

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**İDRAR YOLLARI ENFEKSİYONU ETKENİ E.COLİ'LERİN ADEZİNLERİ
İLE ANTİBİYOTİK DİRENCİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN KLASİK VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Aykut İlker ARSLAN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR

ANKARA

Ocak – 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**İDRAR YOLLARI ENFEKSİYONU ETKENİ E.COLİ'LERİN ADEZİNLERİ
İLE ANTİBİYOTİK DİRENCİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN KLASİK VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Aykut İlker ARSLAN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2008-26 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

Ocak – 2010

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 18 / 01 /2010

İmza

PROF.DR. SEMRA KUŞTİMUR

Gazi Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

PROF. DR. NEDİM SULTAN

Gazi Üniversitesi

İmza

PROF. DR. AHMET BAŞUSTAOĞLU

GATA Üniversitesi

İmza

DOÇ.DR. AYŞE KALKANCI

Gazi Üniversitesi

İmza

DOÇ. DR. MELTEM YALINAY ÇIRAK

Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller, Resimler, Grafikler	VI
Tablolar	IX
Semboller, Kısaltmalar	XI
Önsöz	XII
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Üriner Sistem Enfeksiyonları	3
2.2 Sık İzole Edilen Üriner Sistem Enfeksiyonu Etkeni: Escherichia coli	5
2.2.1. Morfoloji ve Kimyasal Özellikleri	6
2.2.2. Biyokimyasal Özellikleri	7
2.2.3. E.coli'nin Oluşturduğu Enfeksiyonlar	9
2.2.4. E.coli'nin Antijenik Yapısı	10
2.2.5. Virulans Faktörleri	11
2.3. Bakteriyel Adezinler	12
2.3.1. Mannozy Duyarlı Fimbriae = Tip 1 fimbria	13
2.3.2. P Fimbriae	15
2.3.3. S- fimbriae	16
2.4. Üriner Sistem Enfeksiyon Tanısı	17

2.4.1. İdrarın Mikroskopik Ve Mikrobiyolojik Değerlendirilmesi	17
2.4.2. Biyokimyasal Tanı Yöntemi	19
2.4.3. Boyama Yöntemi ile Tanı	19
2.4.4. Ekim Yöntemi ile E.Coli Tanısı	20
2.5 Beta Laktamazlar ve Gram Negatif Bakterilerde Beta-Laktam Direnci	22
2.5.1. Plazmid Aracılı Beta-laktamazlar	24
2.6. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar	25
2.6.1 Sık Rastlanılan Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar	28
2.6.1.1. TEM Kökenli GSBL'ler	29
2.6.1.2. SHV Kökenli GSBL'ler	30
2.6.1.3. CTX-M Tipi GSBL'ler	31
2.6.2. GSBL'lerin Laboratuvarda Saptanması	33
2.6.3. GSBL'lerin Epidemiyolojisi	34
2.6.4. GSBL Sentezleyen Bakterilerin Klinikte Neden Olduğu Sorunlar	34
2.6.5. GSBL Tanısında Kullanılan Antibiyotikler	38
2.7. VITEK Otomatize Sistem ile GSBL tespiti	39
2.7.1. Vitek 2 Sistemi (BioMerioux Inc.,St.Louis,Mo.):	40
2.7.2. Otomatize Sistemlerin Avantajları	42
2.7.3. Otomatize Sistemlerin Dezavantajları	43
2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	44
2.8.1. Real Time PCR	47

3. GEREÇ VE YÖNTEM	53
3.1. E.coli'nin Tanımlanması	53
3.1.1. Otomatize Sistemle Vitek ile Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Tanımlama	54
3.1.2. <i>E.coli</i> Suşlarında GSBL Üretiminin Fenotipik Yöntemler ile Saptanması	55
3.1.2.1. Disk Difüzyon Yöntemleri ile Saptanması	55
3.1.2.1.1. Tarama Testi	55
3.1.2.1.2. Doğrulama Testi	57
3.1.3 PZR İçin DNA Ekstraksiyonu	58
3.1.4. GSBL ve E.coli Virulans Faktörleri Genlerinin PZR ile Analizi	58
3.2. Çalışma esnasında kullanılan alet ve sarf malzemeler	60
4. BULGULAR	62
4.1 GSBL Pozitif Suşlarda Bulgular	62
4.2 GSBL Negatif Suşlarda Bulgular	68
4.3 E.coli Suşlarında PZR Çalışmalarının Melting Curve Analizi Eğrileri	71
4.4 E.coli Suşlarında Genlerin Agaroz Jel Elektroforez Çalışması	78
4.5 İstatistiksel Değerlendirme	79
5. TARTIŞMA	85
6. SONUÇ	96
7. ÖZET	98
8. SUMMARY	101

9. KAYNAKLAR	105
10. TEŞEKKÜR	118
11. ÖZGEÇMİŞ	119

ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER	Sayfa
Resim 1: E.coli suşlarının IMVIC testlerinin gösterimi.	19
Resim 2: Konvansiyonel ışık mikroskopunda 1000 X büyütmede Gram boyamada E.coli.	19
Resim 3: Kanlı agarda <i>E.coli</i> .	20
Resim 4: Mac Conkey agarda <i>E. coli</i> . laktoz fermentasyonu nedeniyle pembe koloniler	21
Resim 5: EMB agarda pembe ve karakteristik parlak yeşil renkli <i>E. coli</i> kolonileri.	21
Resim 6: Vitek 32 cihazı	39
Resim 7: Vitek kartları	40
Resim 8: Vitek 2 cihazı	41
Şekil 1: PZR hedef amplifikasyon	48
Şekil 2: Gerçek zamanlı PZR amplifikasyon çizimi ve kullanılan terimler.	48
Şekil 3: Gerçek zamanlı PZR için SYBR Green ile tespit.	49
Şekil 4: Başlangıç aşaması.	50
Şekil 5: Primerin hedef moleküle bağlanması.	51

Şekil 6: Primer uzaması.	51
Şekil 7: GSBL pozitif E.coli suşlarına uygulanan Disk Difüzyon Testi	56
Şekil 8: CAZ-CLA ve CTX-CLA kombine disk difüzyon testi GSBL pozitif E.coli Suşu	57
Şekil 9: GSBL enzimi üreten E.coli izolatlarının Vitek yöntemi ile kullanılan antibiyotiklere dirençlilik ve duyarlılıklarının yüzde (%) oranları	63
Şekil 10: GSBL Pozitif suşlarda GSBL genlerinin aynı suşlarda birlikte bulunma oranları	66
Şekil 11: GSBL Pozitif aynı suшта virulans faktörlerinin birlikte bulunma oranları	67
Şekil 12: GSBL negatif E.coli suşlarında bir suшта aynı anda GSBL geni bulunma oranları	70
Şekil 13: GSBL negatif E.coli suşlarında virulans faktörlerinin birlikte bulunma oranları	71
Şekil 14: TEM amplifikasyon grafiği eğrisi	72
Şekil 15: TEM pozitif örnekler ve 72 °C'lik melting ısısı	72
Şekil 16: CTX-M amplifikasyon grafiği eğrisi	73
Şekil 17: CTX-M pozitif örnekler ve 92 °C melting ısısı	73
Şekil 18: SHV amplifikasyon grafiği eğrisi	74
Şekil 19: SHV pozitif örneklere ait eğriler ve 89 °C'lik melting ısısı	74

Şekil 20: fimA amplifikasyon grafiği eğrisi	75
Şekil 21: fim A pozitif örneklere ait eğriler ve 90 ⁰ C'lik melting ısısı	75
Şekil 22: pap amplifikasyon grafiği eğrisi	76
Şekil 23 : pap pozitif örneklere ait eğriler ve 82 ⁰ C'lik melting ısısı	76
Şekil 24: sfa amplifikasyon grafiği eğrisi	77
Şekil 25 : sfa pozitif örneklere ait eğriler ve 87 ⁰ C'lik melting ısısı	77
Şekil 26 : GSBL genleri ve virulans faktörleri jel elektroforezde dağılımı	78

TABLÖLAR

Sayfa

Tablo 1: E.coli adezinlerinin idrar, insan böbrek ve mesane epitel hücrelerine bağlanmaları	12
Tablo 2: GSBL lerin Karakterizasyonu	27
Tablo 3: VITEK-32 GNS 121 Kart İçeriği	55
Tablo 4: Çalışmada kullanılan DNA dizileri	59
Tablo 5: GSBL pozitif suşlarda antibiyotik direnç ve duyarlık oranları	62
Tablo 6: Disk Difüzyon Yöntemleri ile doğrulama bulguları	64
Tablo 7: GSBL (+) E.colilerde GSBL Genleri ve Virulans faktörlerinin oranları	65
Tablo 8: GSBL pozitif suşlarda GSBL Genleri ve E.coli virulans faktörleri bulunma durumu	65
Tablo 9: GSBL pozitif E.coli suşlarında GSBL genlerinin bir suşta aynı anda birden fazla bulunma durumları.	66
Tablo 10: GSBL pozitif E.coli suşlarında virulans faktörlerinin bir suşta aynı anda birden fazla bulunma durumları.	67
Tablo 11: GSBL negatif E.coli suşlarının GSBL genleri ve Virulans faktörlerinin oranları	68
Tablo 12: GSBL negatif E.coli suşlarının GSBL genleri ve Virulans faktörlerinin bulunma durumu	69

Tablo 13: GSBL negatif E.coli suşlarının bir suşta aynı anda GSBL geni bulunma durumları.	70
Tablo 14: GSBL negatif E.coli suşlarında bir suşta aynı anda birden fazla virulans faktörü bulunma durumları.	71
Tablo 15: GSBL pozitif suşlarda E.coli virulans faktörleri ile GSBL genleri arasında ilişkilendirme.	79
Tablo 16: GSBL pozitif suşlarda E.coli virulans faktörleri ile CTX-M genleri arasında ilişkilendirme.	80
Tablo 17: GSBL pozitif suşlarda fimA ile CTX-M genleri arasında ilişkilendirme.	80
Tablo 18: GSBL pozitif suşlarda pap ve fimA virulans faktörleri arasında ilişkilendirme.	81
Tablo 19: GSBL pozitif suşlarda GSBL genleri ve E.coli virulans faktörleri arasında ilişkilendirme.	82
Tablo 20: GSBL negatif suşlarda GSBL genleri ve E.coli virulans faktörleri arasında ilişkilendirme.	83
Tablo 21: GSBL negatif suşlarda E.coli virulans faktörleri arasında ilişkilendirme.	84

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

E.coli	Escherichia coli
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar
GN	Gram-Negatif
PZR	Polimeraz Chain Reaction
ÜSE	Üriner Sistem Enfeksiyonları
CDC	Center Disease Control
CLED	Cistein Laktoz Elektrolit Deficient Agar
XLD	Xylose Lysine Deoxicholate Agar
UPEC	Üropatojenik E.coli
ExEC	Ekstraintestinal E. coli
pap	Pyelonefrit İle İlişkili Pilus
fimA	Tip 1 fimbria
cfu	koloni oluşturan birim
°C	Santigrad
IRT	İnhibitör Dirençli TEM
MIC	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ÇDST	Çift Disk Sinerji Testi
Tm	Melting Temperature

ÖNSÖZ

Üriner sistem enfeksiyonunun en sık etkeni *Enterobacteriaceae* ailesinden E.coli suşlarının oluşturduğu enfeksiyonlar son yıllarda antibiyotiklere karşı oluşturdukları direnç ile tedavide güçlükler yaşanmasına neden olmaktadır. *Enterobacteriaceae* ailesi arasında beta-laktam antibiyotiklere karşı direncin en yaygın nedeni beta-laktamaz üretimidir. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar (GSBL) oluşturan suşlarda en sık rastlanan beta-laktamazlar TEM, SHV ve CTX-M genleridir.

Ülkemizde, E.coli virulans faktörlerinden adezinler ile GSBL genleri arasındaki ilişkilerin moleküler düzeyde araştırılarak aralarındaki ilişkilerin istatistiksel düzeyde araştırılması konusunda yeterli çalışma yapılamamıştır. Bu çalışmanın konu ile ilgili yapılacak diğer çalışmalara ışık tutmasını ümidini taşıyorum.

Dr. Aykut İlker ARSLAN

1. GİRİŞ

Enterobacteriaceae ailesinde bulunan bakteriler gram negatif basiller içinde tıbbi açıdan en önemli bakterilerdir. Klinik laboratuvarlarda en çok izole edilen etkenler arasında sayılır. Başka bir deyişle laboratuvarlardaki klinik öneme sahip izolatların %50'sini oluşturmaktadır. Bu ailenin üyeleri klinik laboratuvarlarda izole edilen basillerin yaklaşık olarak %80'inden, gastroenteritlerin %65-70'inden ve sepsisemilerin %50'sinden sorumludur. Ayrıca idrar yolu enfeksiyonlarında da %70'in üzerinde etkilidir. Bunun dışında hastane enfeksiyonlarının da en büyük sorumlusu olarak kabul edilmektedir. ¹ Yine üropatojenik *Escherichia coli*'de (*E.coli*) toplum kökenli idrar yolu enfeksiyonlarının %70-95'inde ve hastane kökenli olguların ise %50'sinde etken olarak karşımıza çıkmaktadır. ²

Son yıllarda antibiyotiklere karşı giderek artan direnç sorunu tüm dünyayı tehdit eder hale gelmiştir. Beta laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getiren beta-laktamaz enzim üretimi, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Sayıları 350'ye ulaşan beta-laktamazlardan yaklaşık 150'si genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL= extended-spectrum beta-lactamases =ESBL) olup bakteri plazmidleri aracılığı ile bakteriler arasında transfer edilebilir. ³

GSBL'ler, gram-negatif (GN) basillerde bulunan, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençten sorumlu olan enzimlerdir. Özellikle *Klebsiella* türleri ve *E.coli* başta olmak üzere, GSBL üretimi ve patojen bakteriler arasında hızla yayılması son yıllarda ciddi sorunlar oluşturmaktadır. GSBL üreten kökenlerde enfeksiyon riski; uzun süre hastanede yatış, yoğun bakım ünitesinde bulunma, idrar veya venöz kateter vb. uygulamalar gibi çeşitli girişimler ve geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotik kullanımı gibi bazı faktörlerle artmaktadır. Hastane

enfeksiyonu etkeni olarak görülme sıklığı giderek artmakta ve genellikle çoklu ilaç direncine sahip olduklarından tedavide güçlüklerle yol açmaktadır.⁴

Bu çalışmamızda; idrar yolu enfeksiyonu olan hastaların idrarlarında *E.coli* suşlarının varlığının klasik yöntemlerle tespiti, Vitek otomatize sistem ile antibiyotik duyarlılıklarının saptanması, GSBL pozitif ve negatif suşlarda GSBL enzimin ve *E.coli* adezin virulans faktörlerinin moleküler olarak SYBR Green I kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tiplendirilmesi, elde edilen tüm veriler ışığında *E.coli* adezin virulans faktörleri (pap, fimA, sfa) ile antibiyotik direnci sonucu GSBL pozitif genler (TEM, SHV, CTX-M) arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Üriner Sistem Enfeksiyonları

Üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE), hem toplum hem de hastane kaynaklı olarak sık görülmeleri, mortalite üzerine olumsuz etkileri nedeniyle önemlidir. Her yaş grubunu ve her iki cinsiyeti de etkileyen bu enfeksiyon özellikle genç erişkin yaş grubu kadınlarda sıktır.⁵

ÜSE, en sık karşılaşılan toplum kökenli enfeksiyonlardır.⁶ ÜSE, en yaygın enfeksiyon olarak kabul edilmektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde ÜSE nedeniyle yılda; 8 milyon kişi muayenehanelere, 1,5 milyon kişi acil servislere ve 300.000 kişi de hastanelere başvurmaktadır. Bu enfeksiyon yılda 3,5 milyar dolar maliyetle üroloji hastalıklarında en yaygın enfeksiyondur. Genel olarak *E.coli* en yaygın üropatojendir ve ÜSE'lerin %80'inde görülür.^{6,7}

Center Disease Control (CDC)'ye göre ÜSE, semptomatik ÜSE, asemptomatik bakteriüri ve üriner sistemin diğer enfeksiyonları olarak üçe ayrılmıştır.⁸

Asemptomatik bakteriüri tanısı için; idrar kültürü alınmadan yedi gün öncesine kadar üriner kateter bulunan bir hastada ateş (38°C 'nin üstünde ateş), pollaküri, dizüri veya suprapubik hassasiyet olmaması ve idrar kültüründe = 10^5 koloni/ml üreme olması gibi kriterlerin bulunması gerekmektedir.⁸

Semptomatik ÜSE tanısının konulması için; ateş, pollaküri, dizüri, veya suprapubik hassasiyet bulgularından biri ile idrar kültüründe = 10^5 cfu/ml üreme olması veya ateş, pollaküri, dizüri ve suprapubik hassasiyet bulgularından ikisiyle birlikte piyürinin olması (= 10 lökosit/ml), miksiyon yoluyla alınmamış (mesane kateterizasyonu veya suprapubik aspirasyonu ile alınan gibi) iki idrar kültüründe >100 koloni/ml aynı

üropatojenin (GN bakteriler veya *Staphylococcus saprophyticus*) üremesi, uygun antibiyotik alan bir hastada üropatojen bir mikroorganizmanın =10⁵ cfu/ml saf olarak üremesi gibi kriterlerin birisinin olması şeklinde açıklanmaktadır.⁸

ÜSE; patogenezi göre (örn: obstrüksiyon), lokalizasyona göre (örn: üretrit, sistit) veya tedaviye göre (örn: ilk enfeksiyon, reenfeksiyon, relaps, rekürrent enfeksiyon) sınıflandırılabilceği gibi genel olarak üst ve alt ÜSE olarak tanımlanması klinik prezentasyon, patofizyoloji ve tedavi için yararlıdır. ÜSE semptomatik ve asemptomatik veya basit ve komplike (altta yatan anatomik veya fonksiyonel anomali mevcuttur) olarak da sınıflandırılır.⁹

