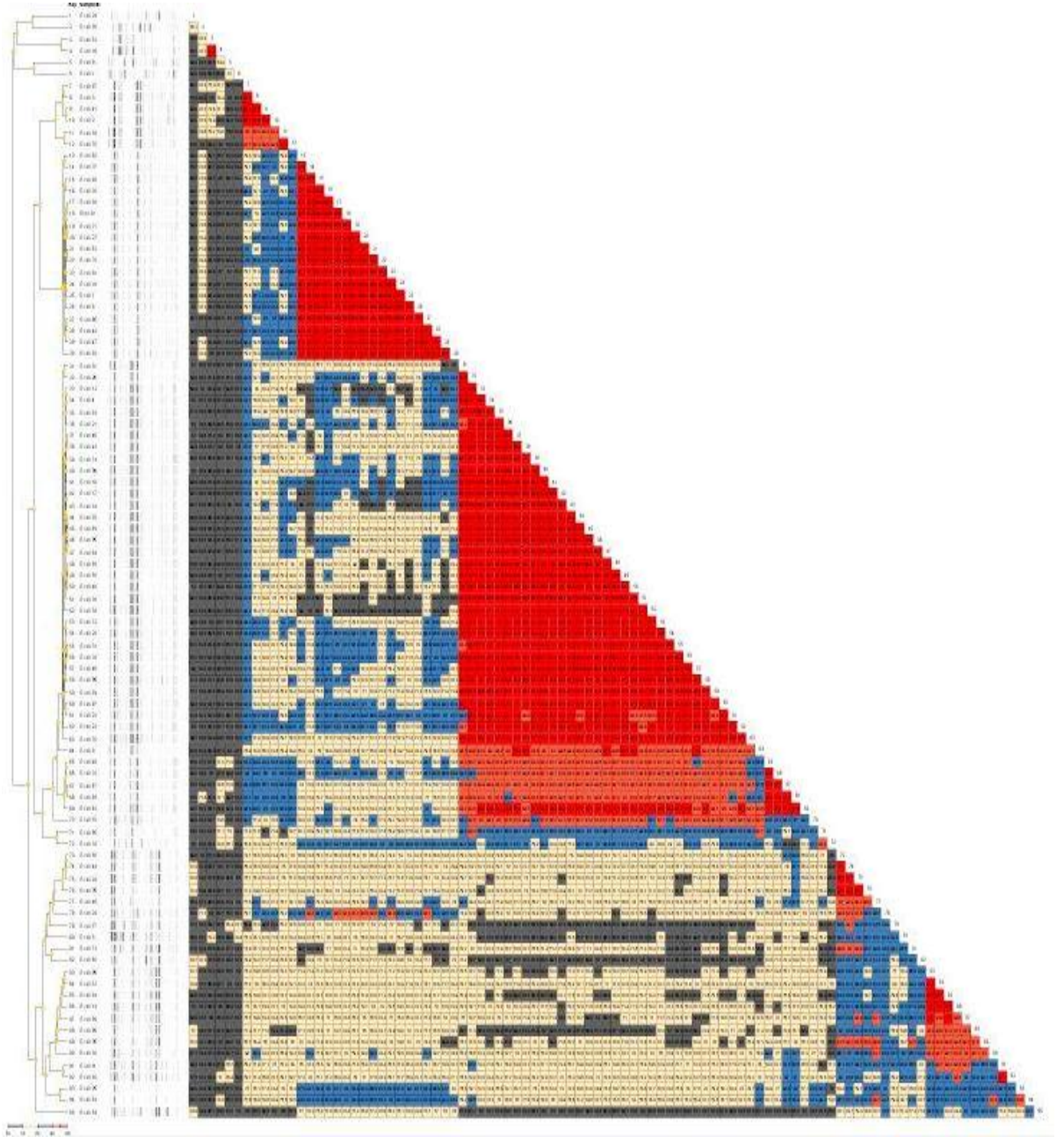
| Risk Faktörleri | n | % |
|------------------------------------|----------|----------|
| 65 yaş üzeri olma | 38 | 39.58 |
| Üriner anomali | 17 | 17.70 |
| Serebrovasküler hastalıklar | 18 | 18.75 |
| Kardiyolojik hastalıklar | 21 | 21.87 |
| Malign hastalıklar | 16 | 16.66 |
| Tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu | 7 | 7.29 |
| Böbrek yetmezliği | 10 | 10.41 |
| Diyabetes mellitus | 16 | 16.66 |
| Üriner bölgeye cerrahi girişim | 10 | 10.41 |
| Son 6 ayda hastanede yatış | 65 | 67.70 |
| Son 6 ayda antibiyotik kullanımı | 58 | 60.41 |
| Steroid kullanımı öyküsü | 13 | 13.54 |
| Geçirilmiş operasyon öyküsü | 23 | 23.95 |
| Travma öyküsü | 3 | 3.12 |

İzolatlar arasındaki klonal yakınlığın araştırılması

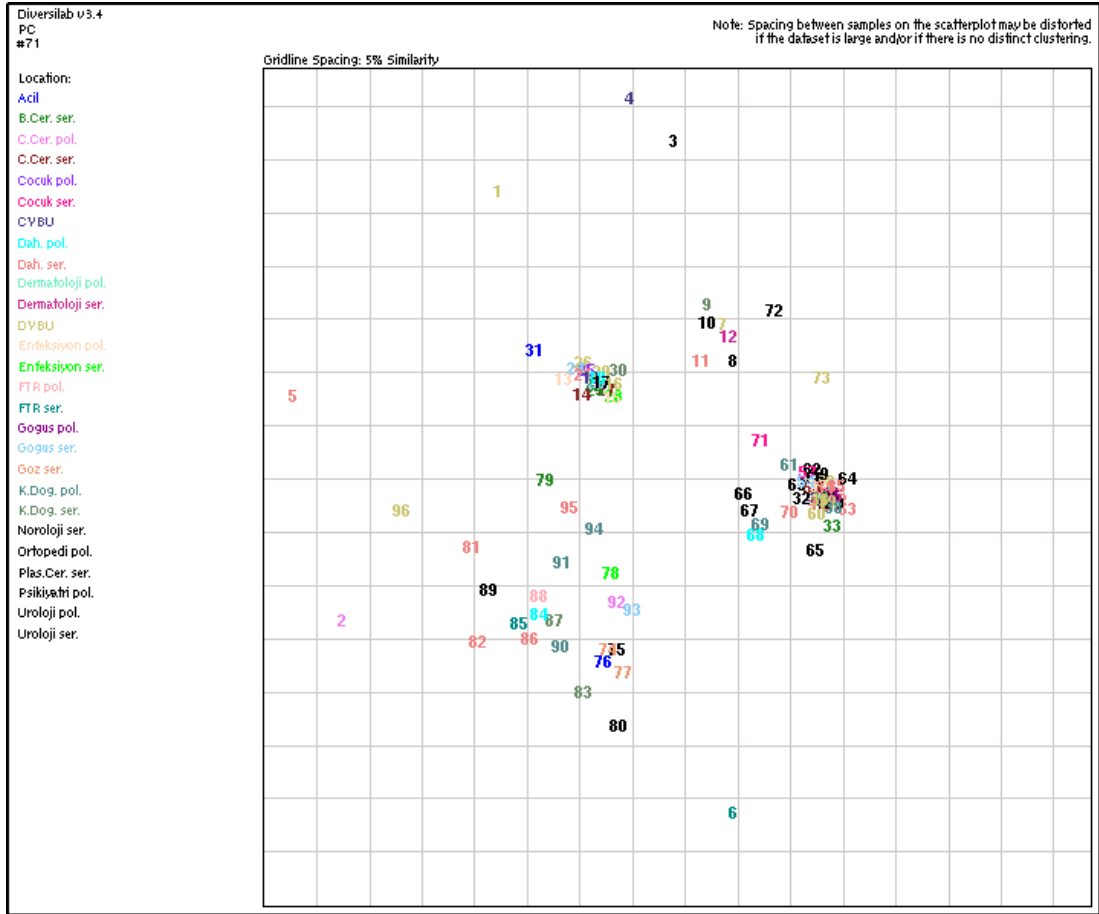
Çalışmaya alınan toplam 96 GSBL üreten, kinolona dirençli *E. coli* izolatının klonal ilişkisinin belirlenmesi için rep-PCR (Biomerieux, Fransa) yöntemi kullanılmıştır. Her bir izolat için dendrogram raporu, jel benzeri görüntü ve yüzde benzerlik oranları oluşturulmuştur. Çalışmamızda 9 (P1-P9) ana klon saptanmıştır. Yirmi izolat sporadik vaka olarak değerlendirilmiştir. Tüm kökenlere ait dendrogram ve jel benzeri görüntü Şekil 2’de, izolatların otomatik oluşturulan yüzde benzerlik matrisi Şekil 3’de ve kökenlerin tümüne ait noktalama grafiği Şekil 4’de gösterilmiştir.