ÜSE'ında çoğunlukla etken olan mikroorganizmalar bakterilerdir. Enfeksiyonların büyük bir bölümünün tek bir mikroorganizma ile gelişmesine karşın, hastane enfeksiyonlarında birden fazla bakteri etken olabilmektedir. Komplike olmayan sistit ve pyelonefrit olgularının %80'inden fazlasında sorumlu mikroorganizma *E.coli* olup, özellikle belirli serotiplerine daha fazla rastlanmaktadır. Komplike ÜSE'de *E.coli*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* en sık izole edilen mikroorganizmalardır.¹⁰

En yüksek ÜSE insidansı 20-40 yaş arası, genç, cinsel yönden aktif kadınlarda görülür. Genç kadınların en az % 20'si her yıl ÜSE atağı geçirmektedirler. Aynı yaş grubundaki erkeklerde komplike olmayan ÜSE insidansı % 0.5'tir ve daha çok homoseksüel, sünnetsiz veya HIV enfeksiyonu olan kişilerde görülür.^{11,12}

ÜSE'de en sık izole edilen bakteri *E.coli* olup, komplike olmayan sistit ve piyelonefritlerin %80'inden fazlasında bu bakteri sorumludur. Üropatojenik *E.coli* (UPEC) klonları olarak adlandırılan birkaç 0 serotipi (2, 4, 8, 18ab, 75, 150) bu enfeksiyonların çoğunda rol oynar.^{10,12} Üropatojenik *E.coli* tip O₄ serotipi diğer serotiplerden daha fazla virulans

faktörlere sahiptir. Akut piyelonefrit, toplumsal kaynaklı üriner enfeksiyonlar, bakteriyal prostatit ve asemptomatik bakteriüri gibi ÜSE ile çok fazla ilişkilidir. *E.coli* basit üretritten semptomatik sistit, piyelonefrit hatta sepsise kadar uzanan tablolara neden olabilir. Bunu *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* türleri izler. *Koagülaz-negatif stafilkoklar* genellikle kontaminan olarak kabul edilmekle birlikte, *Stapylococcus saprophyticus*, özellikle bahar ve yaz aylarında, cinsel yönden aktif genç kadınlarda etken olur. Akut sistit ataklarının % 5-15'inden sorumludur.^{10,12}

ÜSE'lerinde daha az sıklıkla bilinen etkenler; *Gram pozitif mikroorganizmalar (koagülaz negatif stafilkoklar)*, *anaeroblar*, *viruslar (Adenovirus)*, *Gardnerella vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum* ve *Mycoplasma hominis*'tir.¹⁰

Hemen hemen tüm ÜSE'ler assendan enfeksiyonlardır. Fekal floradan gelen bakteriler periüretal bölgede kolonize olurlar ve üretradan mesaneye ulaşırlar. Daha nadir olarak hematojen yolla da ÜSE'ye neden olabilirler. Lenfatik yol ve direkt yayılımın da ÜSE patogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir.¹²

2.2 Sık İzole Edilen Üriner Sistem Enfeksiyonu Etkeni: Escherichia coli

E.coli 1885'de Thedor Escherich tarafından ishali süt çocuklarının dışkılarından izole edilip, *Bacterium coli commune* adı ile tarif edilmiş, daha sonra barsak dışı enfeksiyonlarındaki patojenliği tanınmış, 1919'da Castellani ve Chalmer tarafından *Escherichia* cins adı önerilene kadar *Bacterium coli* adı kullanılmıştır.^{13,14} Çoğunlukla doğumdan sonra 40 saat içinde insan barsaklarında kolonize olurlar.¹⁵

2.2.1. Morfoloji ve Kimyasal Özellikleri

E.coli; yaklaşık 2-4 µm boyunda ve 1.0-1.5 µm eninde, düz, uçları yuvarlak çomakçık şeklinde bakterilerdir. Bazı kültürlerde, koka benzer küçük, kısa; bazı kültürlerde de normalden uzun ve hatta Y harfi şeklinde dallanan flamanlı şekiller bulunabilir. Genellikle peritriş kirpikleri sayesinde hareketli olmakla birlikte hareketleri yavaştır. ¹⁶

E. coli; peptonlu su, buyyon ve jeloz gibi zenginleştirilmemiş besiyerlerinde fakültatif anaerob olarak ürer. Optimal üreme 37°C'de, nötral pH 7.2'de olur. Ancak 18-44,5°C arasında, pH 5-8 sınırlarında da daha yavaş olarak ürer ve 44 °C'de laktozu fermente edebilmesi ve indol oluşturması diğer koliform laktozu fermente eden bakterilerden ayırt edilmesinde kullanılır. ^{17,18}

Besiyerinde, hafif kabarık, yuvarlak, düzgün, 1-2 mm. çapında, parlak, S tipi koloniler yaparlar. Bazı kökenlerin kolonileri hafif mukoid (M) koloniler şeklinde olup R kolonileri de oluşabilir. Jelatinde kolonileri küçük, saydam ve sonradan beyazdır. MacConkey besiyerinde düz, parlak, kabarık, pembe koloni oluşturur, Cistein Laktoz Elektrolit Deficient agar (CLED) ve Xylose Lysine Deoxicholate agar (XLD) besiyerinde sarı koloniler oluşturarak ürerler. Bazı kökenler, özellikle idrar yolu enfeksiyonlarından izole edilenler, kanlı jelozda hemoliz yapabilirler. ^{16,20}

E.coli, diğer *Enterobacteriaceae* ailesindeki bakteriler gibi, GN çomak şeklinde sporsuz bir bakteridir. Kapsül oluşturma nadirdir. Buna karşılık birçok suş polisakkarit yapısında M antijeni içeren bir mikrokapsül veya yine polisakkarit yapısında K antijenlerini içeren slime tabaka içerebilir. ¹⁴

Sıvı besiyerlerinde genellikle homojen bulanıklık meydana getirir. Katı besiyerlerinde S şeklindeki suşlar 24 saatte düzgün kenarlı, ortası kalkık, 2-3 mm çapında, pigmentsiz koloniler oluşturur. Bazı *E.coli* suşları üreme defektlidir; bunlar besiyerlerinde daha yavaş ürerler.⁴³ MacConkey besiyerinde laktozu fermente ettiğinden kırmızı renkte, safrayı presipite ettiğinden etrafında zon oluşan koloniler; EMB besiyerinde laktozu fermente ettiğinden metalik refle veren yeşil-siyah koloniler oluştururlar.^{17,18}

E. coli'nin hareketsiz, laktozu fermente etmeyen, glikozdan gaz oluşturmayan suşları inaktif suşlar olarak kabul edilir ve bu suşlar birçok özellikleri ile *Shigella* cinsine daha yakın bulunurlar.¹⁴

2.2.2. Biyokimyasal Özellikleri

E.coli suşlarının tamamı triptofandan indol yaparlar, metil kırmızısı deneyi pozitifdir. Voges-Proskauer testi olumsuzdur. Simons'un sitratlı besiyerinde üremezler. Bu testler, IMVIC testleri adını alır. *E.coli* için IMVIC testleri (+,+,-,-)'dir. Fenilalanin deaminaz ve jelatin hidrolizi testlerinde negatif reaksiyon verirler. Üreaz negatifirler. Triptofandan indol yaparlar, H₂S oluşturmazlar. Potasyum siyanürlü besiyerinde üremezler. *Escherichia* cinsi içinde *E.coli*, *E.fergusonii*, *E.hermannii*, *E.vulneris* ve insanda enfeksiyona neden olmayan *E.blattae* türleri vardır.²¹

E.coli'nin önemli biyokimyasal özellikleri; glikozdan asit ve gaz oluşturması; laktoz, D-mannitol, D-sorbitol, L-arabinoz, L-ramnoz, maltoz, D-ksiloz, trehaloz ve D-mannozu fermente etmesi; adonitol, inositol, sellobioz, eritrol, D-arabitolü fermente etmemesi; nitratı indirgemesi; katalaz, metil kırmızısı, lizin dekarboksilaz, ONPG deneylerinin pozitif olması; oksidaz Voges-Proskauer, fenilalanin deaminaz, lipaz, 25°C'de DNaz deneylerinin negatif olması; indol oluşturması; H₂S, üreaz oluşturmaması; KCN'de ve tek karbon kaynağı

olarak sitratta ürememesi; jelatini hidrolize etmemesi olarak belirtilebilir.
14,18

E.coli suşları birçok şekeri, asit ve gaz meydana getirerek parçalarlar. Laktoza olan etkileri bu şekere etki etmeyen diğer bağırsak bakterilerinden özellikle *Salmonella* ve *Shigella* türlerinden ayırıcı bir özelliktir. Glikoz, maltoz, mannitol, ksiloz, ramnoz, arabinoz, sorbitol, trehaloz, mannoz ve gliserolü asit ve gaz yaparak parçalarlar. Sukroz, salisin, dulsitol ve rafinoz üzerine etkileri değişken olup adonitol, inozitol ve sellobiyozu nadiren fermente ederler.^{16,22}

E.coli'de Direnç

E.coli, dış koşullara oldukça dirençli bir bakteridir. 60 °C ısıda 30 dakika, 55 °C'de 60 dakika, oda ısısında uzun süre canlı kalabilir. Soğuğa karşı dirençlidir ve dezenfektanlara karşı duyarlıdır.

E.coli, benzilpenisilinlere karşı doğal dirençlidir. Bakterilerde direnç geçişi kromozomal ya da plazmid aracılığı ile olabilir. Kromozomal dirençte ya ilacın hedefinde ya da ilacın yakalamasını denetleyen membran taşıma sistemini kodlayan gende mutasyon vardır. Direnç plazmidleri (R faktörleri) kromozom dışı, çembersel, çift iplikli DNA molekülleri olup antibiyotikleri yıkabilen ve membran taşıma sistemlerini değiştirebilen çeşitli enzimlere ait genleri taşırlar. Bakteriden bakteriye geçebilen bulaşıcı direnç plazmidlerini kazanması ile amoksisilin, tetrasiklin, aminoglikozid, florokinolon ve trimetoprim-sulfametoksazol dirençli hale gelirler.^{16,22}

Aminoglikozidler, sefalosporinler, kloramfenikol, makrolitler, penisilinler, sulfonamidler, nitrofurantoin, fusidik aside karşı gelişen dirençten genellikle plazmidler sorumludur.²³

2.2.3. *E.coli*'nin Oluşturduğu Enfeksiyonlar

E.coli'nin oluşturdukları hastalıkları, bağırsaklarda ve bağırsak dışında oluşturdukları olarak ikiye ayırmak gerekir. *E.coli*lere bağırsaklarda oluşturdukları hastalık mekanizma şekillerine göre çeşitli isimler verilmektedir. Bunlar; Enterotoksijenik *E.coli* , Enteroinvazif *E.coli*, Enterohemorajik *E.coli*, Enteropatojenik *E.coli*, Enteroaggregatif *E.coli* lerdir.^{17,18}

Bağırsak Dışında Oluşturdukları Hastalıklar

Ekstraintestinal enfeksiyonlar, hemen her yaşta ve her organda sık görülürler. Bağırsak dışındaki dokulara ulaşırsa patojen olup hastalık yapma yeteneğine katkıda bulunan adezinler (pili), konağın savunma mekanizmalarından kaçış (kapsül), demir sağlama mekanizmaları (aerobaktin), toksin üretimi (hemolizin) gibi virulans faktörleri sayesinde çeşitli enfeksiyonlara neden olurlar. Çoklu virulans faktörleri için genler büyük kromozomal bloklar halinde bulunurlar ve bunlara patojenite ilişkili adalar (Pathogenicity associated islands: PAIs) denir. Oluşturdukları enfeksiyonlar sıklıkla üriner sistem, safra kesesi ve yolları, periton, akciğerler, kemikler, meninksler, prostat, yumuşak doku ve kan dolaşımı gibi başka doku ve organlarda ortaya çıkabilir. Bu suşlar enterik hastalığa yol açmadan konağın bağırsaklarında kolonize olurlar. Bu gruptaki suşlara UPEC yerine ekstraintestinal *E.coli* (ExEC) tanımını kullanmak daha uygundur.²²

Üriner sistem enfeksiyonlarının en önemli sebebi *E.coli*'dir. En önemli virulans faktörü, P fimbriadır ki, bu P grubu kan antijenlerine bağlanır. Bu antijen üroepitelyanın %99'unda bulunur.⁹

UPEC, Tip 1 fimbria, P fimbria, S fimbria, F1c Fimbria ve Dr adezinlerle karakterizedir.²⁴

E.coli, üriner sistem enfeksiyonlarının %50-90'ından sorumlu olup, en sık rastlanılan mikroorganizmadır.^{12,25}

2.2.4. *E.coli*'nin Antijenik Yapısı

E.coli karmaşık bir antijen yapısına sahiptir. Kauffmann tarafından antijenik özelliklerine göre 1944 yılında sınıflandırılmıştır. Buna göre, hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritlerdeki O-spesifik polisakkarit zincirine göre serolojik olarak serogrurlara ayrılırlar. H ve K antijenine göre de serotiplere ayrılırlar. Bugüne kadar, 170'in üzerinde O-antijeni, 50'nin üzerinde H-antijeni ve 100'den fazla K-antijeni tanımlanmıştır. 1000'den fazla antijenik tip mevcuttur.^{12,26,27}

O-antijeni somatik antijendir. Isıya ve alkole dirençli, formole duyarlıdır. *E.coli* antijenleri ile *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Yersinia* ve *Providencia* cinsi bakterilerin O-antijenleri arasında birçok karışıklığa yol açabilen sayısız çapraz reaksiyonlar vardır. Çoğu enfeksiyon sınırlı sayıdaki O-grubu ile olur. Bilinen tüm *E.coli* serotiplerinin sadece %8-10'u tüm *E.coli* nedeni ÜSE'lerinin üçte ikisini oluşturur. En sık rastlanan ÜSE etkeni serotipler 1, 2, 4,6, 7, 8, 9, 11, 18a, 18b, 22, 25, 50 ve 75'tir.^{21,22,28}

H antijeni kirpik antijenidir. 100°C'de ısıtılmaya, alkole, proteolitik enzimlere duyarlı, formole dirençli ve protein yapısındadır. Diğer bakterilerin H-antijenleri ile çapraz reaksiyon vermezler.¹⁶

K antijeni kapsül antijenidir. Polisakkarit yapıdadır. Isıya duyarlıdır. K-antijenleri L, A, B harfleri ile gösterilen bir antijen grubudur. Isıya dayanıksızdır. Bazı B-antijenleri ile fimbriyaların birçok özellikleri bakımından birbirine benzediği belirlenmiştir. Çoğunlukla hemolitik özellikte olan L-antijenleri, fındık faresine toksik, tavşanlara ise nekrotik etkilidir. Özellikle 18, 9, 20, 101 antijenlerini taşıyan *E.coli*, suşları A-antijeni de oluşturma yeteneğindedir. 120 °C'de 2,5 saatte harap olurlar. B-antijenleri, ısıya duyarlılık yönünden L-antijenine benzer. B-antijeni patojenite ile ilgili olan başlıca kapsül antijenidir. Isıtılmaya 100 °C 1 saat dayanır.²⁹

K 1, 2, 3, 5, 12 ve 13 antijenleri içeren *E.coli* suşları % 70 oranında piyelonefrit etkenidir. En sık saptanan K1 antijeni olup bu antijenin opsonizasyon ve fagositoza engel olma mekanizması bakteri hücre yüzeyine hidrofilik ve negatif yüklü özellik kazandırması ile olur. Ayrıca alternatif kompleman yolunu inhibe ederek, kompleman sisteminin bakterisidal etkisini yok eder.³⁰

2.2.5. Virulans Faktörleri

Virulans, mikroorganizmanın hastalık oluşturma yeteneği olup, mikroorganizmanın patojenlik derecesini gösterir. Konağa giriş ve konağın primer savunma mekanizmalarından kaçış, konak hücrelerine tutunma (adezyon), mikroorganizmaların çoğalması ve yayılması, konak hücreye toksinlerle ya da inflamatuvar cevapla zarar verme, konağın sekonder savunma mekanizmalarından kaçış; bakteriyel patogenezin basamaklarını oluşturur. Mikroorganizmanın patojenliğinin başarısı bu basamakları kısmen ya da tamamen tamamlamasına dayanmaktadır.³¹

UPEC suşlarının bilinen virulans faktörleri arasında kapsül oluşturma, üroepitelyal hücrelere yapışma yeteneği (adezyon), idrarda üreme hızı, serum direnci, P fimbriya varlığı, siderofor üretimi, sitotoksik nekrotizan faktör-1 ve hemolizin varlığı, belirli O ve K serogrubuna ait

olma, kolisin V üretimi, antimikrobiyalere direnç gibi biyolojik özellikler sayılabilir.²¹

E.coli adezinlerinin idrar, insan böbrek ve mesane epitel hücrelerine bağlanmalarına göre dağılımı Tablo 1’de gösterilmektedir.

Tablo 1: *E.coli* adezinlerinin idrar, insan böbrek ve mesane epitel hücrelerine bağlanmaları³²

	S fimbriae	P fimbriae	Type 1 fimbriae
Böbrek			
Bowman Kapsülü	+++	+++	-
Glomerul	+++	+++	-
Proksimal Tubulus	++	++	+++
Distal Tubulus	++	++	(+)
Toplayıcı kanal	++	+	(+)
Damar duvarı	+++	+++	+++
Mesane			
Epitel	++	+	-
Damar duvarı	+++	+++	++
Kas tabakası	+	+	+++
Bağlayıcı doku	++	-	-
İdrar			
Epitel Hücreleri	+	+	-

Sembol: -, +, ++, +++, sırasıyla saptanamadı, zayıf, orta, ve güçlü bağlanma.

2.3. Bakteriyel Adezinler

Fimbria'lar adezyondan sorumlu en önemli bakteri yüzey adezinleri ya da ligandları olarak bilinmektedir. Her bakteri, ucunda adezin bulunan 100-200 fimbria taşıyabilir. Elektron mikroskopisi ve eritrosit aglütinasyonu yöntemleri kullanılarak farklı morfolojik ve fonksiyonel özelliklere sahip birçok fimbria tipi tanımlanmıştır. Ancak bazı bakteri

türlerinin fimbria olmaksızın da adere olabildikleri gösterilmiştir. Üzerinde en çok çalışılan üropatojen olan *E.coli*'nin fimbria'ları adezin proteinlerinin reseptör özgülüklerine göre sınıflandırılmaktadır.³³

2.3.1. Mannoza Duyarlı Fimbria = Tip 1 fimbria

Tip 1 fimbria enfeksiyonların başlangıç aşamasında çok önemlidir. Yapılan bir çalışmada tip 1 fimbriyanın özellikle enfeksiyondan 24 saat sonra mesanede ciddi şekilde bulunduğu belirlenmiştir.³⁴

Kobay eritrositlerini aglutine etme özelliğine sahip olup bu olay ortamda mannoza bulunması ile inhibe olur. Bu nedenle bu tip fimbriaya "mannoza duyarlı fimbria" adı da verilmektedir.³⁵ Tip 1 fimbria *fim* geni tarafından kodlanmıştır.¹⁰⁹ Birçok *E.coli* izolatında tip 1 fimbria ya da tip 1 fimbriayı eksprese etme kapasitesi vardır. Tip 1 fimbria'nın biyolojik rolünün bakterinin kolon mukusuna adezyonunu sağlamak olduğu öne sürülmüştür.³³

Tip 1 fimbriaların üroepitelyal hücrelere tutunmadaki rolleri ile ilgili çelişkili çalışmalar vardır. Bir takım çalışmalarda mannoza duyarlı *E.coli*'lerin üroepitelyal hücrelere tutunmalarının çok zayıf olduğu, oysa bukkal epitelyal hücrelere gayet iyi adere olabildikleri öne sürülürken, bunun tersi bazı çalışmalarda üroepitelyal hücrelerde önemli bir tip 1 fimbria aderansının varlığı gösterilmiştir.³³

Bu çelişkili sonuçlar kullanılan yöntemlerin farklılığından ileri gelebilir. Poliklonal antikor ve immün boyama yöntemleri kullanılarak alt üriner sistem enfeksiyonundan izole edilen *E.coli* suşlarının idrarda in vivo olarak tip 1 fimbria yaptığı gösterilmiştir. Tip 1 fimbria ayrıca *E.coli*'nin insan üreteral mukoza epitel hücrelerine ve idrarda normalde bulunan Tamm-Horsfall proteini ya da üro-mukoide tutunmasını da sağlamaktadır.

Üriner sistemde bakteriyel adezyonda da yine tip 1 fimbria ekspresyonunun esas rolü oynadığı düşünülmektedir.³³

Mannoza duyarlı adezinler salgısal IgA'da bulunan mannoz ile de etkileşime girmektedirler. Tip 1 fimbria'nın mannoza duyarlı oluşu, D-mannoz içeren glikoproteinlerin oligosakkarid kısımlarının bu fimbria için reseptör oluşturabileceğini düşündürmüştür. Birçok doku sisteminde D-mannoz bulunmaktadır. Üriner sistemde de D-mannoz reseptörlerinin yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir. Tip 1 fimbria yapan *E.coli* suşlarının üro-mukoide kuvvetle adere olmasında bu maddenin mannozdan zengin oluşu rol oynamaktadır.³³

Bakterial aderans, enfeksiyon oluşumunu sağlayan birinci basamaktır. UPEC'ler eksprese ettikleri bir takım fimbriaları ile değişik glikokonjugat reseptörlerine spesifik bağlanma göstererek üriner epitele bağlanmaktadır. Tip1 ve P fimbrialar, *E.coli*'nin üriner sistem enfeksiyonlarının patogenezinde bilinen en önemli oluşumlardandır.³⁵

Tip 1 fimbria yaygın sıklıkta ve alt üriner sistemde, P fimbria ise üst üriner sistem enfeksiyonlarında görülür.³⁶

Tip1 fimbria spesifik D-mannoz glikoprotein içeren reseptörlere bağlanmaktadır. Tip1 fimbria üroepitel dışında; memeli bukkal mukozaya intestinal epitelyum hücrelerine, akciğer ve bronş epiteline, böbrek proksimal tubül hücrelere ve Tamm-Horsfall protein ve sekretuar IgA gibi salgılanabilen glikoproteinlere de bağlanabilmektedir. Tip 1 aderans sonrası granulositlerde respiratuar aktivasyon, mast hücrelerinde degranulasyonu ve epitelial hücrelerden sitokin salınımına neden olduğu gösterilmiştir.

Tip 1 fimbria tüm *Enterobacteriaceae*'ye ait bakterilerde bulunan ince, sert ve tutunma organelleridir. Bunların tutunma özelliği FimH adezinden ileri gelmektedir. FimH adezin idrar yolu sistemi

yüzeyinde olduğu gibi memeli konak dokularında bulunan mannoz içeren glikoproteinleri tanır. Bu da bakterinin hedefe tutunarak üroepitelde kolonize olmasını sağlar. ³⁷

UPEC'de en çok görülen fimbria tip 1, P, ve Dr fimbriadan ibarettir.⁴⁰ P fimbria üriner yolu enfeksiyonu yapan *E. coli*'de bulunurken, S fimbria ise sepsis veya menenjitli yenidoğanlardaki bakterilerde bulunmaktadır. ³⁵

2.3.2. P Fimbria

1970 lerin ikinci yarısında akut pyelonefrit nedenli vakalarda *E.coli* bakterileri de gösterildi. Üriner sistem epiteline yapışma yeteneği vardır. Bu karakteri sıklıkla sistitler ve asemptomatik bakteriürlü vakalarda görülmektedir. İlerleyen yıllarda bu karakterizasyonu hücre yüzeyindeki P tip adezinelere bağlanmasını sağladı. ³⁸

İnsan eritrositlerini aglutine etme özelliğine sahip "mannoza dirençli" bir fimbriadır. P fimbria olarak adlandırılmasının nedeni, özgül olarak eritrosit ve üroepitelyal hücrelerdeki P kan grubu antijenlerine bağlanmasıdır. Bu tip fimbria ancak bazı *E.coli* suşları tarafından belirli çevresel üreme koşullarında yapılır. P fimbrialar üromukoide yapışmazlar ancak üroepitelyal hücrelere yüksek kapasite ile adere olurlar. ³³

P fimbria, **pap** (pyelonefrit ile ilişkili pilus) olarak kodlanmıştır³⁴ ve bu pilus bir veya daha çok PAls denen patojenik ilişkili bölgeler denilen mobil genetik elementler taşımaktadır. Bu P fimbria yapısı hem tip ilişkili protein PapE hemde tip proteini PapF gerektirir ve üroepitelyal hücrelerdeki Gal α (1-4)Gal reseptörlerine bağlanan bir reseptör üretirler.³⁹ P pili özellikle Pap G adezini, pyelonefrit ile ilişkili virulans faktörlerinde önemlidir. ⁴⁰

P fimbriyanın yapısı oldukça kompleks olup, birkaç farklı fimbrial antijen olarak eksprese edilmektedirler. Hem mannoza duyarlı hem mannoza dirençli fimbrialar aynı bakteri suşu üzerinde bulunabilirler. Özel bir grup glikosfingolipid, P fimbria için reseptör rolü oynamaktadırlar.¹¹⁸ Bu glikolipidlerin Gal α 1-4 Gal betafraksiyonu P fimbria için özgül bağlanma bölgesidir. Gal α 1-4 Gal beta reseptörleri; toplama kanalları, renal pelvis, üreter, mesane ve vagina epitellerinde mevcut olup, polimorf nüveli lökositlerde bulunmaz.

Bunlar insan P kan grubunda bulunan globosit dizisinin nötral glikolipitlerine bağlanırlar. Nefritojen *E.coli*'ler ile alakalıdır. P fimbria UPEC'lerde ikinci sırada en çok görülen virulans faktörüdür. Bunlar idrar yolu enfeksiyonları patogenezinde ve pyelonefritte önemli olup, pyelonefritik *E.coli* izolatlarının %80'inde tanımlanmıştır.⁴¹

E.coli bakteriürisinin oluşması için bakterinin mesane mukozasına tutunması çok önemli bir adımdır. Pap geni tarafından kodlanan P fimbria virulans faktörleri olarak değerlendirilirken mekanizması ise daha tartışmalı bir konudur.⁴²

Pap ve Tip 1 geni arasında ters bir ilişki vardır. Tip 1 fimbria in vivo üriner sistem enfeksiyonu sırasında önemli derecede üst düzenleyici iken, pap ise alt düzenleyici olarak rol oynar.³⁴

2.3.3. S- fimbriae

S fimbria adezinlerinin üyeleri sıklıkla ekstraintestinal *E.coli* suşlarında erkeklerde görülür. Bu S fimbria denen adezyon **sfa** I ve sfa II; F1C-fimbria (Foc) ve S/F1C-ilişkili fimbria (sfr) alt tipleri vardır. Tüm üyelerde tanımlayıcı encod proteinleri ve determinantları yüksek oranda benzerdir. Bununla birlikte onların reseptörleri ve doku spesifitesi farklıdır. S fimbrial adezinleri tanımlayan α -sialyl-2-2 β -lactose içeren

reseptörler yaygın olarak sepsis ve menenjit nedenidir fakat ayrıca üriner sistem enfeksiyonu isolatlarında görülür. Oysa F1C fimbrial adezinler β -GalNac-1,4- β -Gal içeren yapılar tercihen üriner sistem enfeksiyon isolatlarında belirtilmiştir. UPEC suşlarında öncelikle Tip 1 Fimbria, P fimbria ve S fimbria fimbrial adezinleri görülür.⁴³

S fimbria; terminal sialyl-galactosid kalıntılarına bağlanması spesifik olduğu için bu isim verilmiştir.³²

2.4. Üriner Sistem Enfeksiyon Tanısı

Klinik ve laboratuvar bulgularının bir bütün olarak ele alınmasıyla konur. Suprapubik duyarlılık ve böbrek bölgesinde ağrı, ateş, üşüme, titreme gibi genel enfeksiyon belirtileri ya da pollaküri, dizüri, sıkışma hissi gibi sistit semptom ve bulguları olan hastalarda laboratuvar testlerine başvurulur.⁴⁴

Rutin olarak sedimentasyon ve C-reaktif protein yükselmesi ve lökositöz akut piyelonefrit lehinedir. Ancak sistitte bu değişiklikler görülmez. Tanıda en önemli laboratuvar yöntemi idrarın incelenmesidir.⁴⁴

2.4.1. İdrarın Mikroskopik Ve Mikrobiyolojik Değerlendirilmesi

Orta akım idrarının mikroskopik incelenmesinde doğrudan gram boyasında her immersiye sahada bir veya daha fazla sayıda lökosit ve bakteri olması, ÜSE için anlamlıdır. Bu 100.000 koloni oluşturan birim (cfu) /ml'lik bakteriüriyi gösterir. Tek bir potansiyel bakterinin 100.000 cfu/ml üremesi ya da piyüri ve semptomlu kadınlarda 100 cfu/ml üremesi anlamlıdır. Örneğin; *S.aureus*'ün üremesi cfu'e bakılmaksızın anlamlıdır.

Klinik semptomlarla birlikte idrar mikroskopisinde bu sayılarda lökosit ve bakteri görülmesi halinde yapılan ekimlerde bakteri sayısı anlamlı sınırın altında (koliform için < 100, diğerleri < 100.000) ise;

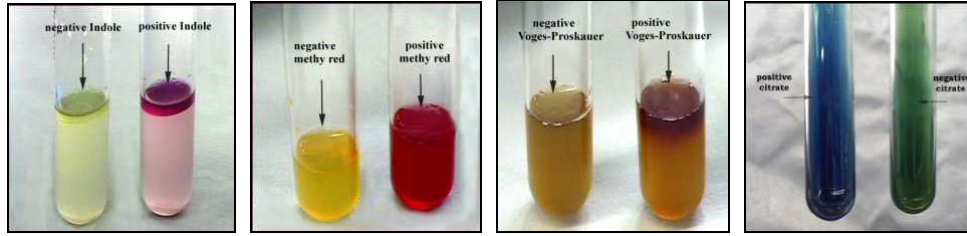
1. Antibiyotik kullanmaktadır ve etken baskılanmıştır.
2. Akut üretral sendrom, *Chlamydia trachomatis* ve *Ureaplasma urealyticum* üretritler de aynı şekilde sonuç verir.
3. *Enterobacteriaceae* dışında etken söz konusu olabilir.
4. Hasta bol sıvı içmekte olup hidrasyondan dolayı idrar dilüedir ve bakteri sayısı düşük çıkabilir.⁴⁴

İdrar kültüründe bakteri saptanması ile ilgili görüşler şu şekildedir.

1. Semptomlu kadınlarda koliform bakteriler söz konusu ise orta idrarda 10^2 cfu/ml, diğer bakteriler için 10^5 cfu/ml bakteri saptanması.
2. Semptomlu erkeklerde orta idrarda 10^3 cfu/ml sayılarındaki bakteriler ÜSE için anlamlıdır.
3. Semptomlu kadın ya da erkeklerde suprapubik aspirasyon ile alınan idrarlarda saptanan her bakteri anlamlıdır.
4. Sürekli sonda kullananlarda 10^2 cfu/ml bakteri ÜSE için anlamlıdır.
5. Semptomsuz erkeklerde idrar kesesinde en az 4 saat beklemiş orta idrarda 10^4 cfu/ml, kadınlarda 10^5 cfu/ml bakteri sayıları anlamlıdır.
6. Çocuklardaki ÜSE'de bakteri sayısı erişkinlere göre daha az bulunur.
7. Yakınmasız hasta orta akım idrarında iki türden çok bakteri saptandığında sayı 10^5 cfu/ml olsa bile genellikle ÜSE yoktur. Bakteriler kontaminanttır.⁴⁵

2.4.2. Biyokimyasal Tanı Yöntemi

E.coli suşlarının tamamı triptofandan indol yaparlar, metil kırmızısı deneyi pozitifdir. Voges-Proskauer testi olumsuzdur. Simons'un sitratlı besiyerinde üremezler. Bu testler, IMVIC testleri adını alır. *E.coli* için IMVIC testleri (+,+,-,-)'dir.



Resim 1: *E.coli* suşlarının IMVIC testlerinin gösterimi.

Fenilalanin deaminaz ve jelatin hidrolizi testlerinde negatif reaksiyon verirler. Üreaz negatiftirler. Triptofandan indol yaparlar, H₂S oluşturmazlar. Potasyum siyanürlü besiyerinde üremezler.

2.4.3. Boyama Yöntemi ile Tanı

E.coli; yaklaşık 2-4 µm boyunda ve 1.0-1.5µm eninde, düz, uçları yuvarlak çomakçık şeklinde bakterilerdir. Gram boyası ile negatif boyanır.



Resim 2: Konvansiyonel ışık mikroskopunda 1000 X büyütmede Gram boyamada *E.coli* ⁴⁶

2.4.4. Ekim Yöntemi ile *E.Coli* Tanısı

Enterobakteriler fakültatif anaeropturlar. En iyi 35 ve 37 °C de ve CO₂ siz ortamda ürerler. Koloniler 18-24 saat sonra görünür hale gelirler. Üretimi için selektif olmayan Kanlı ve Çukulata agar ve Mac Conkey agar gibi selektif besiyerleri kullanılır. Çukulata veya kanlı agarda büyük, gri, düzgün koloniler yaparlar. Kanlı agarda çoğu suşlar hemoliz yapmaz. Fakat *E.coli*'nin bazı suşları kuvvetli hemoliz ürettiğinden kanlı agarda hemoliz yaparlar.



Resim 3: Kanlı agarda *E.coli*.⁴⁷

Mac Conkey agarda laktozu fermente eden türler, laktoz fermentasyonu sonucu oluşan asit nedeniyle düz, parlak, kabarık, pembe-kırmızı koloniler meydana getirirler.



Resim 4: Mac Conkey agarda *E. coli* laktoz fermentasyonu nedeniyle pembe koloniler⁴⁷

EMB besiyerinde laktozu fermente ettiğinden metalik refle veren yeşil-siyah koloniler oluştururlar.



Resim 5: EMB agarda pembe ve karakteristik parlak yeşil renkli *E. coli* kolonileri.⁴⁶

2.5 Beta Laktamazlar ve Gram Negatif Bakterilerde Beta-Laktam Direnci

Beta-laktam antibiyotikler günümüzde en sık kullanılan antibiyotik türevlerinin başında gelir ve penisilin bağlayan proteinler adı verilen enzimlere bağlandıktan sonra bakterilerin hücre duvar sentezini inhibe ederek etki gösterirler. Çok yaygın kullanılmalarının sonucu olarak da beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç giderek artmaktadır. Bakterilerde beta-laktamlara direnç gelişmesine neden olan mekanizmalar ilacın beta-laktamazlarca parçalanması, penisilin bağlayan proteinlerde oluşan değişiklikler ile ilacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasını engelleyen porin değişikliklerine bağlı geçirgenlik azalması ve/veya aktif pompa (efluks) sistemleridir. ⁴⁸

Enterobacteriaceae ailesi arasında beta-laktam antibiyotiklere karşı direncin en yaygın nedeni beta-laktamaz üretimidir. Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasını hidrolize ederek beta-laktam antibiyotiklerin etkisine karşı mikroorganizmaları korurlar. Bu enzimler GN bakterilerde periplazmik boşluk içinde yer alırlar; beta-laktam halkasındaki siklik amid bağına parçalayan enzimlerdir. ⁴⁸

Beta-laktamazların sayısının artması sonucu farklı zamanlarda birçok sınıflandırma şeması önerilmiştir. Yaygın kabul gören ilk şema 1960'larda Richmond ve Sykes tarafından önerilmiştir. Bu şema 1976 yılında Sykes ve Matthew tarafından izoelektrik odaklamayla beta-laktamazların ayrımı vurgulanarak genişletilmiştir. Zamanla hatalar ve eksiklikler görülünce şema 1989'da Karen Bush tarafından değiştirilmiş ve 1995'te güncellenmiştir. Hem plazmid hem de kromozomal özellikli enzimlerin olduğu bu sınıflandırmada önceki sınıflandırmalarda kullanılan

substrat profili, inhibitör profili, moleküler ağırlığı, hidroliz hızı, bağlanma afinitesi ve izoelektrik nokta gibi özelliklere oksasilin, sefoksitin ve nitrosefinin substrat profiline ve tazobaktam'ın inhibisyon profiline katılmasıyla enzimler dört grupta toplanmıştır (Grup 1-4).

Grup 1 sefalosporinazlar klavulanik asit ile iyi inhibe olmazlar.