Şekil 2. *E. coli* kökenlerine ait dendrogram ve jel benzeri görüntü



Şekil 3. Tüm *E. coli* izolatlarına ait yüzde benzerlik matrisi



Şekil 4. Tüm izolatların orijinlerine ait noktalama grafiği

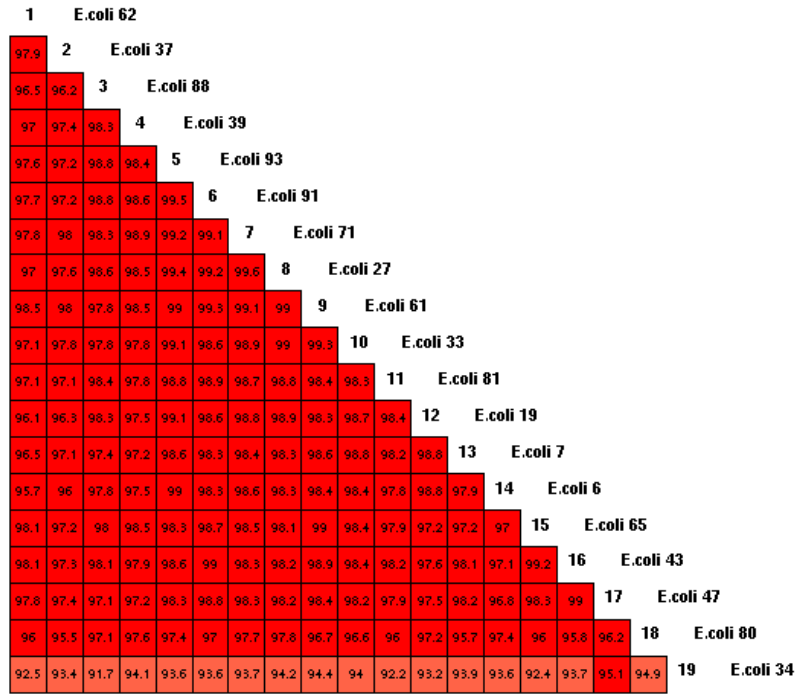
Çalışmamızda yer alan izolatların Diversilab rep-PCR yöntemi ile 2'sinin (%2.1) P1 klonuna ait olduğu bulunmuştur. Bu klona ait ilk suş Kasım 2010 tarihinde Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi'nde (CYBÜ) yatan bir hastadan izole edilmiştir. Son suş ise Mayıs 2012 tarihinde üroloji polikliniğine gelen bir hastadan izole edilmiştir. Bu klondaki 1 (%50) suş poliklinik 1 (%50) suş servis hastalarından izole edilmiştir. Bu klondaki izolatların 1'i hastane kökenli diğeri toplum kökenli enfeksiyon etkeni olarak saptanmış olup toplum kökenli olan izolataın elde edildiği hastanın GSBL üreten *E.coli* ile enfeksiyon geçirebilmek için 1 risk faktörüne sahip olduğu bulunmuş ve izolatlar birbirleri ile ilişkilendirilememiştir.

P2 klonunda 4 (%4.2) izolat olduğu belirlenmiştir. Bu klona ait ilk suş Temmuz 2011 tarihinde üroloji servisinde yatan bir hastadan izole edilmiştir. Son suş ise Temmuz 2012 tarihinde Dahili Yoğun Bakım Ünitesi'nde (DYBÜ) yatan bir hastadan izole edilmiştir. Bu klondaki 1 suş (%25) poliklinik 3 suş (%75) servis hastalarından izole edilmiştir. Bu klondaki izolatların 3'ü (%75) hastane kökenli 1'i (%25) toplum kökenli enfeksiyon etkeni olarak belirlenmiştir. Toplum kökenli olan izolataın alındığı hastanın GSBL pozitif *E. coli* ile enfeksiyon geçirebilmek için 2 risk faktörüne sahip

olması bu hastanında son 6 ayda hastanede yatmış olması, bu kökenin hastane ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

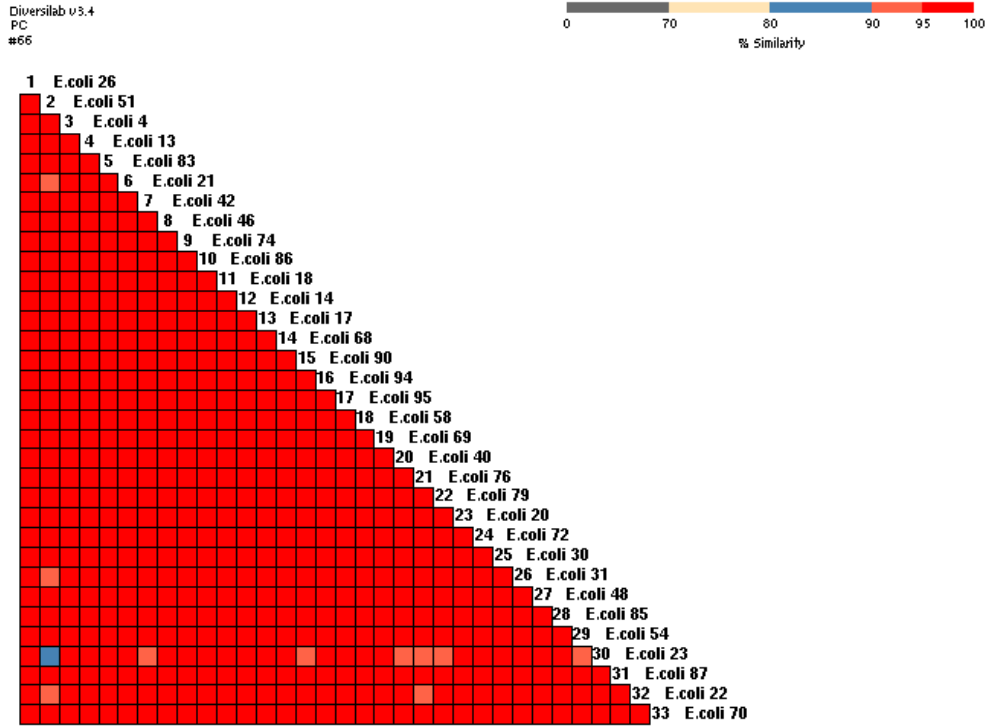
Kökenlerin 2'sinin (%2.1) P3 klonuna ait olduğu bulunmuştur. Bu klona ait ilk suş Şubat 2011 tarihinde dermatoloji servisinde yatan bir hastadan izole edilmiştir. Son suş ise Temmuz 2011 tarihinde dahiliye sevisinde yatan bir hastadan izole edilmiştir. Bu klondaki her 2 suşta servis hastalarından elde edilmiştir. P3 klonundaki izolatların 1'i (%50) hastane kökenli diğeri (%50) toplum kökenli enfeksiyon etkeni olarak belirlenmiş olup toplum kökenli olan izolatın elde edildiği hastanın GSBL üreten *E. coli* ile enfeksiyon geçirebilmek için 3 risk faktörüne sahip olması, son 6 ayda hastanede yatmış olması ve malignite varlığının olması, bu kökeninde hastane ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

P4 klonunda 19 (%19.79) izolatın yer aldığı görülmüştür. Bu klona ait ilk suş Nisan 2010 tarihinde dahiliye servisinde yatan bir hastadan izole edilmiştir. Son suş ise Temmuz 2012 tarihinde DYBÜ'nde yatan bir hastadan izole edilmiştir. Bu klondaki 6 suş (%31.57) poliklinik 13 suş (%68.43) servis hastalarından izole edilmiştir. P4 klonundaki izolatların 8'i (%42.10) hastane kökenli 11'inin (%57.90) toplum kökenli enfeksiyon olarak belirlenmiştir. Toplum kökenli olan izolatların elde edildiği hastaların GSBL üreten *E. coli* ile enfeksiyon geçirebilmek için ortalama 3 risk faktörüne sahip olduğu saptanmıştır. Üç hastada enfeksiyon etkeninin hastane ile ilişkili olabileceğine dair bir risk faktörü bulunamamış olup geri kalan ve toplum kökenli enfeksiyon etkeni olarak saptanan hastaların son 6 ayda hastanede yatmış olması, üriner bölgeye cerrahi girişim olması üriner anomalinin varlığı ve sürekli takibi yapılan kronik hastalıkların varlığı gibi risk faktörlerinin mevcut olması bu kökenlerin hastane ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. P4 klonuna ait izolatların yüzde benzerlik matrisi Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 5: P4 klonuna izolatların yüzde benzerlik matrisi

Çalışmamızın hakim klonu P5 olarak bulunmuş olup, bu klona ait 33 (%35.8) izolatın yer aldığı saptanmıştır. Bu klona ait ilk suş Mart 2010 tarihinde dahiliye servisinde yatan bir hastadan izole edilmiştir. Son suş ise Temmuz 2012 tarihinde dahiliye servisinde yatan bir hastadan izole edilmiştir. Bu klondaki 14 suş (%42.42) poliklinik 19 suş (%57.58) servis hastalarından izole edilmiştir. P5 klonundaki izolatların 18'i (%54.54) hastane kökenli 15'i (%45.46) toplum kökenli enfeksiyon olarak saptanmış olup toplum kökenli olan izolatların alındığı hastaların GSBL üreten *E.coli* ile enfeksiyon geçirebilmek için ortalama 2 risk faktörüne sahip olduğu saptanmıştır. Bu hastaların 10'unda (%66.66) son 6 ayda hastanede yatmış olma, cerrahi girişim olması, üriner anomalinin varlığı ve sürekli takibi yapılan kronik hastalıkların varlığı gibi risk faktörlerinin mevcut olması bu kökenlerin hastane ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Geri kalan 5 hastada (%33.34) ise enfeksiyon etkeninin hastane ile ilişkili olabileceğine dair herhangi bir risk faktörü belirlenememiştir. P5 klonu izolatlarına ait suşların yüzde benzerlik matrisi Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6: P5 klonuna ait yüzde benzerlik matrisi.

P6 klonuna ait 6 (%6.25) köken bulunmuş olup, bu klona ait ilk suş Mart 2010 tarihinde üroloji polikliniğine gelen bir hastadan izole edilmiştir. Son suş ise Temmuz 2011 tarihinde üroloji polikliniğine gelen bir hastadan izole edilmiştir. Bu klondaki 4 suş (%66.66) poliklinik, 2 suş (%33.34) servis hastalarından izole edilmiştir. P6 klonundaki izolatların 2'sinin (%33.34) hastane kökenli 4'ünün (%66.66) toplum kökenli enfeksiyon etkeni olduğu saptanmış olup toplum kökenli olan izolatların alındığı hastaların GSBL üreten *E.coli* ile enfeksiyon geçirebilmek için ortalama 4 risk faktörüne sahip olması bu hastalardan 3'ünün (%75) son 6 ayda hastanede yatmış olması bu kökenlerin hastane ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Diğer 1 hasta (%25) ise ilişkilendirilememiştir.

P7 klonu içerisinde 4 (%4.2) köken saptanmıştır. Bu klona ait ilk suş Ağustos 2010 tarihinde acil polikliniğine gelen bir hastadan izole edilmiştir. Son suş ise Mart 2012 tarihinde nöroloji servisine gelen bir hastadan izole edilmiştir. Bu klondaki 1 suş (%25) poliklinik 3 suş (%75) servis hastalarından izole edilmiştir. P7 klonundaki izolatların hepsinin hastane kökenli enfeksiyon etkeni olduğu belirlenmiştir.

P8 klonuna ait 4 (%4.2) izolat olduğu saptanmıştır. Bu klona ait ilk suş Eylül 2010 tarihinde kadın hastalıkları ve doğum servisinden gelen bir hastadan izole edilmiştir.