Grup 2 genellikle klavulanat tarafından inhibe edilen en geniş grubu oluşturur. Bu enzimler penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize etmelerine göre altı alt gruba ayrılır.

Grup 3 metallo-beta-laktamazlar etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve *p*-kloromerkuribenzoat ile inhibe olurlar, klasik beta-laktamaz inhibitörleriyle inhibe olmazlar.

Grup 4 beta-laktamazlar penisilinazlardır ve yine klavulanik asit ile inhibe olmazlar.

Moleküler düzeydeki mekanizmalara dayanan sınıflamanın ilk temellerini ise 1980 yılında **Ambler** atmıştır. Bu sınıflandırmada beta-laktamazlar A, B, C ve D olmak üzere dört grupta toplanmaktadır. A, C ve D grupları 'serin' enzimlerini içerirken B grubunda 'çinko' enzimleri bulunmaktadır. Sınıf A serin penisilinazları, sınıf B metalloenzimleri, sınıf C serin sefalosporinazları ve sınıf D oksasilini hidrolize eden serin beta-laktamazları içerir.⁴⁸

Beta-laktamazlar direnç geninin kromozom ya da plazmid üzerinde bulunmasına göre iki gruba ayrılırlar: Kromozomal beta-laktamazlar ve plazmid aracılı beta-laktamazlar olup bizim çalışmamızda kullanılacak olan plazmid aracılığı ile beta-laktamazlardır.

Toplum kökenli üriner sistem infeksiyonu nedeni olan *E.coli*'lerde amoksisiline yüksek direnç tüm dünya ülkelerinde görülmektedir. 2003 ECO-SENS raporunda; 16 avrupa ülkesi ve Kanada'da 256 merkezin katıldığı çalışmanın sonuçlarına göre siprofloksasin direnci bu ülkelerde ortalama %2.3 olarak bulunmuştur. Kinolon direnci en yüksek olan ülkelerin ise %19.3 ile İspanya ve Portekiz olduğu görülmüştür. Ülkemizde siprofloksasin direnci %5-20 arasında değişmekte ve üriner sistem infeksiyonlarının ampirik tedavisinde ilk tedavi seçeneği olarak tercih edilmektedir.⁶

Ülkemizde yapılan çalışmalarda toplum kökenli *E.coli*'lerde trimetoprim/sulfametaksazol duyarlılığı %50, siprofloksasinde %80-95 arasında değişmektedir.⁶

2.5.1. Plazmid Aracılı Beta-laktamazlar

Moleküler sınıf A ve D içinde yer alan en geniş kategoriye sahip enzimlerdir. Dereprese mutantların ortaya çıkışından sorumlu genler kromozom kaynaklı olduğundan bakteriler arasında yayılmasında problem olmaz diye düşünülürken son on beş yıldır tipik olarak *Enterobacter* ve *Citrobacter* türlerinde görülen yüksek düzeyde sefalosporinaz üretimi *Klebsiella spp.* ve *E.coli*'de de dikkat çekmeye başlamıştır. Burada problemin dereprese mutantlardan kaynaklanmadığı, söz konusu bakterilerin plazmid kaynaklı AmpC geni taşıdıkları belirlenmiştir. Plazmid kaynaklı sefalosporinazlar (MOX-1, FOX-1, CMY-1, CMY-2, LAT-1, BIL-1, MIR-1) kromozomal AmpC sefalosporinazlarla ilişkilidir. İlk olarak *K.pneumoniae* kökenlerinde saptanan (MIR-1) bu beta-laktamazlar sefoksitin, oksiminosefalosporinler ve aztreonama dirence neden olurlar. GSBL'lerin aksine beta-laktamaz inhibitörlerine de dirençlidirler (MOX-1 hariç) .

Plazmid bağımlı beta-laktamazlar beş başlık altında toplanabilir :

1. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri,
2. Klasik OXA ve PSE enzimleri ve daha nadir dar spektrumlu enzimler,
3. TEM ve SHV türevi GSBL'ler,
4. TEM ve SHV'den kaynaklanmayan GSBL'ler ve
5. İnhibitör dirençli TEM mutantları.⁴⁸

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar ayrı başlık altında anlatılacaktır.

2.6. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar

GN bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde en önemli mekanizma beta-laktamaz üretimidir. Her türde beta-laktam antibiyotik günümüzde sayıları 350'yi aşan değişik beta-laktamazlardan bir ya da daha fazlası tarafından hidrolize uğratarak inaktif hale dönüştürülebilir.⁴⁹

Antibiyotik kullanımı ile direnç gelişimi arasındaki en iyi örneklerden biri yeni beta-laktam antibiyotiklerin geliştirilerek klinik kullanıma sunulması ve yaygın kullanımını takiben bakterilerin bu antibiyotiklere direnç geliştirmeleridir. 1980'li yıllarda klinik kullanıma giren "genişlemiş spektrumlu" sefalosporinlerin özellikle nozokomiyal kökenli GN enfeksiyonlarda yaygın biçimde kullanımı bu antibiyotiklere karşı da bakterilerin etkili enzimler üretmelerine yol açmıştır. Direnç gelişen antibiyotikler içinde "oksiimino aminotiozil sefalosporinler" (sefotaksim, seftriakson ve seftazidim) ve aztreonam başta gelmektedir.⁴⁹

Bu antibiyotiklerin etki spektrumlarının genişliği nedeniyle, bunların hidrolizine yol açan beta-laktamazlar da “genişlemiş spektrumlu” ön adıyla adlandırılmışlardır.⁴⁹

GSBL, mikrobiyolojik olarak oksiminino sefalosporinleri hidrolize edebilen, klavulanik asit tarafından inhibe olabilen enzimler olarak tanımlanmaktadır. Ancak son yıllarda GSBL kategorisinde değerlendirilen bazı enzimlerin tam olarak bu tanıma uymadıkları gözlenmektedir. Çoğu GSBL, enterik GN bakterilerin klasik plazmid kökenli beta-laktamazları olan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1’den köken alır.⁴⁹

Köken alınan ana enzimin moleküler yapısındaki aminoasitlerden bir ila dördünün yerine farklı aminoasitlerin gelmesi sonucu GSBL’ler oluşur. Enzimin yapısında meydana gelen bu değişiklik, enzim-substrat ilişkisinin sağlandığı aktif bölgede yeni bir modellenmeye yol açarak geniş spektrumlu sefalosporinlerin ve aztreonamın da bu enzimlerin etki spektrumuna girmesini sağlamaktadır.⁴⁹

Yapısal özellikler ve evölüsyon açısından GSBL’ler 9 farklı grup içinde sınıflandırılmaktadır. Bu gruplar TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES/IBC, TLA, BES, ve OXA’dır. GSBL tiplerine ve sayılarına ilişkin en güncel bilgilere <http://www.lahey.org/studies/webt.html> adresinden ulaşılabilir. GSBL’lerin büyük çoğunluğu aktif bölgesinde bir serin molekülü içerir ve Ambler’in moleküler sınıflamasına göre A sınıfında yer alır.⁴⁹ GSBL’lerin enzim karakterizasyonu Tablo 2’te gösterilmiştir.⁵⁰

Tablo 2: GSBL lerin Karakterizasyonu ⁵⁰

Enzim Ailesi	TEM	SHV	CTX-M
Ailedeki Toplam Sayı	118	47	26
GSBL'lerin Sayısı	92	45	26
GSBL varyant sayısı	73 TEM-1 varyantı 19 TEM-2 varyantı	32 SHV-1 varyantı 13 SHV-2 varyantı	26

OXA grubu enzimler ise D moleküler sınıfında yer almaktadırlar. Beta-laktamazların biyokimyasal özelliklerinin ön planda tutulduğu Bush-Jacoby- Medeiros sınıflamasına göre ise GSBL'ler 2be, 2e ve 2d alt gruplarına sokulmaktadır. ⁴⁹

GSBL'ler oksimino sefalosporinler ve aztreonamın yanısıra birinci kuşak sefalosporinleri ve geniş spektrumlu olanlar dahil penisilinleri de hidrolize uğratırlar. Ancak bu enzimlerin sefamisin grubu sefalosporinlere (sefoksitin ve sefotetan) karşı etkisi yoktur. Sefamisinlere etkili olmamaları, GSBL'leri AmpC tipi beta-laktamazlardan ayıran önemli karakteristik özellikleridir. Ancak yine de istisnai durumların söz konusu olabileceği unutulmamalıdır. Örneğin TEM-52'nin moksalaktam ve sefotetan'ı hidrolize uğratabildiği gösterilmiştir. GSBL'lerin büyük çoğunluğu, özellikle de TEM ve SHV kökenli olanlar, plazmidler tarafından sentez edilmekle birlikte, kromozomlar aracılığıyla sentezlenen veya integron kökenli çok sayıda GSBL de mevcuttur. Günümüzde tüm beta-laktamazlar içinde sayıları en hızla artan beta-laktamaz gruplarının başında GSBL'ler gelmektedir. ⁴⁹

E.coli bir kromozomal *ampC* geni içerir bu gen ampisillin'e duyarlılığı sağlar. *AmpC* aşırı üretilen suşlar ampisillin'e direnci değil genellikle geniş spektrumlu sefalosporinlere duyarlılığı azaltmaktadır.

2.6.1. Sık Rastlanılan Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar

GSBL'ler penisilinler ve sefuroksim, sefotaksim, seftriakson, seftizoksim, seftazidim, sefpirom ve sefepim gibi oksiminoaminotiazolil sefalosporinleri hidroliz etmektedir. Karbapenem ve sefamisinler ise bu enzimlere dayanıklıdır.⁵¹

GSBL ilk olarak 1983 yılında Almanya'da bildirilmiştir. 1987 yılında Fransa'da da bildirildikten sonra 1991 yılından itibaren de bütün dünyada bildirilmeye başlanmıştır. Halen pek çok sayıda ve çeşitli GSBL enzimi ve bunların üretimini düzenleyen mekanizmalar mevcut olup, GSBL bütün dünyada hızlı bir şekilde artmaktadır.⁵¹

GSBL oluşturan suşlarda en sık rastlanan beta-laktamazlar TEM, SHV ve CTX-M genleridir.⁵²

GSBL'leri aşağıda belirtildiği gibi altı gruba ayırmak mümkündür.⁵¹

1. TEM ve SHV kökenli olanlar: Bugüne kadar 130'dan fazla TEM türü ve 50'yi aşkın da SHV türü beta-laktamaz tanımlanmıştır. Bu enzimlerdeki aminoasit değişiklikleriyle GSBL'ler oluşmaktadır. GSBL fenotipi gösteren ilk TEM türü TEM-3' tür ve 1987 yılında bildirilmiştir. TEM grubu beta-laktamazlar; *E.coli* ve *K.pneumonia* başta olmak üzere *E.aerogenes*, *M.morganii*, *P.mirabilis* ve *Salmonella spp* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde sık bulunmaktadır.^{51,53}

Enterobacteriaceae'da en sık bulunan Grup A beta-laktamazlar TEM-1 ve SHV-1 olarak tanımlanmıştır.¹⁰³

SHV türü enzimlerin geniş spektrumlu ilk türeği ise 1983 yılında bulunmuş ve SHV-2 olarak tanımlanmıştır. TEM grubu GSBL' lere kıyasla SHV-1 den köken alan enzimlerin sayısı daha düşüktür. Ayrıca aminoasit değişikliği olan pozisyonlar da daha azdır. GSBL fenotipi gösteren SHV türlerinin çoğunda karakteristik değişiklik, 238' inci pozisyondaki glisin aminoasidinin yerine serin'in girmesidir. SHV grubu enzimler *K.pneumoniae*, *C.diversus*, *E.coli* ve *P.aeruginosa*'da bildirilmiştir.⁵¹

TEM ve SHV kökenli GSBL'ler kolaylıkla yayılabilir olmaları dolayısıyla hastane enfeksiyonlarında önemli bir problem oluşturmaktadır.⁵¹

2. TEM ve SHV kökenli olmayanlar: Plazmid kaynaklı bu enzimler klavunalata dirençli olup moleküler sınıflamada A grubuna dahildir. Bu enzimler MEN-1, MEN-2, CTX-M1, CTX-M2, PER-1, PER-2, VEB-1 ve TOHO-1'dir.⁵¹ TEM ve SHV dışı GSBL'ler arasında CTX-M en sık görülen beta laktamazdır.¹¹⁶

2.6.1.1. TEM Kökenli GSBL'ler

Plazmid kökenli bilinen en eski enzim olan TEM-1 bakteride ampisilin, penisilin ve 1. kuşak sefalosporin direncine neden olur.^{49,54} Bu enzim *E.coli*'deki ampisilin direncinin % 90'ından sorumludur. TEM-1'in yapısındaki bir aminoasit değişikliği (39. pozisyondaki glutamin yerine lizinin geçmesi sonucu) oluşan TEM-2'nin substrat yapısı TEM-1 ile aynıdır. Bu nedenle bu enzim bir GSBL olarak kabul edilmez. Ancak 12 farklı pozisyonda oluşan aminoasit de değişiklikleri günümüzde 120'ün üzerinde TEM kökenli GSBL'nin⁵⁵ ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu enzimlerin bir kısmı 'inhibitör dirençli TEM (IRT)' türünde enzimler olup,

geniş spektrumlu sefalosporinleri inhibe etmediklerinden ötürü gerçek anlamda GSBL olarak kabul edilmezler.⁵⁴ Bu son sayılan enzimler adlarından da anlaşılacağı üzere, klasik GSBL'lerin aksine beta-laktamaz inhibitörlerinin etkilerine (özellikle sulbaktam ve klavulanat) karşı dirençlidirler. Ancak, tazobaktam bu enzimleri inhibe edebilmektedir.^{49,56}

Günümüzde 20'den fazla IRT tanımlanmış durumdadır. TEM kökenli GSBL'ler en sık *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de tanımlanmış olmakla birlikte, enterik ve non-enterik pek çok bakteride de bulunabilecekleri bildirilmiştir. Bu bakteriler arasında *Enterobacter*, *Proteus* ve *Salmonella* türleri, *P.aeruginosa* ve *Capnocytophaga ochracea* sayılabilir. IRT'ler de benzer şekilde en sık *E.coli*'de, daha seyrek olarak *Klebsiella*, *Proteus* ve *Citrobacter* türlerinde tanımlanmıştır.⁵⁴

2.6.1.2. SHV Kökenli GSBL'ler

Bu grup enzimlerin öncüsü olan SHV-1 en sık *K.pneumoniae*'de bulunur ve bu bakterideki plazmid aracılığıyla gelişen ampisilin direncinin yaklaşık % 20'sinden sorumludur. SHV kökenli GSBL'lerin sayısı TEM kökenli olanlara kıyasla daha az olup, günümüzde sayıları yaklaşık 50⁽⁵⁵⁾ civarındadır. Bu enzimlerden sadece bir tanesi (SHV-10) 'inhibitör dirençli' özellik göstermektedir. SHV kökenli GSBL'ler *K.pneumoniae* dışında *Citrobacter diversus*, *E.coli* ve *P. aeruginosa*'da da tanımlanmıştır.^{49,54}

Kromozomal bir enzimdir. Ampisilin, tikarsilin ve piperasilin'e direnç oluşturmaktadır. Oksimino- sefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur. Bu enzimlerde karakteristik değişiklik 238. pozisyonda glisin yerine serin girmesidir.⁴

2.6.1.3. CTX-M Tipi GSBL'ler

Almanya, Fransa ve Arjantin'de 1990'ların başında sefotaksime seftazidimden daha yüksek düzeyde direnç gösteren GSBL üreten GN bakteriler tanımlandı. Ambler sınıf A beta-laktamazlardan olan bu enzimler sefotaksimi yüksek düzeyde etkilediğinden CTX-M olarak adlandırıldı. Esas olarak *Salmonella enterica serovar typhimurium* ve *E.coli*'de bulunmakla birlikte diğer *Enterobacteriaceae* türlerinde de tanımlanmışlardır.⁴⁸ Aminoasit dizilerine göre beş farklı grupta toplanırlar:

- **CTX-M-1 grubu** (CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -29, -30, -32, -33, -28, -36, -54 ve UOE-1),
- **CTX-M-2 grubu** (CTX-M-2, -4, -6, -7, -20, -31, -44 (önceden TOHO-1'di) ve FEC-1),
- **CTX-M-8 grubu** (CTX-M-8 ve CTX-M-40),
- **CTX-M-9 grubu** (CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -18, -19, -24, -27, -45 (önceden TOHO-2 idi), -46, -47, -48, -49 ve CTX-M-50)
- **CTX-M-25 grubu** (CTX-M-25, -26, -39 ve CTX-M-41).⁴⁸

CTX-M tipi beta-laktamazlar son 4 yıl içinde dünyada enterobakteriyel türlerde gittikçe artarak bulunmaktadır. Sefotaksime karşı daha aktif ve seftazidime karşı daha küçük aktivite göstermektedir.⁵⁵ 55'ten fazla CTX-M tipi beta-laktamaz tanımlanmıştır.¹¹⁵

CTX-M beta-laktamaz üreten organizmalar sefotaksim gibi oksiiiminocefalosporinlere direnç kaynağı olarak dünyada görünmektedir. Aynı zamanda bu suşların laboratuvar saptamasının iyi olmadığı belirtilmiştir. CLSI, GSBL testleri için hem kontrol hem de klinik suşlarında sefopodoksimli, hem sefotaksim hem seftazidime'li klavulanatlı saptanır ve doğrulama testleri de kullanılmasını önermektedir.⁵⁷

Bu enzimler özellikle sefotaksimi substrat olarak tercih eden özelliğe sahiptirler. Başlıca *Salmonella typhimurium* ve *E.coli*'de tanımlanmış olmakla birlikte diğer bazı enterik GN bakterilerde de gösterilmişlerdir. Otuzdan fazla değişik tipi bulunan bu enzimler TEM ve SHV kökenli enzimlerle en fazla %40 civarında benzerlik göstermektedirler. Bu grup enzimin en önemli özelliği sefotaksimi seftazidime kıyasla çok daha iyi hidrolize edebilmesidir.^{49,54} Benzer şekilde 1. kuşak sefalosporinlere benzilpenisiline kıyasla daha yüksek afinite gösterirler. Bu enzimi taşıyan mikroorganizmalar seftazidime klinik açıdan anlamlı direnç göstermezler. CTX-M türü enzimler yakın zamanda ülkemizde de gösterilmiştir.⁴⁹