Son suş ise Temmuz 2012 tarihinde dahiliye polikliniğine gelen bir hastadan izole edilmiştir. Bu klondaki 2 suş (%50) poliklinik 2 suş (%50) servis hastalarından izole edilmiş olup P8 klonundaki izolatların 2'sinin (%50) hastane kökenli diğer 2'sinin (%50) toplum kökenli enfeksiyon etkeni olduğu saptanmıştır. Toplum kökenli olan izolatların alındığı hastaların GSBL üreten *E. coli* ile enfeksiyon geçirebilmek için ortalama 5.5 risk faktörüne sahip olması ve bu hastaların her ikisinin de son 6 ayda hastanede yatmış olması, bu kökenlerin hastane ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

P9 klonuna 2 (%2.1) izolatın dahil olduğu bulunmuştur. Bu klona ait ilk suş 5 Nisan 2010 tarihinde çocuk cerrahisi polikliniğine gelen bir hastadan izole edilmiştir. Son suş ise Haziran 2012 tarihinde göğüs hastalıkları servisinden yatan bir hastadan izole edilmiştir. Bu klondaki 1 suş (%50) poliklinik 1 suş (%50) servis hastasından izole edilmiştir. CDC kriterlerine göre P9 klonundaki izolatların 1'inin hastane kökenli 1'inin toplum kökenli enfeksiyon etkeni olduğu saptanmış olup toplum kökenli olan izolatların alındığı hastaların GSBL üreten *E. coli* ile enfeksiyon geçirebilmek için ortalama 5.5 risk faktörüne sahip olaması ve üriner bölgeye cerrahi girişimde bulunmuş olması bu kökenlerin hastane ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmada yer alan 20 (%21.1) köken ise sporodik vaka olarak değerlendirilmiştir.

5. TARTIŞMA

E. coli bir çok enfeksiyonda sıklıkla etken olup, meydana getirdiği enfeksiyonların tedavisinde genellikle beta-laktam grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Bu antibiyotiklere karşı gittikçe artan oranda direnç görülmesi, tedavide ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Beta-laktam antibiyotikler günümüzde sayıları bir hayli fazla olan beta-laktamazlar tarafından hidroliz edilerek inaktif hale getirilebilmektedir. Özellikle de beta-laktamaz grubu içerisinde yer alan GSBL'lerin üretimi, pek çok antibiyotiğin tedavide kullanımını sınırlandırmakta ve prognozu olumsuz etkilemektedir (3,83,84).

Dünyada ilk kez 1983 yılında ortaya çıktığı bilinen GSBL sentezleyen izolatlar, daha sonra dünyanın birçok ülkesinden bildirilmiştir (85,86). GSBL üretimi özellikle *E. coli* ve *Klebsiella* spp. kökenlerinde görülmektedir. Uygunsuz antibiyotik kullanımı ve hastanelerdeki kolay yayılım ile tüm dünyada hızla artan GSBL sıklığı, geniş spektrumlu sefalosporinlerin yoğun kullanıldığı hastanelerde daha fazla görülmektedir (87-89).

GSBL üreten *E. coli* suşları ile meydana gelen enfeksiyonların oranı farklılık göstermektedir (6,90-92). GSBL sıklığını gösteren çalışmalardaki farklı sonuçların başlıca sebebi çeşitli bölgelerde farklı hasta sayıları, grupları ve örneklerinin olması, hastaların farklı sosyoekonomik duruma sahip olmaları ve çalışmaların yapıldığı bölgelerdeki antibiyotik kullanım politikaları arasındaki farklılıklar olarak düşünülmektedir.

Hem dünyada hem de ülkemizde GSBL ve antibiyotik direnç oranlarında giderek artış görülmektedir. Özellikle toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarına yol açan *E. coli* izolatlarının GSBL üretimindeki çarpıcı artışlar bu konudaki kaygıları

arttırmıştır (93-95). İspanya’da yapılan bir çalışmada GSBL üreten *E. coli* oranı %0.5 olarak bulunmuş aynı çalışma 6 yıl sonra tekrar yapıldığında bu oranın %4.04’e çıktığı bildirilmiştir (96,97). Yurdumuzda yapılan GSBL oranlarındaki artışı gösteren Akyar ve ark.nın çalışmasında ise *E. coli*’lerdeki GSBL oranları 5 yıl boyunca izlenmiş ve 2004-2008 yılları arasındaki GSBL oranları yıllara göre sırasıyla %3.8, %5.9, %9.4 , %13.7 ve %17.2 olarak saptanmıştır (98).

GSBL sıklığındaki artışla beraber kinolon direncinin de arttığı görülmüştür. Avrupa’da yapılan bir çalışmada GSBL üreten *E. coli* izolatlarında kinolon direnci %92 olarak bulunurken, GSBL üretmeyen izolatlarda bu oran %41.7 olarak saptanmıştır (99). Lutenbach ve ark. florokinolon direncinde rol alan risk faktörlerini araştırmış ve GSBL sıklığını yüksek oranda bulduklarını bildirmişlerdir (100). Ülkemizde yapılan bir çalışmada bakteriyemili hastalardan izole edilmiş olan GSBL üreten *E. coli*’lerde kinolon direnci %82 iken, GSBL üretmeyen *E. coli* izolatlarındaki kinolon direnci %29 olarak saptanmıştır (79). Aslan ve ark.nın yaptığı çalışmada siprofloksasin kullanan hastalarda GSBL pozitifliği %15 olarak bulunurken, kullanmayanlarda bu oran %7.4 olarak bulunmuştur (101). Kinolon direnci ile GSBL pozitifliği arasındaki bu paralelliğin başlıca sebepleri arasında toplum kökenli enfeksiyonların tedavisi için uygunsuz geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının artması ve bu konuyla ilgili yeterli yasal düzenlemelerin bulunmamasıdır. Başta idrar yolu enfeksiyonları olmak üzere kinolonların yaygın ve yanlış kullanımı sonucu direnç oranı toplumda hızla artmaktadır. Ayrıca GSBL’yi kodlayan genleri taşıyan plazmidlerde aralarında kinolonların da bulunduğu çoklu direnç genlerinin yer alması bu direncin yayılması için başka bir faktördür (3,102-104). Bizim çalışmamızın sonucunda toplum kökenli enfeksiyon etkeni olarak belirlenen izolatların büyük çoğunluğunun hastane ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. GSBL pozitif *E. coli* ile enfeksiyon geçirmeye yatkınlık oluşturan risk faktörleri araştırıldığında, bu sayının 1-8 arasında değiştiği görülmüş olup hasta başına düşen ortalama risk faktörü sayısında 3 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte hiçbir risk faktörü taşımayan hastaların varlığı da saptanmıştır. Bu durum bize bilinçsiz antibiyotik kullanımını düşündürmektedir. Ülkemizde geniş spektrumlu beta-laktamlar ve kinolon grubu antibiyotikler birinci basamak sağlık kuruluşlarında sıklıkla yazılmakta eczanelerden bir hekim onayı olmadan rahatlıkla alınabilmekte ve

çok ciddi bir kayıt dışı antibiyotik tüketimi oluşmaktadır. Çalışmamızda risk faktörleri irdelendiğinde son 6 ay içinde antibiyotik kullanımının 2. büyük risk faktörü (%60.41) olarak bulunduğu görülmüştür.

Çoklu ilaç direnci gösteren *E. coli* suşlarının sebep olduğu enfeksiyonların hızlı bir artış göstermesi ve bu kökenlere ait klonların salgınlara yol açabilmesi bu konudaki epidemiyolojik çalışmaları zorunlu hale getirmiştir. Epidemiyolojik çalışmaların en önemli basamaklarından biri enfeksiyon etkeni olan kökenler arasındaki klonal ilişkinin açık bir şekilde gösterilmesidir. İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin ortaya konması sonucunda enfeksiyonun kaynağı, yayılma yolları ve yaygınlığı hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Ayrıca sürveyans için hastaneye ait veriler elde edilip enfeksiyon kontrol programında kullanılabilir (105,106).

İzolatlar arasındaki klonal yakınlığın saptanması amacıyla klinik ve araştırma laboratuvarlarında çeşitli genotipik metodlar kullanılmaktadır. PFGE (Pulsed Field Gel Electroforesis) bu metodlar arasında ayırım gücü yüksek olan ve altın standart olarak kabul edilen bir yöntemdir. Diğer genotipleme metodlarına göre daha ucuzdur. Ancak çok fazla emek isteyen, uzun zaman ve ciddi ekipman gerektiren bu metodun laboratuvarlara göre standardize edilmesi zor, sonuçları değerlendirmek güç ve çıkan sonuçlar her zaman anlamlı değildir. Bir başka metod olan MLST (Multilocus Sekans Tiplendirme) diğer genotipleme metodlarına göre daha pahalı bir yöntemdir ve alt klonları belirlemede yetersiz kaldığı bildirilmektedir. Diversilab rep-PCR metodu ise bakteri genomunda bulunan kodlanmamış tekrar eden dizilerin amplifikasyonuna dayanan bir yöntemdir. PFGE'ye göre otomatize edilmesi daha kolay ve çok daha kısa bir sürede sonuç verebilen bu yöntem otomatize analiz yapabilen, kolay yorumlanabilen ve sonuçların manüplasyonuna olanak sağlayan bir moleküler tekniktir. Ayrıca bu yöntemde çalışmalardan elde edilen sonuçlar bilgisayar ortamında arşivlenerek programın sahip olduğu kütüphane tüm dünyada bu metodla yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırılabilmektedir. Bilgilerin arşivlenebilir olması eski izole edilen örneklerle yeni örneklerin karşılaştırılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu sistemin en büyük dezavantajları ise mikrofluidik çiplere hava kabarcığı yüklenmesi ya da biyoanalizörde herhangi bir elektrik problemi

olması durumunda çalışmanın tekrar edilme gerekliliği ve bunun sonucunda zaman ve maliyet kayıplarının artmasıdır (107-111).

Bonacorsi ve ark.nın 80 neonatal menenjit etkeni ve 52 referans *E. coli* suşu ile yaptığı çalışmada Diversilab sisteminin suşların klonal gruplarını ayırmada ve tanımlamada hızlı ve güçlü bir yöntem olduğu vurgulanmıştır (112). Belçika’da Deplano ve ark. GSBL üreten *E.coli* izolatlarını da içeren çok ilaca dirençli 165 suş ile Diversilab sisteminin performansını değerlendirmişler ve PFGE’den daha az ayırım gücü olmakla birlikte, Diversilab sisteminin çalışmadaki patojenlerin sebep olduğu salgınların araştırılmasında güvenli bir yöntem olduğunu, MLST’nin ise *E.coli* ve *P. Aeruginosa* için Diversilab sisteminden daha güvenli olmadığını bildirmişlerdir (113). CTX-M üreten 29 *E.coli* izolatı ile yapılan ve PFGE, MLST ve Diversilab rep-PCR yöntemleri ile klonal ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, rep-PCR metodu ile klonal yakınlığın belirlenmesi açısından PFGE’ye yakın ve MLST metoduna göre ise daha iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Ayrıca rep-PCR yönteminin maliyet açısından MLST’ye göre daha ucuz, PFGE’ye göre ise daha pahalı olduğu belirtilmiştir (110).

Avustralya’da yapılan bir çalışmada 6 klinik mikrobiyoloji laboratuvarından elde edilen sefalosporin ve/veya kinolon dirençli 49 *E. coli* izolatında Diversilab rep-PCR yöntemi ile klonal yakınlık araştırılmış ve 15 suşun aynı klona ait olduğu bulunmuştur (111). İsviçre’de iki komşu hastaneden izole edilen 18 GSBL üreten kinolona dirençli *E. coli* suşunun PFGE yöntemi ile incelenmesi sonucunda 15’inin iki farklı klonda toplandığı ve iki hastanede benzer suşların salgın yaptığı saptanmıştır. Hasta kayıtları incelendiğinde 5 hastanın her iki hastanede de yattığı ve bu hastalar vasıtasıyla hastaneler arası geçişin olabileceği belirtilmiştir (114). Bizim çalışmamızda ise Diversilab rep-PCR yöntemi ile 96 GSBL üreten ve kinolon dirençli *E. coli* izolatlarında 9 ana klon saptanmış ve kökenlerin 20’si sporadik vaka olarak değerlendirilmiştir. Fazla sayıda klon bulunmasının *E. coli*’nin genetik çeşitliliğinden, yoğun ve bilinçsiz antibiyotik kullanımından ve bakterilerin farklı direnç mekanizmalarının aktive olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda hakim klonun P5 olduğu ve bunu P4 klonunun izlediği bulunmuş olup, izolatların yarısından çoğunun bu iki klonda yer aldığı görülmüştür. Bu klonlar

incelendiğinde hastane içinde bölümler arası geçişin olduğu görülmüş ve aynı klona ait suşlar uzun zaman peryotları geçmesine rağmen değişik bölümlerde bulunan farklı hastalardan tekrar izole edilmiştir. Bu durum bize bu klonların hastanemizde kolonize olduğu, hastane personeli, hastalar ya da hastanede kullanılan malzemeler aracılığıyla hastanede yayıldığını düşündürmüştür. Bazı farklı servislerin birbirleri ile iç içe olmaları, farklı servislerin ortak personel kullanmaları ve hastanedeki bütün servislerin neredeyse aynı bina içerisinde bulunmaları gibi faktörlerinde bu süreci hızlandırdığı düşünülmektedir. Toplum kökenli olarak belirlenen enfeksiyonlardan soyutladığımız izolatların büyük bir bölümünün hastane kökenli enfeksiyonlara sebep olan izolatlarla aynı klonlarda yer almaları ve bu hastaların büyük bir bölümünün son 6 ayda hastanede yatış hikayesinin olmasından dolayı toplum kökenli enfeksiyonlara sebep olan birçok suşun hastane ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Özellikle de en sık karşılaşılan risk faktörünün son 6 ayda hastanede yatış öyküsü olması bize dirençli suşlardan kaynaklanan enfeksiyonlar ile ilgili epidemiyolojik çalışmalarda hastaların geçmişlerindeki hastane ile olan ilişkilerinin araştırılması gerekliliğinin önemini ortaya koymaktadır. Hastanemizin 3. basamak hastane olması hastaların geçmişlerinde başka sağlık kuruluşları ile ilişkilerinin olabileceğini kuvvetle muhtemel kılmakta ve bizim çalışmamızda toplum kökenli olarak düşündüğümüz ve hastanemiz ile de klonal olarak ilişkilendiremediğimiz izolatların farklı hastanelerden kaynaklanabileceği ihtimalini düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR

Üriner sistem enfeksiyonlarında etken olan GSBL üreten ve kinolona dirençli *E. coli* kökenlerinin artışı tedavide güçlükler, morbidite ve mortalitede artışa ve salgınlara sebep olduğundan önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Çalışmamızda aynı klona ait suşların farklı servislerden farklı zaman periyotlarında izole edilmesi, bu suşların hastanemizde kolonize olmuş ve çeşitli faktörlerle bölümden bölüme taşınmış olabileceğini düşündürmüştür. Hastanemizdeki bütün servislerin tek binada yer alması, çoğu servislerin arasında geçişlerin olması ve ortak personel çalıştırılması aynı klona ait bakterilerin farklı servislerden izole edilmesinin sebebini açıklayabilir. Bu durum enfeksiyon kontrol programlarının ve personelin bilinçlendirilmesinin önemini ortaya koymaktadır. Toplum kökenli olarak saptadığımız izolatların elde edildiği hastaların büyük bir kısmında son 6 ayda hastanede yatış ve geniş spektrumlu beta-laktam ya da kinolon grubu antibiyotik kullanımının olması, bu kökenlerin hastaneden kazanılmış olabileceğini ve bu antibiyotiklerin kullanımında dikkatli olunması gerektiğini düşündürmüştür. Hastanenin herhangi bir ünitesinde saptanan direnç artışının bir salgının habercisi olabileceği hatırd tutulmalıdır. Enfeksiyonun kaynağı ve yayılma yolları en doğru şekilde mikroorganizmaların klonal ilişkisinin gösterilmesi ile belirlenebilir. Çalışmamızda kullanılan Diversilab rep-PCR sistemi hızlı ve kolay uygulanabilir olup, elde edilen sonuçlar arşivlenerek saklanıp, daha sonraki çalışmalarda ve dünyadaki diğer kökenlerle karşılaştırılabilme imkanı sağlayabildiğinden avantajlı bir yöntem olarak düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- 1-Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. N Engl J Med 2005; 352(4): 380-391.
- 2-Moubareck C, Daoud Z, Hakime N. Country spread of community and hospital-acquired extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-15) producing Enterobacteriaceae in Lebanon. J Clin Microbiol. 2005; 43: 3309-3313.
- 3-Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Muniain MA, de Cueto M, Ríos MJ, et al. Bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. Clin Infect Dis 2006; 43:1407-14.
- 4-Yılmaz F F, Ermertcan Ş. İdrar yolu infeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* kökenlerinde florokinolon direncinin araştırılması, İnfeksiyon Derg 2005; 19: 429-433.
- 5-Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;(8): 557-84.
- 6-Paterson DL, Bonomo LA. Extended-Spectrum Beta-Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005; 18 (4): 657-686.
- 7-Livermore DM. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. Clin Microbiol Infect 2008;14 (Suppl 1): 3-10.
- 8-Koçoğlu E, Karabay O, İnce NK, Özkardeş F, Yıldırım R. Toplum kaynaklı üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve bazı antibiyotiklere direnç sıklığının araştırılması. ANKEM Derg. 2007;21:5-9.
- 9-Akova M. Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar ve klinik önemi. In: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D (eds). Önemli ve sorunlu gram-negatif bakteri infeksiyonları. Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi 2004; 85-95.
- 10-Unat EK. “*Escherichia coli*” In: Unat EK. Tıp bakteriyolojisi ve virolojisi, Dergah Tıp yayınları, ikinci baskı, 1986; cilt 1: p. 546

- 11-Toreci K “Escherichia turleri” In: Ayşe Willke Topcu, Guner Soyletir, Mehmet Doğanay, infeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi, Nobel tıp kitapçevleri, 2002; cilt 2: p. 1564-1575
- 12-Erdem B. Enterobacteriaceae. In: Ustaçelebi S. Editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Günes Kitabevi; 1999. pp. 471-517.
- 13-Smith HR, Cheasty T. Diarrhoeal disease due to Echerichia coli and Aeromonas. In: Collier L, Barlows A, Sussman M (Eds.). Microbiology and microbial infections. 9th ed. New York: Mc Graw Hill Co;2008.p.513-37.
- 14-Bilgehan H. *Escherichia*. In: Bilgehan H (editör), Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları (10. Baskı) Barıs Yayınları Fakülteler Kitabevi, izmir 2000; p. 3-17
- 15-Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. *Enterobacteriaceae*. In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM (eds) Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology (9th ed) St. Louis: Mosby, London 1994, pp. 362-87.
- 16-Murray P, Rosenthal K, Pfaller M: Medical Microbiology. Pennsylvania: Elseiver Mosby; 2005. p. 323-339
- 17-Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. (3.ed). Ankara: Barıs Yayınları; 2002: p 1-5.
- 18-Stamm WE, Stapleton AE. Approach to the patient with urinary tract infection. In: Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR(eds). Infectious Diseases. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company 1998; 943-54.
- 19-Colle J G, Fraser A G, Marmion B P, Simmons A (eds). Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology, 14. Ed., Churchill Livingstone, Newyork 1996; 363-367
- 20-Brooks G F, Butel J S, Morse S A eds. Jawetz, Melnck, and Adelberg’s Medical Microbiology. 22nd Ed. Newyork: McGraw- Hill 2001; 146.
- 21-Norrby S.R., Urinary tract infections In: Finch R.G., Greenwood D., Norrby S.R., Whitley R.J., Antibiotic And Chemotherapy eighth edition, Churchill Livingstone, Toronto 2003; 764-771.
- 22-Einstein B I, Zalesnik D F: Enterobacteriaceae. In: Mandell G L, Bennett J E, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennett’s Principles on practice of infectious diseases, 5 th ed., Churchill Livingstone 2000;2294 – 2301 .
- 23-Erayman İ, Erayman B, Arıbaş E T. İdrar örneklerinden izole edilen Gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2001; 15: 164.