Toplum kökenli enfeksiyonlu hastalarda izole edilen GSBL pozitif *E.coli*'lerin %70'inde CTX-M tipi bulunmaktadır.⁵⁸

Amerika'da yapılan bir çalışmada; *E.coli* isolatlarında GSBL'dan en yaygın olarak TEM ve SHV türleri rapor edilmiştir. Amerika dışında ise; CTX-M türü GSBL lerde *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *E. coli*, and *Klebsiella pneumoniae* klinik isolatlarda rapor edilmiştir. Bu çalışma ile Amerika'da CTX-M benzeri GSBL ler ilk kez rapor edilmiştir.⁵⁹

CTX-M enzimleri en yaygın plazmid aracılı TEM ve SHV beta-laktamazlarla %40 ya da daha az homoloji gösterir. Bilinen aminoasit dizileriyle %70-75 arasında olan en iyi benzerlik skoru *K.oxytoca*, *Proteus vulgaris* ve *C.diversus*'ün sefalosporinleri hidrolize eden kromozomal enzimleriyle gözlenir. CTX-M tipi beta-laktamazların genişlemiş spektrumlu aktivitesinde anahtar role CTX-M enzimlerinde değişmeden var olan 237. pozisyondaki serin rezidüleri katkıda bulunmuştur. Tazobaktam bu enzimlere karşı klavulanata göre yaklaşık 10 kat daha fazla inhibitör etkiye sahiptir.⁴⁸

2.6.2. GSBL'lerin Laboratuvarda Saptanması

GSBL'lerin laboratuvarda saptanması bazı sorunlar içermektedir. Normalde belli bir GSBL taşıyan bakterinin geniş spektrumlu sefalosporinlerden birine veya aztreonama dirençli olması beklenirken, in-vitro olarak saptanan minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından önerilen direnç sınırlarına erişmeyebilir. Bu nedenle CLSI bir tarama yöntemi önermektedir.⁴⁹ Buna göre eğer bir bakteri 1 µg/ml konsantrasyonda seftazidim, sefotaksim ya da sefriakson içeren sıvı besiyerinde ürerse (MİK 2 µg/ml), bu bakterinin GSBL sentezlediğinden şüphe edilmelidir. Fenotipik doğrulama testi sefotaksim veya seftazidimin 4 µg/ml yoğunlukta klavulanik asitle birlikte veya tek başına değerlerini saptamak yoluyla yapılır. Eğer klavulanik asit ilavesi MİK değerinde 3 dilüsyonluk bir azalmaya neden olursa GSBL varlığı doğrulanmış olur. Bu tür bakteriler duyarlılık sonuçları ne olursa olsun tüm geniş spektrumlu sefalosporinlere ve aztreonama karşı dirençli kabul edilmelidirler.^{49,54}

CLSI doğrulama testlerinin sadece *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *K.oxytoca* için geçerli ve güvenilir olduğu unutulmamalıdır.⁴⁹

Özellikle kromozomal AmpC türü beta-laktamaz taşıyan bakterilerde bu enzimlerin klavulanik asidi etkileyerek test sonuçlarında yanılgıya neden olabilecekleri unutulmamalıdır.⁴⁹

GSBL saptanması için önerilen başka testler de mevcuttur. Bunlar arasında çift disk sinerji testi, üç boyutlu test, E-test ve Vitek otomatize duyarlılık testi sayılabilir. Bunlar dışında çeşitli moleküler yöntemler de GSBL saptanması amacıyla kullanılabilir.^{49,54}

2.6.3. GSBL'lerin Epidemiyolojisi

GSBL sentezleyen bakteriler dünyanın değişik ülkelerinde hastaneye yatan hastalarda farklı sıklıkta sorun olarak ortaya çıkabilmektedirler.⁴⁹

Oksiimino beta laktamazlara (seftazidim, sefotaksim, seftriakson ve aztreonam) direnç gelişimi artan sayıda GSBL lere bağlıdır. *Enterobacteriaceae*'da GSBL prevalansı dünyada %74, ülkemizde ise oran *E.coli*'de %14,7, *Klebsiella*'da %53,3 tür.⁶¹

Ülkemizdeki hastanelerin çoğunda GSBL sentezleyen *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* izolatları ciddi birer enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.6.4. GSBL Sentezleyen Bakterilerin Klinikte Neden Olduğu Sorunlar

Direnç

GSBL sentezleyen bakterilerin klinikte neden olduğu sorunların başında bu enzimleri sentezleyen bakterilerin yol açtığı direnç problemi gelmektedir. Daha önceden de belirtildiği üzere bu enzimlerden birini sentezlediği saptanan GN bakteri tüm geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençli kabul edilmelidir.^{49,54,62} Öte yandan bu enzimleri kodlayan plazmidler aynı zamanda pek çok beta-laktam dışı antibiyotiğe karşı da genetik materyal taşımaktadırlar. Dolayısıyla GSBL taşıyan bakterilerde başta aminoglikozitler olmak üzere kinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim-sulfametoksazol direnci de eşzamanlı olarak bulunabilmektedir.⁴⁹

Hastaların Kolonizasyonu

Hastanede yatan hastalarda GSBL sentezleyen bakterilerle kolonizasyon riskini artıran çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır.^{60,63} Bunlar arasında uzun süreli antibiyotik kullanımı, uzun süreli yoğun bakımda yatma, huzurevinde kalıyor olma, altta yatan ciddi ve ağır hastalık varlığı, hastane içinde geniş spektrumlu sefalosporinlerin yaygın ve fazla miktarda kullanımı, invaziv işleme maruz kalma, acil abdominal cerrahi, nazogastrik, gastrostomi veya jejunostomi tüpü kullanımı, ventilatör uygulanması, intravasküler kateter kullanımı ve düşük doğum tartısı sayılabilir.⁴⁹

Laboratuvarda GSBL Saptanmasında Zorluklar

Yukarıda da belirtildiği üzere, GSBL sentezleyen bir bakteri, sentezlediği enzimin farklı sefalosporinlere afinitesinin değişik olması ve inokulum etkisi gibi nedenlerle 3. kuşak sefalosporinlere duyarlı gibi gözükabilir. Ancak bu bakterinin neden olduğu hastalık eğer üriner enfeksiyon dışında bir enfeksiyonsa 3. kuşak sefalosporin tedavisi başarısızlıkla sonuçlanacaktır.⁴⁹

Seftazidime yüksek afinite gösteren GSBL'lerin daha sık rastlandığı bir yerde laboratuvarın sefotaksim veya seftriaksonu rutin duyarlılık testlerinde kullanılan 3. kuşak sefalosporin olarak tercih etmesi GSBL saptanmasını önemli boyutta güçleştirecektir.

Morbidite Ve Mortalite

GSBL sentezleyen bakteri enfeksiyonlarının tedavisi konusunda yapılmış prospektif kontrollü çalışma yoktur. Ancak, pek çok retrospektif çalışmada GSBL varlığının mortalite ve morbiditeyi olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir.^{49,64}

Enfeksiyon Tedavisi

Sefoksitin gibi sefamisin türevleri diğer sefalosporinlere kıyasla GSBL'ler tarafından inaktive edilmeye daha dirençlidirler. Buna rağmen GSBL üreten bakterilerle meydana gelen ciddi enfeksiyonların tedavisinde sefoksitin kullanılamaz. Bunun nedenleri arasında *K.pneumoniae*'nin tedavi sırasında porin kaybına bağlı direnç geliştirmesi veya bazı enterik GN'lerin GSBL sentezi yanısıra sefamisin türevlerini de hidrolize edebilen kromozomal beta-laktamazları sentezlemeleridir.^{49,65}

Bir 4. kuşak sefalosporin olan sefepim özellikle SHV kökenli GSBL'lere dirençlidir. Ancak bu antibiyotik de artan beta-laktamaz yoğunluğu karşısında inokulum etkisine maruz kalarak inaktive edilmektedir. Ayrıca sefepim kullanımındaki artışın GSBL üreten bakterilerle salgına neden olabileceği de gösterilmiştir. Bu nedenlerden dolayı sefepimin GSBL üreten mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde öncelikle kullanılmaması gerektiği vurgulanmaktadır. Eğer kullanılacaksa yüksek dozlarda ve mümkünse etkili olabilecek diğer antibiyotiklerle (kinolon ya da aminoglikozidler) birlikte kullanılması önerilmektedir.⁶⁶

Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri bu tür enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilirler.⁶⁷ Çeşitli klinik çalışmalarda bu ajanların GSBL üreten bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde etkili oldukları gösterilmiştir.^{49,68} Ancak bazı mikroorganizmalar birden çok beta-laktamazı birlikte sentezleyerek veya aynı beta-laktamazı yüksek miktarlarda üreterek beta-laktamaz inhibitörlerine karşı da direnç gelişmesine neden olabilirler.⁶⁹ İnhibitör dirençli beta-laktamaz diğer inhibitörlerin aksine tazobaktama karşı duyarlıdır.^{56,65,70} Beta-laktam dışı antibiyotiklerin GSBL üreten bakteri enfeksiyonlarında kullanılması başlangıçta çekici bir görüş olarak öne sürülmüşse de, daha önceden de

belirtildiği üzere bu bakterilerin çoğu kere çoklu direnç göstermeleri nedeniyle pratikte çok da geçerli olamamıştır.⁷¹ Bu gerekçeyle beta kinolon türevleri ve aminoglikozidler olmak üzere non-betalaktam ajanlar GSBL üreten bakteri infeksiyonlarında ilk tercih olarak kullanılamazlar.
54,72,73

Günümüzde GSBL sentezleyen GN bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde en fazla tercih edilen antibiyotiklerin başında karbapenem türevleri gelmektedir.^{54,73} Karbapenem türevleri sadece plazmid aracılığıyla sentezlenen GSBL veya GSBL dışı enzimlere değil, aynı zamanda kromozomlar aracılığıyla sentezlenen beta-laktamazlara karşı da etkilidir. Karbapenemlerin bu endikasyonda etkinliğini gösteren çok sayıda klinik çalışma mevcuttur. Ancak karbapenemlerin yaygın kullanımına ilişkin sakıncaları da gözardı etmemek gerekir. Bunlar arasında metallokarbapenamaz sentezleyen mikroorganizmalar (*Stenotrophomonas maltophilia* gibi), kromozom aracılığıyla sentezlenen serin proteazların yaygınlaşmaya başlaması (Grup 2f), *K.pneumoniae*'de porin mutasyonu sonucu gelişen karbapenem direnci ve son olarak yaygın karbapenem kullanılan ünitelerde ortaya çıkan karbapenem-dirençli *Acinetobacter*, *S.maltophilia* ve *P.aeruginosa* infeksiyonları sayılabilir.

Enfeksiyon Kontrol Önlemleri

Hastane içinde GSBL üreten mikroorganizmaların yayılımını engellemek için önerilen çeşitli enfeksiyon kontrol yöntemleri mevcuttur. Bunlar arasında izolasyon önlemleri, çevresel dekontaminasyon ve antibiyotik kullanım paternlerinde değişiklik sayılabilir.⁵⁴ Bunlar arasında hastane içinde kullanılan antibiyotiklerin GSBL üreten bakteriler açısından “seçici etki” (“selective pressure”) yaratması söz konusu olabilir. Özellikle

bir salgın sırasında etken mikroorganizmaların poliklonal kökenli olarak saptanması bu tür bir seçici etkiye işaret eder. Klinikte yapılan pek çok çalışmada hastane içinde geniş spektrumlu sefalosporin kullanımının kısıtlanmasının GSBL üreten bakteri infeksiyonlarında azalmaya ve salgınların kontrol altına alınmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde yaygın beta-laktam dışı geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ile GSBL sentezleyen bakteri salgınları arasında da anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Hastane içinde geniş spektrumlu sefalosporin kullanımı kısıtlanarak yerine karbapenem veya piperasilin-tazobaktam kullanımının sağlanmasının özellikle GSBL üreten *K.pneumoniae* infeksiyonlarının önlenmesi açısından etkili olduğu gösterilmiştir.⁷⁴

2.6.5. GSBL Tanısında Kullanılan Antibiyotikler

GSBL üreten *Klebsiella spp.*, *E.coli* izolatları, penisilinler, sefalosporinler veya aztreonama in vitro olarak duyarlı görünmelerine karşın, klinik olarak bu ilaçlarla tedaviye dirençli olabilir. Bu izolatların bazılarında genişlemiş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonam için inhibisyon zonları normal duyarlı popülasyonun altında fakat standart sınır değerlerin üzerinde bulunabilir. Böyle izolatlar penisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler veya aztreonam için sonuç bildirilmeden önce tarama sınır değerleri kullanılarak olası GSBL üretimi için taramalıdır. Diğer izolatlar standart sınır değerleri kullanıldığında bu ilaçlardan bir veya birkaçına orta derecede duyarlı veya dirençli görünebilir. Tüm GSBL üreten izolatlarda test sonucu, tüm penisilinlere, sefalosporinlere ve aztreonama dirençli şeklinde verilmelidir.⁷⁵

GSBL üreten bakteriler rutin duyarlılık deneylerinde sefotaksim, seftriakson, seftazidim ve aztreonama direnç görülmesi ile belirlenebilir.⁷⁶

2.7. Vitek Otomatize Sistem ile GSBL tespiti

Vitek 2 sistemi'nde organizmaların identifikasyonu için biyokimyasal test ve seçici besiyerlerini mikrolitre oranlarında içeren çok küçük özel plastik kartlar tasarlanmıştır.⁸

Vitek 2 (*BioMérieux*) otomasyonu, başlangıç inokulum dilüsyonu, dansite değişimi ve kart doldurma ve kart belirleme işlemlerini içeren örnek işlemini içermektedir. Vitek 2 kartları 64 kuyucuktan oluşmaktadır. Bu kartlar barkodlama sistemi ile seviyelendirilmiş ve cihaza girmeden önce kartları alıp tanımlayan "smart taşıyıcı" bilgisayar çipi kullanmaktadır. Cihaz otomatik olarak kartlarını dolum yerinden okuyucu-inkübatöre taşır ve testin sonunda bir kutuya atmaktadır. Vitek 2 bir defada toplam 60 tane duyarlılık veya identifikasyon kartını (GNS121) uygulamaktadır.⁸

Vitek 32 mikropların tanımlayan ve antibiyotik tahlili yapan tam otomatik bir sistemdir. Vitek 32 aynı modül içinde inkübatör yazıcı ve doldurma onaylama birleşimi bulunur. 32 kart kapasitelidir. Yazılım, el kitabı, renk ölçücü ve pipetler içerir.⁷⁷



Resim 6: Vitek 32 cihazı

Vitek (BioMérieux, Fransa) GSBL test kartları sefotaksim (0,5 µg/ml) ve seftazidimi (0,5 µg/ml) tek başına ve klavulanat (4 µg/ml) ile kombine olarak kullanır. Klavulanat içeren kuyucuklar sefalosporinlerin tek başına olduğu kuyucuklarla karşılaştırıldığında önceden tahmin edilen üremedeki azalma miktarı GSBL varlığını gösterir. Duyarlılık ve özgüllüğü

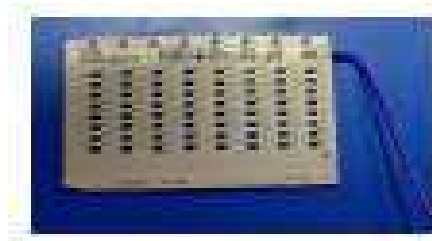
%90'ın üzerindedir. GSBL ve AmpC beta-laktamazlarının her ikisini de üreten *K.pneumoniae* izolatlarında yanlış pozitif sonuçlar gözlenmiştir. *K.peumoniae*, *K.oxytoca* ve *E.coli* dışındaki türlerde bu testin GSBL tespit etmedeki güvenilirliği bilinmemektedir.⁷⁸

Otomatize sıvı bazlı antimikrobiyal duyarlılık testlerinden ülkemizde kullanılan ;

- Vitek 1 (bioMerieux Inc.,St.Louis,Mo.)
- Vitek 2 (bioMerieux Inc.,St.Louis,Mo.)
- Microscan (Dade Behring Inc.,West Sacramento,California)
- Becton Dickinson Phoenix sistemi (BD Diagnostic systems, Sparks, Md.)⁷⁸

2.7.1. Vitek 2 Sistemi (BioMerieux Inc.,St.Louis,Mo.):

Vitek sisteminin daha da geliştirilmesiyle üretilen Vitek 2 sistem 1999 yılında Amerika'da tanıtılmıştır. Bu sistem, kart dolumu gibi aşamaları yaparak, kartları otomatik olarak okuyucu inkübatör sistemine aktarır, işlem bitince kartları otomatik olarak atar. Vitek kartları Resim 7'de gösterilmiştir.⁷⁸



Resim 7: Vitek kartları

19-20 antimikrobiyal ajan bulunan 64 kuyucuklu kart içerir ve 60 izolatın eş zamanlı identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılığını çalışabilir.