- 24-Bilgehan H, Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi Kitabı, 10.Baskı, Bağışık Yanıt ve Temelleri, Barış Yayınları, İzmir 2002; 303-317.
- 25-Dieckhaus K. D., Urinary Tract Infections In: Grace C. Medical Magement of Infectious Disease 2003; 289-291.
- 26-Strohl W A,Rouse H, Fisher B D, Harvey RA, Champe P.C. Pathogenicity of Microorganisms, Illustrated Reviews. Microbiology, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2001; 3:11-14.
- 27-Erdem B, *Enterobacteriaceae*. In: Ustaçelebi S (editör), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji (1. Baskı) Günes Kitabevi, Ankara 1999, s. 472- 485.
- 28-Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Enteric gram-negative rods. In: Brooks GF, Butel JS, Morse SA (eds) Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology (23rd ed) McGraw-Hill companies, Boston 2004 pp. 248-260.
- 29-Johnson J R. Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. Clin Microbiol Rev 1991; 4: 80-128.
- 30-Stedman R, Yopley N. The virulence of Escherichia coli in the urinary tract. In: Brumeitt W, Hamilton- Miller J M T, Bailey R R (eds). Urinary tract infections, Chapman and Hall Medical, London 1998; 37-58.
- 31-Tulek N. İmflamatuar Enteritler. Doc. Dr. Omrum Uzun, Prof. Dr. Serhat Unal, Guncelbilgiler ışığında infeksiyon hastalıları, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2001: p. 481-493
- 32-Gülay Z. Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyeller. ANKEM Derg. 2003; 17(3):192-204.
- 33-Brooks GF,ButelJS,Morse SA.In: Jawetz,Melnick and Adelberg's Medical Microbiology 22.baskı Mc Graw Hill, New York 2001.p.63,144,
- 34-Ulusuy S. Antibiyotikler. Ekim N, Uğan ES(eds) In: Solunum Sistemi İnfeksiyonları, 1.baskı Toraks Kitapları, Ankara 2002. p.125.
- 35-Wheat RW.Composition,structure,and biosynthesis of bacterial envelope end energys storage polymers,Joklik,Willet,Amos,Wilfert(eds)In: Zinsser Microbiology,20. Baskı.Prentice-Hall İnt,New Jersey 1992. p.76.
- 36-Chambers HF. Penicillins. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds).In: Principles andPractice of Infectious Diseases, 5th edition, Churchill and Livingstone, Philadelphia 2000; 18: p. 261.
- 37-Kong KF, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS*, 2010; 118(1): 1-36.

- 38-Gür D. ESBL ve plazmid kaynaklı AmpC β -laktamazlar. XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve enfeksiyon Hastalıkları Kongre Kitabı, Antalya 2005;147-51
- 39-Rice LB, Bonomo RA. Mechanism of resistance to antimicrobial agents. Murray PR, ed. Manual of Clinical Microbiology, 9th ed, ASM Press, 2007: 1114-45.
- 40-Gür D. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S eds,In: Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2008:39-52.
- 41-Heritage J, M'Zali FH, Binzi DG, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended spectrum beta lactamases in Gram negative bacteria. J Antimicrob Chemother 1999, 44:309-318.
- 42-Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. Ustaçelebi Ş (ed).In: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.Güneş Kitabevi, 1999. p. 91.
- 43-Bush K, Jacoby G. Nomenclature of β -lactamases. J Antimicrob Chemother 1997; 39: 1-3
- 44-Livermore DM. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. J Antimicrob Chemother 1998;41 Suppl D:25-41.
- 45-Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for betalactamasesand its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1211-33.
- 46-Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RC (eds) Manual of the Clinical Microbiology (8th ed) ASM Press, Washington 2003 pp. 1074-101.
- 47-Amblar RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980;289:321-31.
- 48-Bradford PA. Extended spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14(4): 933-951.
- 49-Gür D. ESBL'lerin genel özellikleri ve ESBL tipleri. "Yeni ve yeniden gündeme gelen enfeksiyonlar: Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar",Bilimsel Tıp Yayınları, Ankara 2004.p.5-13.
- 50-Boyd DA, Tyler S, Christianson S, et al. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:3758-64.

51-Göker G. Poliklinik hastaların çeşitli klinik örneklerinden etken olarak izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* cinsi bakterilerde Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz varlığının araştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 2007.

52-Bal Ç. Beta laktamazlar: Güncel durum. *Flora* 2003; 8(2): 111-123.

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

54-Nordmann P, Ronco E, Naas T et al. Characterization of a novel extendedspectrumbeta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:962-9.

55-Shah A, Hasan F, Ahmed S, Hameed A: Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram negative bacilli producing extended spectrum beta-lactamases. *Research in Microbiology* 2005; 155: 409–421.

56-Livermore DM, Brown DFJ. Detection of β -lactamase-mediated resistance. *Journal of Antimicrob Chemother* 2001, 48 (Suppl S1): 59-64.

57-Clinical and Laboratory Standarts Institute. Antibiyotik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları; 18. bilgi eki. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2008.

58-Clinical and Laboratory Standarts Institute. Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA. 2011, CLSI.

59-Gür D, Bal Ç, Söyletir G ve ark (eds). Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri İçin UygulamaStandartları; Onikinci Bilgi Eki, NCCLS Dökümanı M100-S12, Bilimsel Tıp Yayınevi,Ankara 2002.

60-Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extendedspectrumbeta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (Suppl 1): 90-103.

61-Gür D. : Beta Laktamazların Sınıflandırılması. *FLORA Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Derg.* 1996; 1(2): 80-86,

62-Warren RE, Harvey G, Carr R, Ward D, Doroshenko A. Control of infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms in hospitals and the community. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (Suppl 1): 124-33.

63-Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:165-74.

- 64-Hooper DC, Strahilevitz J: Quinolones, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds) In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases, 7 ed.Elsevier Chirchill Livingstone, Philadelphia 2010. p. 487-510,
- 65-Hooper DC, Jacoby GA, Hooper DC: The world-wide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance, *Lancet Infect Dis* 2006;6(10):629-40.
- 66-Ruiz J: Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection, *J Antimicrob Chemother* 2003;51(5):1109-17.
- 67-Hooper DC. New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance. *Clin Infect Dis* 2000;30:243-54.
- 68-İnce D. Nükleik asit sentezini etkileyen antibakteriyeller: kinolonlar. *Ankem Derg.* 2003;17:208-11
- 69-Schaeffer AJ: The expanding role of fluoroquinolones, *Am J Med* 2002;113:45-54.
- 70-Goettsch W, van Pelt W, Nagelkerke N et al: Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in the Netherlands, *J Antimicrob Chemother* 2000;46:223-8
- 71-Andriole VT. The quinolones: past, present, and future. *Clin Infect Dis* 2005;41 (2):113-9.
- 72-Van Bambeke F, Michot JM, Van Eldere J, Tulkens PM. Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:256-80.
- 73-Nazik H, Öngen B. Türkiye'de plazmit aracılı kinolon direnci. *Ankem Derg.* 2010;24:46-54.
- 74-Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klimik Derg.* 2001; 14(2): 41-46.
- 75-Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003;47:273-95.
- 76-Ramphal R, Ambrose PG. Extended spektrum beta-lactamases and clinical outcomes: Current data. *Clin Inf Dis* 2006; 42: 164-72.
- 77-Gunseren F, Mamikoglu L, Ozturk S, Yucesoy M, Biberoglu N, Yulug M et all: A surveillance study of antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 1998; 43: 373-378.