Antimikrobiyal duyarlılık test inokulum dilüsyonları, sistem tarafından yapılmakta, organizma ve duyarlılık parametrelerine göre 4-18 saat içinde sonuç vermektedir. Vitek 2 sisteminde antimikrobiyal direnç saptanması, gelişmiş ekspert sistemi (advanced EXPERT system) ile denetlenmekte ve bu 'software' programı sayesinde in vitro test kurallarına göre MİK sonuçları gözden geçirilerek düzenlemeler yapılmaktadır. Bu sistemlerde standardı sağlamak ve hasta kayıtlarını tutabilmek için veri yönetim sistemi olarak adlandırılan Software programı bulunmaktadır. Expert software denen bir programla da spesifik kural ve algoritmelerle sık rastlanmayan direnç paternlerini gösterilmektedir. Bakteriye üreme sıvı besiyerinde turbidimetrik olarak belirlenip, veriler bilgisayara otomatik olarak aktarılabilir. Vitek 2 cihazı Resim 8'de gösterilmiştir.⁷⁸



Resim 8: Vitek 2 cihazı

Vitek 2 ve Phoenix GSBL saptama sistemi Amerika'da hem GSBL doğrulama testi hem de son zamanların uzman sistemi olarak içermektedir. Spanu ve arkadaşları kıyaslamada enzim karakterleri kullanılarak Vitek 2 GSBL doğrulama testinin %98,1 hassas ve %99,7 spesifik olduğunu göstermiştir. Vitek 2 sisteminin yalancı pozitif GSBL testlerine neden olan beta laktamazlardan SHV-1 veya K1'in fazla üretimi tanımlamada Phoenix'ten daha iyi olduğu belirlenmiştir. Genel olarak Vitek 2 sistemi kullanıcılar için daha fazla yorumlamalara, daha fazla seçeneğe sahip olduğundan daha fazla testin tekrarlanmasında önerilmektedir.⁷⁹

Wiegand ve arkadaşlarının manuel saptama prosedürleri ile yarı otomatize mikrobiyolojik sistemler kullanılarak *Enterobacteriaceae*'larda GSBL saptanmasına yönelik yaptıkları çalışmada Phoenix sisteminin %99, Vitek 2 Sisteminin %86 duyarlı, ancak Vitek 2 %78, Phoenix %52 spesifite göstermiştir. ⁸⁰

Lee BY ve arkadaşları *E.coli*'lerde Vitek GNS 121 card ile GSBL saptanmasında; 122 *E.coli* suşunda çift disk sinerji testi (ÇDST) ile Vitek GNS 121 kartı ile yapılan değerlendirmelerde Vitek GNS 121 kartı ile yapılan sonuçların GSBL saptanması sensitivitesi %97, %99 spesifik ve %99 pozitif tahmini değer verdiğini saptamışlardır. ⁸¹

Mehli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; *Enterobacteriaceae* suşlarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 212 *E.coli*, 71 *Klebsiella spp.*, 28 *Proteus spp.* ve 10 *Enterobacter spp.* olmak üzere toplam 321 suşun GSBL enzimi ÇDST ile Vitek2 (bioMérieux) cihazında GN13 kartları ile prospektif olarak araştırılmıştır. GSBL oranları ÇDST ve Vitek2 ile sırasıyla *E.coli*'de % 49 ve % 51, *Klebsiella spp.*'de % 44 ve % 51 olarak bulunmuştur. *Proteus spp.* ve *Enterobacter spp.* suşlarında GSBL tespit edilmemiştir. *E.coli* suşlarında oldukça yüksek GSBL enzimi olduğu görülmüştür. Vitek2 GN13 kartları ile GSBL testinin ÇDST'ne göre duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 94.1 olarak bulunmuştur. ⁶²

2.7.2. Otomatize Sistemlerin Avantajları

Otomatize sistemler, hasta sonuçlarını daha kısa sürede vererek, hastaya uygun antibiyotiğin daha kısa sürede başlanmasını sağlayarak, hastanın hastanede kalış süresini azaltır. Bunun yanı sıra laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası standardizasyonu sağlar. Tür düzeyinde yüksek oranda doğru identifikasyon yapar. Sonuçlar tekrarlanabilir. İç ve dış kalite kontrolü uygulanabilir. CLS'nin önerdiği antibiyotikleri kademeli olarak raporlar. Doğru antibiyotik kullanımını sağlayacak şekilde, antibiyotik duyarlılıklarının raporlanmasında,

düzenleme yapılabilmesine olanak sağlar. Hızlı ve etkin raporlama sağlar. Laboratuvar bilgisayarı ile bağlantı sağlayarak sonuçları aktarır, böylece iş gücünü azaltır. Bilgisayar sistemleri ve yazılım programları sayesinde, hasta, örnek, klinik, izolat ve antimikrobik kemoterapötiklerin duyarlılığı ile ilgili verileri, sınırsız ölçüde depolayabilir. Laboratuvarın belirleyeceği şablonları kullanarak, istatistiksel, epidemiyolojik birçok analizi kısa sürede yapabilir.⁷⁸

2.7.3. Otomatize Sistemlerin Dezavantajları

Otomatize sistemlerin en önemli dezavantajı geleneksel yöntemlere göre, daha pahalı olmasıdır. Ayrıca üretici firmalar tüm sarf malzemelerinin, kendi ürünlerinden kullanılmasını istemekte, aksi takdirde verilerin kalitesinden sorumluluk kabul etmemektedir. Genellikle sistemi üreten firmaların belirlediği antibiyotiklere karşı paneller hazırlanmakta, bunlar dışında çalışılacak antibiyotikler için, manuel çalışılmak zorunda kalınmaktadır. Teknik iş gücünü azaltmasına rağmen kesinlikle kalifiye teknik iş gücünün istihdamını gerekli kılmaktadır. Bu sistemlerde zor üreyen, anaerop ve bazı non-fermentatif bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları yapılamamaktadır. Bu nedenle laboratuvarlarda otomatize cihazların yanı sıra, geleneksel metodlar da bulundurulmalıdır. Cihazlar MİK saptanmasında sınırlı sayıda dilüsyon kullanır ve daha düşük ya da yüksek değerler, yarı kantitatif sonuç olarak verilir. Kısa inkübasyonlu otomatize sistemlerde yalancı duyarlı veya yalancı dirençli sonuçlar alınabilir. Bu kısa süre, tüm bakteri direnç mekanizmalarının (örn: indüklenebilir beta-laktamaz) açığa çıkmasına yetmeyerek saptanmamasına neden olabilir. Bütün sistemlerde, cihaza koymadan önce mikrobiyolog tarafından birçok işlem yapılması gerekir (bakterinin üretilip saflaştırılması, inokulum standardizasyonu gibi). Bu yüzden otomasyon, inokulum yoğunluğunun manuel olarak hazırlanmasından sonra başlar ve inokulum yetersizliği, cihazın performansına etki eden önemli bir parametredir. Vitek 2 sisteminde inokulum standardizasyonu

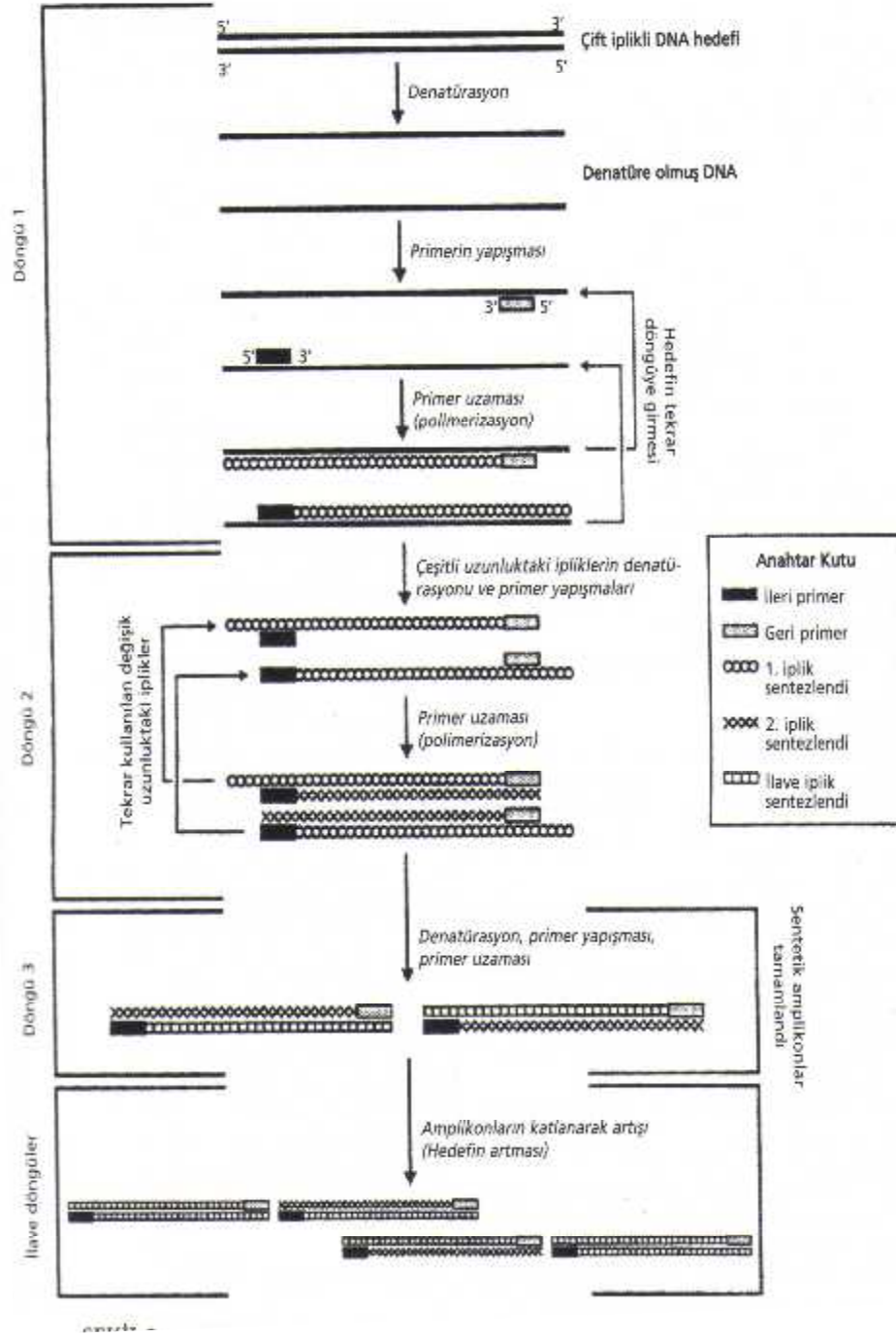
yapılır. Bakım, yer ve elektrik sistemi gerektirirler. Mikrobiyoloji laboratuvarında, yorumlama dışında mikrobiyoloğun düşünme yetisini devre dışı bırakmaktadır. Eğitim veren kurumlarda uzmanlık öğrencisine özgü klasik işlemlerin öğretilmesi için ekstra emek, maliyet ve zaman harcanmasına neden olurlar.⁷⁸

Vitek 2 identifikasyon kartları ile tüm suşların tanımı yapılmıştır. GSBL belirlenmesi de Vitek 2 GN13 kartları ile yapılmıştır. Bu kartlarda sefepim (klavulanik asitli ve klavulanik asitsiz), sefotaksim (klavulanik asitli ve klavulanik asitsiz), seftazidim (klavulanik asitli ve klavulanik asitsiz) olmak üzere 6 kuyudaki antibiyotik kombinasyonları ile GSBL belirlenmektedir. Bu suşlarda her iki test de tekrarlanmış, aynı sonuçlar alınmıştır. Bunun sebebi olarak Vitek 2'de GSBL belirlemek için ÇDST'den farklı olarak, sefepimin de test ediliyor olması düşünülmüştür. Bu verilere göre ÇDST'e göre Vitek 2'nin duyarlılığı %100, özgüllüğü % 94,1 olarak bulunmuştur.⁶²

Sanders ve ark.'da Vitek 2 ve ÇDST ile yaptıkları benzer bir çalışmada GSBL saptanmasında Vitek 2'nin duyarlılığını %98,1, özgüllüğünü %99,4 olarak bulmuşlar, Vitek 2 ile *E.coli* ve *Klebsiella* spp.'da GSBL'nin güvenilir bir şekilde tespit edilebildiğini bildirmişlerdir.^{62,82}

2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PZR, basit in-vitro kimyasal bir reaksiyondur ve hedef nükleik asit ve dizinin sınırsız sentezine olanak sağlamaktadır. Bu işlem uygun koşullarda DNA zincirini koyalayabilen DNA polimeraz aktivasyonuna bağlıdır. (Şekil1).¹⁰³



Şekil 1: PZR hedef amplifikasyon

Basit olarak bir PZR reaksiyonu hedef DNA, iki oligonükleotid primer, ısıya dayanıklı DNA polimeraz, eşit olarak karıştırılmış deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP, dATP, dCTP, dGTP ve dTTP),

MgCl₂, KCl ve bir Tris-HCL tampon içermektedir. Kullanılacak iki primer dizisinin amplifiye olacak çift zincirli DNA dizisine uygun ve tipik olarak yüzde birkaç yüz baz çifti kadar değişebilen büyüklükte hedef zinciri çevreleyen özellikte olması gerekmektedir.

PZR işleminin başında karışım hedef DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılması için ısıtılır ve sonrasında diziyeye spesifik primerlerinin hedef DNA'ya yapışması için ısı düşürülür. DNA polimeraz enzimi daha sonra bağlanmış olan primeri 3' ucundan başlayarak uzatır. Uzatmış primer uzantıları ısıtılma ile hedef DNA'dan ayrılır. İşlem tekrar başa döner ve orijinal gibi her bir ürün bir sonraki aşamalarda oluşacak bağlanma ve uzamalarda kalıp olarak kullanılmaktadır.

Her bir siklusun sonunda PZR ürünleri teorik olarak çift zincir şeklinde olacaktır. Böylece hedef dizi reaksiyonu sonunda 2n kat (n=PZR siklus sayısı) amplifiye edilmiş olacaktır. Tüm işlemler siklus sayıları, reaksiyon karışım tutulacağı zaman ve ısı ayarlarını kontrol eden thermal cycler denilen cihazda gerçekleşmektedir. İdeali, 20 siklus sonundaki 106 katlık amplifikasyona ulaşma ve 30 siklus sonunda 109 katlık amplifikasyon oluşmasıdır. Pratik olarak amplifikasyon, amplifikasyon reaksiyonunun etkili bir şekilde optimize edilmemiş olması veya ortamda DNA polimeraz enzim inhibitörlerinin varlığına bağlı olarak etkili bir biçimde gerçekleşmeyebilmektedir. Böyle vakalarda, e amplifikasyon etkinliği (0=e=1) ve n ise toplam siklus sayısı olmak üzere toplam amplifikasyon (1+e)n şeklinde oluşmaktadır.¹⁰³

PZR temel olarak tekrarlayan üç aşamalı bir yöntemdir.⁸³

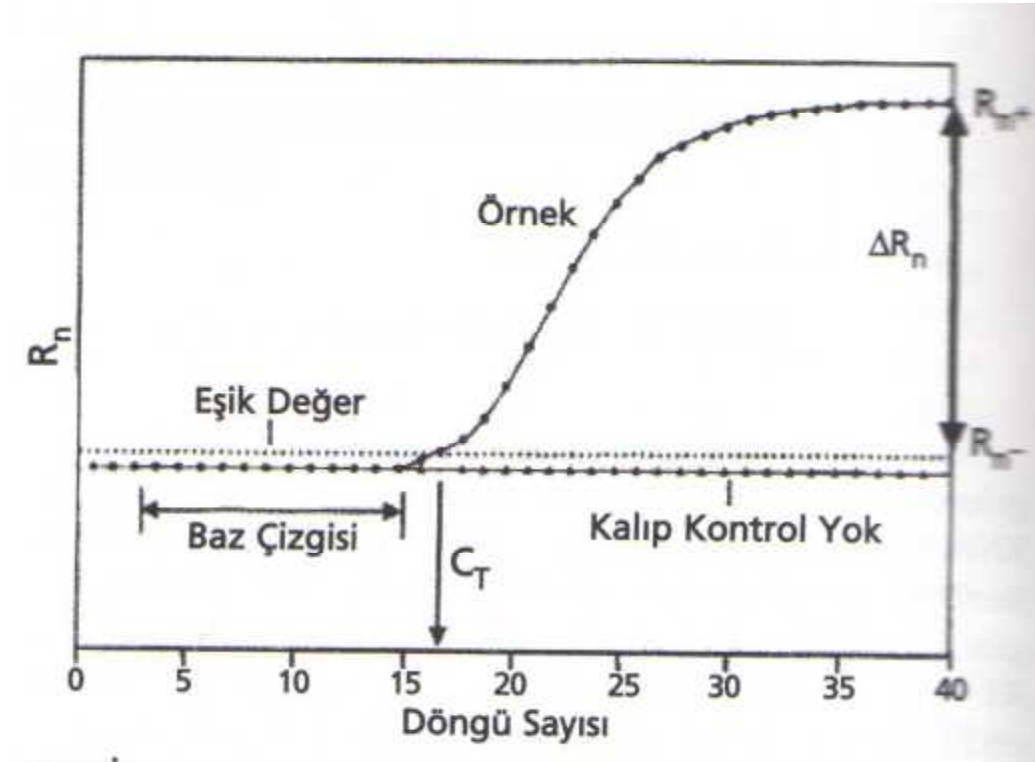
1. Denatürasyon: Çift iplikli DNA'nın birkaç saniye 94-96 °C ısı ile tek iplikli DNA'ya ayrılmasıdır. Bazı çalışmalarda; amplifikasyon siklusları başlamadan önce 3-5 dakikalık bir ön denatürasyon

işleminin, özellikle denatürasyonu zor olan kalıp DNA'lar için yararlı olduğu bildirilmiştir.

2. Bağlanma (annealing): Örnek, birkaç dakika 30-60 °C'de tutularak, primerin ssDNA'daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlanır. bağlanma ısı sadece DNA/DNA eşleşmesine imkan sağlayacak kadar yüksek olmalıdır. Isı, primerlerin yapısı ve Temperature melting (Tm) derecelerine göre hesaplanarak optimize edilebilirse de yaklaşık olarak 20 bç uzunluğuna sahip primerlerin kullanılması halinde 54 °C olarak belirlenmesi optimal sonuçları vermektedir.
3. Uzama (extension): DNA zincirinin komplementerini sentezlenmesi için 65-72 °C'de birkaç dakika beklenir. TaqDNA polimeraz optimal uzama ısısında (72-78 °C) 2000 nükleotid/dakika hızında çalışır. Bağlanma sikluslarını takiben, orijinal DNA segmenti yeni komplementer DNA'lar ve yeni kalıp DNA'lar oluşturur. Böylece her PZR siklusunda mevcut spesifik DNA miktarı iki katına çıkmaktadır. Bu işlem 30 defa tekrarlanarak milyardan fazla hedef DNA eldesi mümkün hale gelir.⁸³

2.8.1. Gerçek Zamanlı PZR

Gerçek zamanlı PZR'da hedef amplifikasyonu ve tespiti aynı tüpte eş zamanlı olarak oluşmaktadır. (Homojen) Bu sistem floresans oluşumunu moniterize eden, belirli optikleri olan özel thermal cyler cihazı gerektirmektedir. Bilgisayarlar her bir reaksiyon ve siklusta oluşan amplifikasyonu gözlemleyen bir yazılım ile desteklenmektedir. (Kinetik)¹⁰³



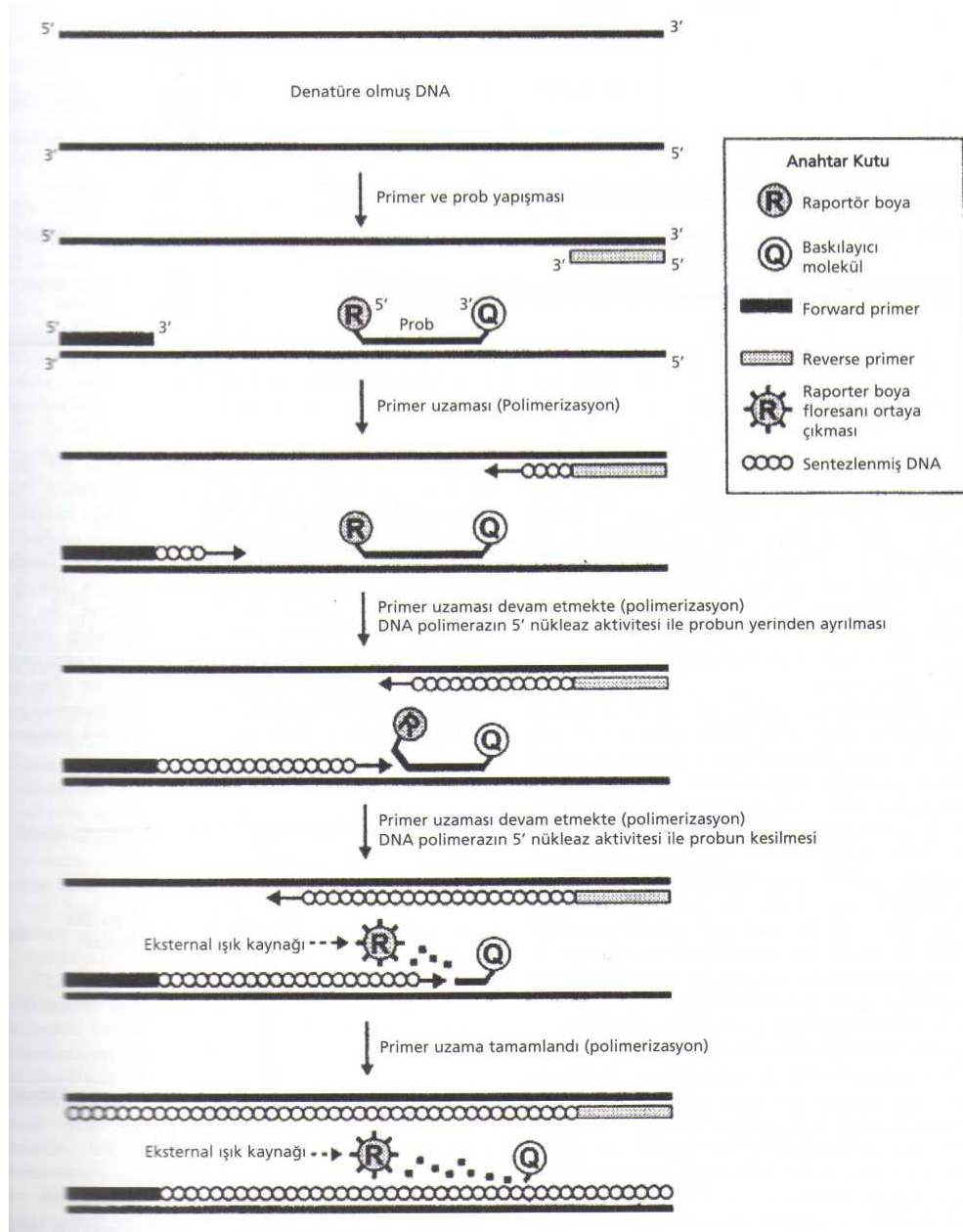
Şekil 2: Gerçek zamanlı PZR amplifikasyon çizimi ve kullanılan terimler.

Şekil 2'de amplifikasyon şeması ve gerçek zamanlı PZR'da kullanılan terimler verilmiştir.

Amplifikasyon platosu her bir siklуста raportörden kaynaklanan floresan sinyali göstermektedir. Siklusun başlangıcında floresan sinyalde küçük değişiklikler olmaktadır. Bu başlangıç sinyal seviyesi plato için baz çizgisi olarak tanımlanır. Baz çizgisi üzerinde oluşan artışlar biriken PZR ürünlerinin tespitini göstermektedir.¹⁰³

En basit biçimde PZR ürünleri çift iplikli DNA'ya ayrıcalıklı olarak bağlanan floresan boyanın kullanımı ile tespit edilebilmektedir. SYBR Green I bu sistemlerde kullanılan boyalardan birisidir. (Şekil 3). Boyanın bağlanmadığı durumlarda floresan nispeten düşüktür. Boya çift iplikli DNA'ya bağlandığı zaman floresan çok yükselir. Tespitin özgüllüğü erime eğrisi analizi ile artırılabilir. Isı yavaşça yükseltildiğinde ampikonların çift zincirleri birbirinden ayrılır ve floresan miktarı azalır.

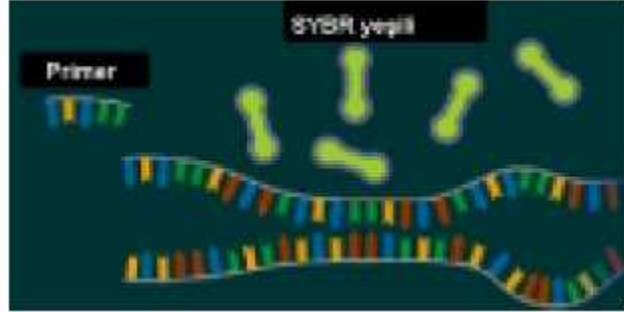
Veriler dönüştürülür ve floresansın ilk türevi y eksenini ısı ekseninde olacak şekilde gösterilerek analiz edilir. Spesifik olarak amplifiye olmuş olan ürünler karakteristik ve bilinen bir erime piki (T_m) vereceklerdir. Primer dimer ve diğer spesifik olmayan ürünler ise farklı bir pik veya geniş bir erime ısı piki vereceklerdir.¹⁰³



Şekil 3: Gerçek zamanlı PZR için SYBR Green ile tespit.

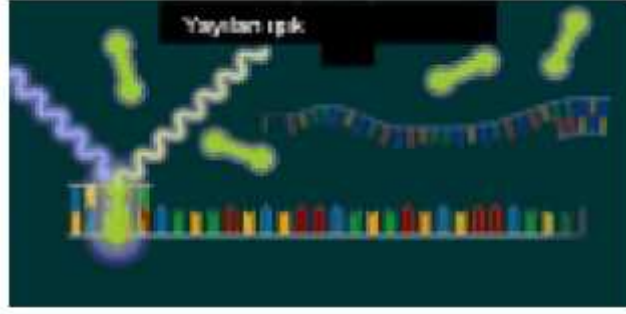
Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalinin ölçülmesiyle kısa sürede, kantitatif sonuç verebilen PZR yöntemiştir. Ticari olarak geliştirilmiş üç tipi bulunmaktadır. Bunlar LightCycler (Roche), TaqMan (PE Biosystem) ve iCycler (BIO-RAD)'dır.⁸⁴

LightCycler sisteminin bir uygulamasında yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (**SYBR Green I**) kullanılarak, amplifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan "SYBR green" miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. Yöntemde oluşan olaylar sırasıyla Şekil 4,5,6 da görülmektedir.⁸⁴



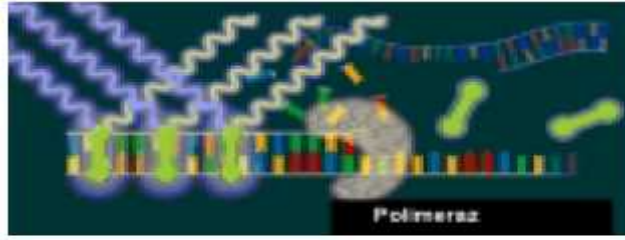
Şekil 4: Başlangıç aşaması.

Amplifikasyonun başlangıcında reaksiyon tüpü içinde "SYBR green" primerler ve denatüre edilmiş DNA ayrı ayrı bulunduğu için floresans yok denecek kadar azdır.⁸⁴



Şekil 5: Primerin hedef moleküle bağlanması.

Primerlerin hedef moleküle bağlanmasını takiben az miktarda “SYBR Green” çift sarmal yapıya katılmakta ve bunun sonucu olarak yayılan floresan miktarı da az olmaktadır.⁸⁴



Şekil 6: Primer uzaması.

Uzama aşamasında yeni sentezlenen çift sarmal DNA'nın yapısında gittikçe fazla miktarda boya katılarak zaman içinde floresans derecesinde artışa neden olmaktadır.⁸⁴

Bu uygulamada, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü, çift sarmal DNA'ya entegre olan SYBR Green ortamda hedef moleküller olmadığında, primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimerleri) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin “Melting Curve” (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü T_m (çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale geçmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PZR amplifikasyonunun ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklarla tüpteki floresan miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca

“SYBR Green” boya serbest kalmakta ve floresan miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresan sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak amplikonun Tm derecesi saptanabilmektedir. Klinik örneğe ait Tm derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrol Tm derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün Tm derecesiyle karşılaştırılarak, PZR sonucunun doğru ve hatalı olduğuna karar verilmektedir.⁸⁴

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Ağustos 2006 – Eylül 2007 tarihleri arasında polikliniklere başvuran hastaların idrar örneklerinde, idrar yolu enfeksiyonu tanısı alan hastalardan klasik yöntemlerle *E.coli* bakteri identifikasyonu, Vitek-32 sistem ile antibiyotik duyarlılığı incelemesi ve GSBL varlığının fenotipik olarak tespiti ve moleküler yöntem olarak PZR ile adezin virulans faktörleri ve GSBL genleri yönünden araştırıldı.

Araştırma için 50 GSBL pozitif, 50 GSBL negatif olan toplam 100 hastada *E.coli* adezin virulans genleri ve GSBL genleri araştırıldı.

3.1. *E.coli*'nin Tanımlanması

Hastalardan alınan idrar örneklerinde aynı anda biyokimyasal ve mikrobiyolojik çalışmalar yapıldı.

Biyokimyasal olarak idrar örneklerinde lökosit esteraz ve nitrit reaksiyonlarına bakıldı. Pozitif reaksiyonlar İdrar Yolu Enfeksiyonu olarak değerlendirildi. bu idrar örnekleri santrifüj edilerek Gram ve Giemsa boyama yapıldı. Gram boyama ile GN bakteriler görüldü. Giemsa ile hücre morfolojisi (lökosit, polimorfo nükleer lökositler) incelendi.

Mikrobiyolojik olarak aynı idrar örneklerinden otomatik pipetlerle 10 µl idrar örneği Kanlı ve EMB agara ekildi ve öze ile agar yüzeyine yayıldı. 24-48 saat süre ile 37°C inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra ilk kontrol değerlendirmesi yapıldı. Son değerlendirmede kültür ve boya örnekleri birlikte değerlendirildi.

Üreme olan kültürlerde koloni sayımları yapılarak 10⁵ cfu/ml bakteri idrar yolu enfeksiyonu olarak isimlendirildi. Kültürden alınan suşlardan yeniden Gram bayama yapılarak doğrulanma yapıldı. Sonra kültürden Kligler besiyerine yatay ve dikey yapıldı. 4-5 saat sonra kontaminasyon kontrolü, glukoz kullanımı, gaz oluşumu, H₂S reaksiyonuna

bakıldı. Ayrıca indol, sitrat ve voges-proskauer reaksiyonlarına bakılarak 24 saat sonra değerlendirildi.

Kligler besiyerinden alınan suşlar antibiyogram değerlendirilmesi için GNS 121 kartlarına çekildi. Vitek-32 cihazı ile çalışıldı ve GSBL üreten suşlar "GSBL pozitif" olarak, GSBL üretmeyen suşlar "GSBL negatif" suşlar olarak raporlandı. GSBL pozitif olan suşlar Kliglerden alınarak Trypticase Soy Broth (%20 Gliserol içeren) besiyerine inokule edilerek 24 saat 37⁰C'de inkübasyon sonrası -20⁰C'de donduruldu.

Vitek-32 cihazı Collage of American Pathology tarafından yılda 4 kere dış kalite kontrol, *E.coli* ATCC 25922 kontrol suşları kullanılarak ayda bir kez internal kalite kontrol yapılarak antibiyogram sonuçları test edilmektedir.

GSBL pozitif olarak tespit edilen bakteriler ve GSBL negatif olan bakterilerin gen araştırılması için SYBR Green ile PZR testi uygulandı.

İstatistiksel değerlendirmede SPSS 10.0 programında X₂ testi kullanılmıştır. İstatistiksel analiz için p<0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

3.1.1. Otomatize Sistem Vitek ile Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve *E.coli* Suşlarında GSBL Üretiminin Tanımlaması

Otomatize bir sistem olan Vitek sistemi (bioMerriex-Fransa) bakterilerin identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testlerini yapmak için kullanılmıştır. Bu sistem, identifikasyon işlemini içerdiği biyokimyasal testlerle gerçekleştirmektedir. Üretici firmanın önerilerine göre 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu kullanılarak GNS121 duyarlılık kartları ile yapıldı. Kalite kontrol kökeni olarak *E.coli* ATCC-25922 kullanıldı. GN bakteri identifikasyonuna yönelik GNS kartları

bulunmaktadır. Bu kartlarla MİK ölçümü yapılan antibiyotikler ve kullanılan Vitek-32 GNS 121 kart içeriği Tablo 3’de belirtilmiştir.

Tablo 3: Vitek-32 GNS 121 Kart İçeriği

1	AMİKASIN
2	AMOKSİSİLLİN-KLAVULANİK ASİT
3	AMPİSİLLİN
4	SEFAZOLİN
5	SEFOTETAN
6	SEFTAZİDİM
7	SEFTRİAKSON
8	SİPROFLOKSASİN
9	GENTAMİSİN
10	İMİPENEM
11	NİTROFURANTOİN
12	PIPERASİLLİN/TAZOBAKTAM
13	TOBRAMİSİN
14	TRİMETOPRİM/SULFOMETAKSAZOL
15	LEVOFLOKSASİN

3.1.2. *E.coli* Suşlarında GSBL Üretimini Fenotipik Yöntemler ile Saptanması

3.1.2.1. Disk Difüzyon Yöntemleri ile Saptanması

3.1.2.1.1. Tarama Testi

E.coli izolatlarında CLSI’nin önerilerine uygun olarak GSBL varlığının araştırılması için tarama testi yapılmıştır.¹¹⁷

Çalışmaya alınan bakterilerin 0,5 Mc Farland eşeline uygun Triptik Soy Broth içinde hazırlanan süspansiyonları Mueller-Hinton Agar (MHA) yüzeyine yayıldı. Agar yüzeyine seftriakson (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftazidim (30 µg), aztreonam (30 µg), amoksisilin + klavulanik asit (30 µg), sefoksitin (30 µg), sefepim (30 µg), tikarsilin – klavulanat (85 µg)

ve ertapenem (10 µg) diskleri yerleştirildi (Şekil 7). Plaklar 18-24 saat 35°C'de inkübe edildikten sonra antibiyotiklere ait inhibisyon zon çapları ölçüldü.

CLSI önerilerine göre inhibisyon zon çapının seftriakson için = 25 mm, sefotaksim ve aztreonam için = 27 mm, seftazidim için = 22 mm olması durumunda tarama testi olumlu olarak kabul edildi. ¹¹⁷



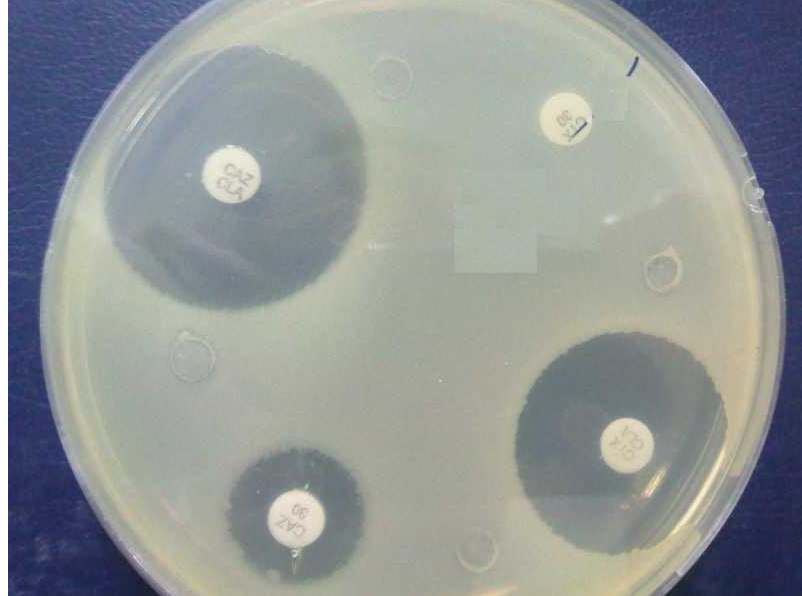
Şekil 7: GSBL pozitif E.coli suşlarına uygulanan Disk Difüzyon Testi

Antibiyotiklerinden herhangi birine karşı dirençli veya duyarlılığı azalmış olarak saptanan 22 adet suşa doğrulama testi yapıldı.