78-Terek G, Gülay Z: Enterobacteriaceae üyelerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretimi: üç yıllık veriler. Poster no:15,7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, İstanbul, 2006.

79-Saglam D, Durmaz S, Kılıç H et al. Kan kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* suslarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı ve antibiyotik dirençpaternleri. Ankem Derg. 2011;25:250-5.

80-Kang C, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim C. Bloodstream infections due to extendedspektrum beta-lactamases producing *E.coli* and *K.pneumoniae*: Risk factors for treatmentoutcome with special emphasis on antimicrobial. Antimicrobial Agents Chemother 2004;48(12): 4574-81.

81-Lautenbach E, Patel BJ, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. Clin Infect Dis 2001;32: 1162-71.

82-Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. Am J Infect Control 1988;16:128-40.

83-Öksüz L, Gürler N, Akıncı N, Şirin A. İki aylık bir dönemde pediatrik poliklinik hastalarının idrar örneklerinden izole edilen GSBL oluşturan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşları. ANKEM Derg. 2008; 22: 14-19.

84-Akova M. Dikkat: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) var! ANKEM Derg. 2004; 18: 98-103.

85-Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spektrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. J Antimicrob Chemother 2005;56:52-9.

86-Gür D, Pitt TL, Hall LM, Akalın HE, Livermore DM. Diversity of *Klebsiella* with extended-spektrum beta-lactamases at a Turkish university hospital. J Hosp Infect 22: 163-7, 1992.

87-Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. Curr Opin Pharmacol 2007; 7: 459-469.

88-Pfaller MA, Jones RN and the MYSTIC Study Group (Americas). MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) results from the Americas: resistance implications in the treatment of serious infections. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 25-37.

89-Le J, Nguyen T, Okamoto M, McKamy S, Lieberman JM. Impact of empiric antibiotic use on development of infections caused by extended spektrum beta-lactamase bacteria in a neonatal intensive care unit. Pediatr Infect Dis J 2008; 27: 314-318

- 90-Hirakata Y, Matsuda J, Miyazaki Y, Kamihira S, Kawakami S ve ark. SENTRY Asia-Pacific Participants. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2005;52(4):323-329.
- 91-Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, et al. Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3280-4.
- 92-Gur D, Gulay Z, Akan OA, et al. Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicentre HITIT study. *Mikrobiyol Bul* 2008;42:537-44.
- 93-Rodriquez-Bano J, Navarro MD, Romero L. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-production *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 42: 1089-94, 2004.
- 94-Öztürk S, Birengel S, Tekeli A, Dolapçı İ, Azap A, Karamercan G. Toplum kökenli üriner sistem infeksiyonlarında GSBL (+) *E. coli* izolatlarında risk faktörleri ve moleküler tiplendirme. EKMUD Kongresi 24-28 Ekim Ankara. Poster 29. 2007
- 95-Canton R, Novais A, Valverde A, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(1): 144-53.
- 96-Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A. Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005; 49(5): 2122-2125.
- 97-Angel DM, Ramón HJ, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE project, 2006); Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(9): 503-510.
- 98-Akyar I, Kocagöz S, Kocagöz T, Sarıgüzel Sar N, Gültekin M ve ark. Beş yılda izole edilen 15434 *Escherichia coli* ve 3178 *Klebsiella* spp. suşunda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin yıllara, kliniklere ve örnek türlerine dağılımı. *ANKEM Derg.* 2010; 24(1):34-41
- 99-Trecarichi EM, Tumbarello M, Spanu T et al. Incidence and clinical impact of extended-spectrum-beta-lactamase production and fluoroquinolone resistance in bloodstream infections caused by *Escherichia coli* in patients with hematological malignancies. *J Infect* 2009;58:299-307.

100-Lautenbach E, Fishman NO, Bilker WB et al. Risk factors for fluoroquinolone resistance in nosocomial *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* infections. Arch Intern Med 2002;162:2469-77.

101-Arslan H, Azap OK, Ergönül O, Timurkaynak F. Urinary Tract Infection Study Group. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2005; 56:914-918

102-Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type betalactamases. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1-11.

103-Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended spectrum betalactamases producing *E. coli* and *K. pneumoniae*. Clin Inf Dis 2001; 33: 1288-94.

104-Yılmaz F F, Ermertcan Ş. İdrar yolu infeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* kökenlerinde florokinolon direncinin araştırılması, İnfeksiyon Derg 2005; 19: 429-433.

105-Wu F, Della-Latta P. Molecular typing strategies. Semin Perinatol 2002;26:357-66.

106-Hacek DM, Suriano T, Noskin GA, Kruszynski J, Reisberg B, Peterson LR. Medical and economic benefit of a comprehensive infection control program that includes routine detection of microbial clonality. Am J Clin Pathol 1999;111:647-57

107-Pounder JI, Shutt CK, Schaecher BJ, Woods GL. Clinical evaluation of repetitive sequence-based polymerase chain reaction using the DiversiLab System for strain typing of vancomycin-resistant enterococci. Microbiol Infect Dis 2006;54:183-7.

108-Ross TL, Merz WG, Farkosh M, Carroll KC. Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005;43:5642-7.

109-Chuang YC, Wang JT, Chen ML, Chen YC. Comparison of an automated repetitive-sequence-based PCR microbial typing system with pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol 2010;48:2897-901.

110-Pitout JD, Campbell L, Church DL et al. Using a commercial DiversiLab semiautomated repetitive sequence-based PCR typing technique for identification of *E. coli* clone ST131 producing CTX-M-15. J Clin Microbiol 2009;47:1212-5.

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

112-Bonacorsi S, Bidet P, Mahjoub F, Mariani-Kurkdjian P, Ait-Ifrane S, Courroux C, Bingen E. Semi-automated rep-PCR for rapid differentiation of major clonal groups of *Escherichia coli* meningitis strains. *Int J Med Microbiol*. 2009 Aug;299(6):402-9.

113-Deplano A, Denis O, Rodriguez-Villalobos H, De Ryck R, Struelens MJ, Hallin M. Controlled performance evaluation of the DiversiLab repetitive-sequence-based genotyping system for typing multidrug-resistant health care-associated bacterial pathogens. *J Clin Microbiol*. 2011 Oct;49(10):3616-20.

114-Fang H, Lundberg C, Olsson-Liljequist B, Hedin G, Lindbäck E, Rosenberg A et al. Molecular epidemiological analysis of *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases for identification of nosocomial outbreaks in Stockholm, Sweden. *J Clin Microbiol* 2004;42:5917-20.

8. ÖZGEÇMİŞ

Çetin KILINÇ, 1981 yılında Ankara’da doğdu. 2000’de Trabzon Yomra Fen Lisesi’ni, 2007 yılında ise İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi’ni bitirdi. Bartın’da 1 yıl pratisyen hekim olarak çalıştı. 2009 yılında araştırma görevlisi olarak Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda çalışmaya başladı ve 2013 yılında uzmanlık eğitimini tamamladı. Evli ve 1 çocuk babasıdır.