3.1.2.1.2. Doğrulama Testi

Seftazidim/klavulanat ve Sefotaksim/klavulanat kombine disk difüzyon testi

Disk difüzyon yönteminde CLSI önerilerine uygun olarak 0,5 Mc Farland eşeline uygun hazırlanan bakteri süspansiyonu yayılan MHA plaklarına klavulanik asit içeren ve içermeyen sefotaksim ve seftazidim diskleri yerleştirilerek test uygulandı. Testte ticari olarak Sefotaksim/klavulanat (30µg/10µg) ve Seftazidim/klavulanat (30µg/10µg) kombine diskleri kullanıldı. 18-24 saat 35°C'de inkübasyondan sonra klavulanik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırıldı. Kombinasyon diskleri etrafındaki inhibisyon zonu, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki inhibisyon zonuna kıyasla 5 mm veya daha genişlemiş veya zon çapında %50 genişleme olmuşsa, suşlar GSBL üretimi açısından olumlu kabul edildi. (Şekil 8).¹¹⁷



Şekil 8: CAZ-CLA ve CTX-CLA kombine disk difüzyon testi GSBL pozitif *E.coli* Suşu

3.1.3. PZR İçin DNA Ekstraksiyonu

Kanlı agar üzerinde üretilen suşlar, 500 µl steril distile su içerisinde süspanse edildikten sonra 5000 rpm de 5 dk santrifüje edilerek üstteki sıvı döküldü. Çökeltinin üzerine 400 µl erime tamponu (20mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH=8.5) ve 10 µl Pronase E (Serva, Almanya) konuldu ve 42 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Lize olan bakterilerden DNA ekstraksiyonu, fenol-kloroform yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla, süspanسیون üzerine 300 µl fenol:kloroform.izoamil alkol (25:24:1) eklenerek vortekslemlendi ve 12000 rpm'de +4 °C'de 10 dk süre ile santrifüjlendi. Üstteki faz ayrı bir eppendorf tüpüne alındı, üzerine 600 µl isopropil alkol eklenerek vorteksleme ve santrifüj basamakları tekrarlandı. Süpernatantı dökülen tüp üzerine %75 etanol konularak DNA tekrar 12000 rpm'de +4 °C'de 5 dk santrifüj işlemi uygulandı ve alkol döküldükten sonra tüpler kurutuldu. Elde edilen DNA, 500 µl TE tamponu (10mM Tris-HCl, 50 mM EDTA) içerisinde 37 °C'de 10 dk kadar inkübe edilerek süspanse edildi. elde edilen DNA örnekleri çalışma yapılana kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.4. GSBL ve *E.coli* Virulans Faktörleri Genlerinin PZR ile Analizi

SYBR Green I ile Erime Eğrisi Analizi

DNA ekstraksiyonu yapılmış olan bütün örnekler Mx 3000P (Stratagene, ABD) cihazı kullanılarak SYBR Green I ile Erime Eğrisi Analizi ile test edildi. Bu amaçla herbir örnek için aşağıdaki Master Miks ve oligonükleotidler kullanıldı.

10X reaksiyon Buffer	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	6,0 µl
dNTP (2,5 mM)	2,0 µl

PrimerSense ve Antisense (10 pmol)	1 µl
SYBR Green I (50X)	0,5 µl
Hotstart Taq DNA polimeraz (5 U/ µl)	0,2 µl
Distile Su	7,8 µl
Örnek DNA'sı	5,0 µl

E.coli, SYBR Green I Erime Eğrisi analizi için kullanılan oligonükleotidler DNA dizileri tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4: Çalışmada kullanılan DNA dizileri

Gen	Primer dizisi
TEM ⁸⁵	F: KACAATAACCCTGR TAAATGC R: AGTATATATGAGTAAACTTGG
SHV ⁸⁵	F: TTTATCGGCCYTCACTCAAGG R: GCTGCGGGCCGGATAACG
CTX-M ⁸⁶	F: ATGTGCAGYACCAAGTAARGTKATGGC-3' R:ATCACKCGGRTCGCCXGGRAT-3' K=G or T; N=T or C; R=A or G; Y=C or T; X (inosine)=A,C,G OR T
Pap (P fimbria) ⁸⁷	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA
Sfa (S fimbria) ⁸⁷	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTCAAACCTGGCA
fimA (Tip 1 Fimbria) ¹⁹	GTTGTTCTGTCGGCTCTGTC ATGGTGTGGTTCCGTTATTC

Yukarıda açıklandığı gibi hazırlanan örnekler optik tüplere dağıtıldıktan sonra SYBR Green I ile Erime Eğrisi Analizi için aynı cihaza yerleştirildi. Daha sonra aşağıdaki program ile 40 siklus yapılarak PZR işlemi gerçekleştirildi ve program sonuna eklenen Erime Eğrisi analizi ile test tamamlandı.

Ön denatürasyon ve Taq DNA aktivasyonu		5 dk
Denatürasyon	15 saniye	} 40 Cycles
DNA sentezi	1 dk	
Erime Eğrisi Analizi	0.1 °C/saniye	55 °C ? 95 °C

3.2. Çalışma esnasında kullanılan alet ve sarf malzemeler

Bakteri İdentifikasyonu için kullanılan makine ve teçhizat

- Etüv
- Vitek 32 cihazı
- Buzdolabı
- Derin dondurucu
- Mikroskop
- Antibiyotik diskleri (Seftazidim (CAZ), Seftriakson (CRO), Amoksisilin/Klavulanik asit (AMC), Sefoksitin (FOX), Sefotaksim (CTX), Aztreonam (ATM), Sefepim (FEP), Tikarsilin /Klavulanik Asit (TIM), Ertapenem (ETP), Seftazidim /Klavulanik Asit (CAZ+CLA), Sefotaksim /Klavulanik Asit (CTX+CLA)),
- Serum fizyolojik çözeltisi,
- Eküvyon çubuk,
- Müeller Hinton agar besiyeri,
- Cam tüpler,
- Vitec-32 antibiyotik kitleri,
- Kligler besiyeri,
- IMVIC testi,
- Gram boya, giemsa boya,
- Kanlı agar besiyeri,

- Invisorb spin bacteria mini kit,
- Fermentase taq polimeraz,
- 6 farklı primer çifti,
- dNTP,
- PCR tüpü,
- Pipet uçları,
- DNA ladder,
- Loading Dye,
- Agaroz,
- Tae buffer,
- Etidyum bromür,

4. BULGULAR

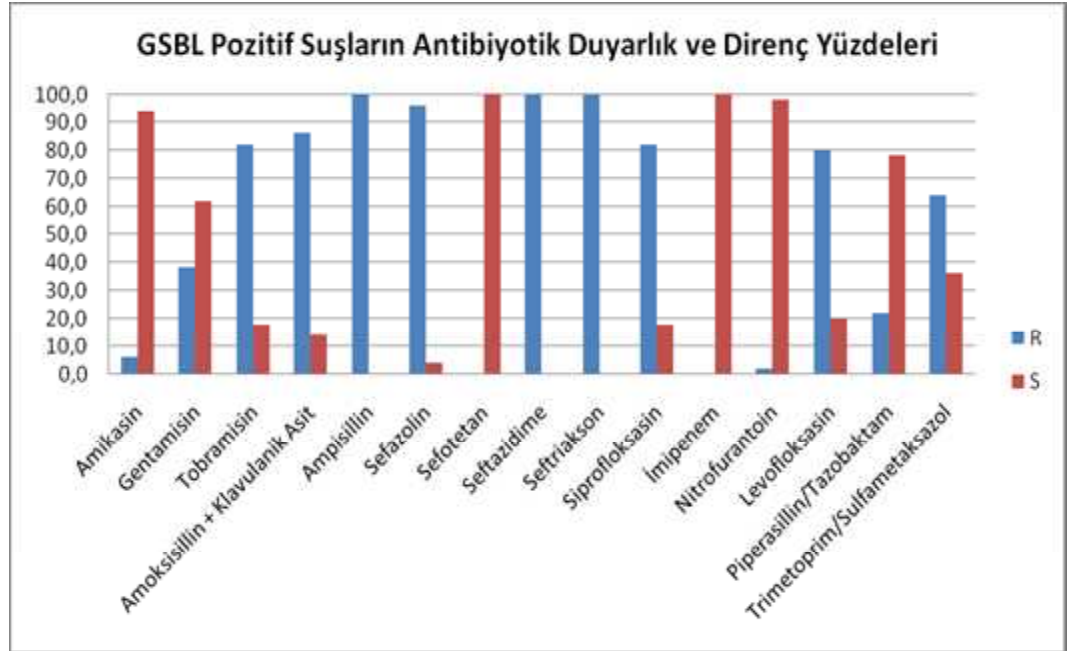
Ağustos 2006 – Eylül 2007 tarihleri arasında polikliniklere başvuran hastaların idrar örneklerinde, idrar yolu enfeksiyonu tanısı alan toplam 100 hastada klasik yöntemlerle *E.coli* tanısı konulması, bu örneklerde fenotipik ve otomatize yöntemlerle antibiyotik duyarlılığına bakılarak 50 GSBL pozitif, 50 GSBL negatif örneklerde moleküler yöntemlerle *E.coli* virulans genleri ve GSBL genleri varlığı araştırılmıştır.

4.1 GSBL Pozitif Suşlarda Bulgular

GSBL pozitif bulunan 50 suşun 50'si (%100,0) ampisillin, seftazidim, seftriakson'a karşı dirençli bulunmuş, 50'sinde (%100,0) ise sefotetan ve imipenem'e duyarlı olduğu belirlenmiştir. Suşların diğer antibiyotiklere direnç ve duyarlılıkları Tablo 5'te, yüzde oranları Şekil 9'da gösterilmiştir.

Tablo 5: GSBL pozitif suşlarda antibiyotik direnç ve duyarlık oranları

Antibiyotik Adı	Direnç		Duyarlı	
	n	%	n	%
Amikasin	3	6,0	47	94,00
Gentamisin	19	38,0	31	62,0
Tobramisin	41	82,0	9	18,0
Amoksisillin –Klavulanik Asit	43	86,0	7	14,0
Ampisillin	50	100,0	0	0,0
Sefazolin	48	96,0	2	4,0
Sefotetan	0	0,0	50	100,0
Seftazidim	50	100,0	0	0,0
Seftriakson	50	100,0	0	0,0
Siprofloksasin	41	82,0	9	18,0
İmipenem	0	0,0	50	100,0
Nitrofurantoin	1	2,0	49	98,0
Levofloksasin	40	80,0	10	20,0
Piperasillin/Tazobaktam	11	22,0	39	78,0
Trimetoprim/Sulfametaksazol	32	64,0	18	36,0



Şekil 9: GSBL enzimi üreten *E.coli* izolatlarının Vitek yöntemi ile kullanılan antibiyotiklere dirençlilik ve duyarlılıklarının yüzde (%) oranları

GSBL pozitif suşlarda disk difüzyon yöntemi ile yapılan tarama testinde bütün suşlar Ertapeneme duyarlı olarak tespit edilmiştir. Tarama testinde şüpheli olarak belirlenen suşlarda kombine disk difüzyon yöntemi ile doğrulama testleri yapılmıştır.

Vitek ile GSBL pozitif tespit edilen 50 adet suşun CLSI önerileri doğrultusunda tarama ve doğrulama testi sonucu bulguları Tablo 6'da gösterilmektedir. Çift disk sinerji testinde 50 adet suşun 44'ünde (%88) GSBL pozitif, kombine disk difüzyon testinde 50 suşun 45'inde (%90) GSBL pozitif bulunmuştur.

Tablo 6: Disk Difüzyon Yöntemleri ile doğrulama bulguları

Suş No	CTX	CAZ	CRO	ATM	FEB	FOX	ESBL
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	-	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	-	-	-	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+
9	+	-	+	-	-	-	+
10	+	+	+	+	+	-	+
11	+	+	+	+	+	-	+
12	+	+	+	+	+	+	+
13	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	-	+
17	+	+	+	+	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	-
19	+	+	+	+	+	-	+
20	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	-	+
23	+	+	+	+	+	-	+
24	+	+	+	+	+	-	+
25	+	+	+	+	+	+	+

Suş No	CTX	CAZ	CRO	ATM	FEB	FOX	ESBL
26	+	+	+	+	+	-	+
27	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	-	+
29	-	-	-	-	-	-	-
30	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	-	-	+
32	+	+	+	+	-	-	+
33	+	+	+	+	+	-	+
34	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+	-	+
36	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+
38	+	-	+	+	+	-	+
39	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	-	+
41	-	+	-	+	-	-	+
42	+	+	+	+	+	-	+
43	+	+	+	+	+	-	+
44	+	+	+	+	+	-	+
45	+	+	+	+	+	-	+
46	+	-	+	+	+	-	+
47	+	+	+	+	+	-	+
48	+	+	+	+	+	-	+
49	+	+	+	+	+	-	+
50	+	+	+	+	+	-	+

GSBL pozitif bulunan 50 adet *E.coli* suşlarının GSBL genleri pozitifliği yönünden; 45'inde (%90,0) TEM geni, 6'sında (%12,0) SHV geni, 30'unda (%60,0) CTX-M geni bulunmuştur. Ayrıca bu suşların 15'inde (%30,0) pap, 35'inde (%70,0) fim-A, 3'ünde (%6,0) sfa virulans faktörleri pozitif bulunmuştur. 3 suşta çalışmamızda kullanılan GSBL genleri ve *E.coli* virulans faktörlerinden hiç biri bulunamamıştır. Suşlarda GSBL genleri ve virulans faktörleri negatif bulunma sayısı ve yüzde oranları Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7: GSBL (+) *E.coli*'lerde GSBL Genleri ve Virulans faktörlerinin oranları

	TEM		SHV		CTX-M		pap		fimA		Sfa	
	SAYI	%	SAYI	%	SAYI	%	SAYI	%	SAYI	%	SAYI	%
POZİTİF	45	90,0	6	12,0	30	60,0	15	30,0	35	70,0	3	6,0
NEGATİF	5	10,0	44	88,0	20	40,0	35	70,0	15	30,0	47	94,0
	50		50		50		50		50		50	

Çalışmamızda kullanılan GSBL pozitif 50 adet *E.coli* suşlarında, GSBL genleri ve *E.coli* virulans faktörlerinin bulunma durumları Tablo 8'de gösterilmektedir.

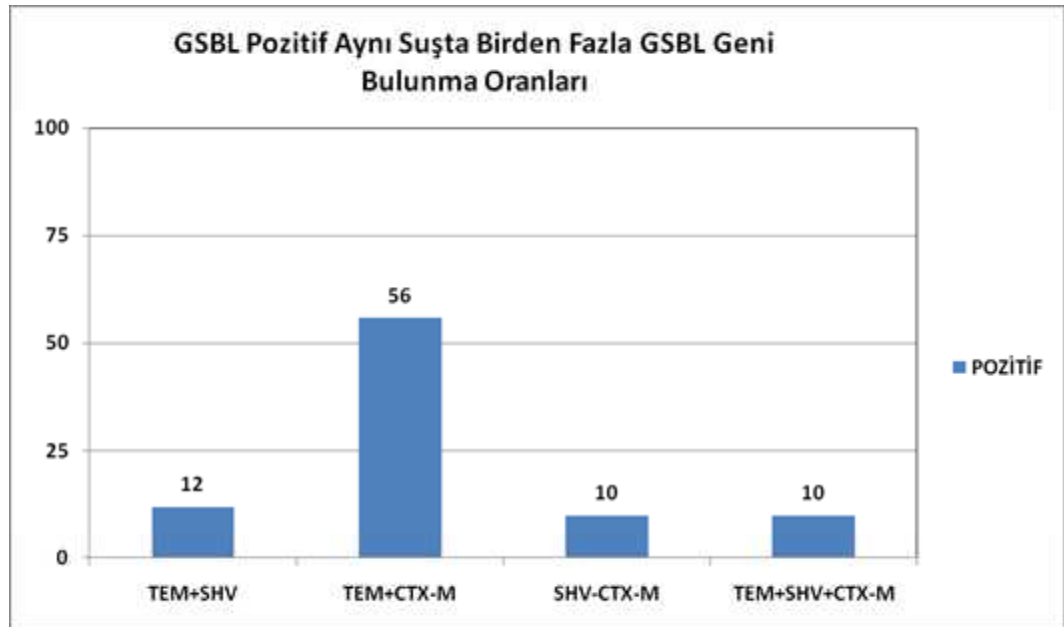
Tablo 8: GSBL pozitif suşlarda GSBL Genleri ve *E.coli* virulans faktörleri bulunma durumu

İZOLATLAR	GSBL Genleri			E.coli Virulans faktörleri			İZOLATLAR	GSBL Genleri			E.coli Virulans faktörleri		
	TEM	SHV	CTX-M	pap	fimA	Sfa		TEM	SHV	CTX-M	pap	fimA	Sfa
1	+	-	+	-	-	+	26	+	-	+	+	+	-
2	+	-	+	-	-	-	27	+	-	-	-	+	-
3	+	-	-	-	-	-	28	+	-	+	-	+	-
4	+	+	+	-	+	-	29	+	-	-	+	+	-
5	+	-	+	+	+	-	30	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	-	+	-	31	+	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-	32	+	-	-	+	+	+
8	+	-	+	-	+	-	33	+	-	+	-	+	-
9	-	-	-	-	-	-	34	+	+	+	-	+	-
10	+	+	+	+	+	+	35	+	-	-	+	+	-
11	+	-	+	-	+	-	36	+	-	+	-	+	-
12	+	-	+	-	+	-	37	+	-	+	-	+	-
13	+	-	-	-	+	-	38	+	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	+	-	39	+	-	-	-	-	-
15	+	-	+	+	-	-	40	+	-	+	+	+	-
16	+	-	-	+	+	-	41	-	-	+	+	+	-
17	+	-	+	-	+	-	42	-	-	-	-	-	-
18	+	+	-	-	+	-	43	+	+	+	-	+	-
19	+	-	-	-	-	-	44	+	-	+	+	+	-
20	+	-	+	-	+	-	45	-	-	+	+	+	-
21	+	-	-	-	-	-	46	+	-	-	-	-	-
22	+	-	-	-	+	-	47	+	-	+	+	+	-
23	+	-	+	-	+	-	48	+	-	+	+	+	-
24	+	-	+	-	+	-	49	+	-	+	+	+	-
25	+	-	+	-	+	-	50	+	-	+	-	-	-

GSBL pozitif bulunan 50 adet *E.coli* suşlarında; bir suşta aynı anda birden fazla GSBL geni bulunma durumları incelendiğinde; 6'sında (%12,0) TEM ve SHV geni, 28'inde (%56,0) TEM ve CTX-M geni, 5'inde (%10,0) SHV ve CTX-M geni ve 5'inde (%10,0) TEM, SHV ve CTX-M geni birlikte bulunmuş olup bulunma sayı ve yüzde oranları Tablo 9 ve Şekil 10'da gösterilmiştir.

Tablo 9: GSBL pozitif *E.coli* suşlarında bir suşta aynı anda birden fazla GSBL geninin bulunma durumları.

	TEM + SHV		TEM + CTX-M		SHV + CTX-M		TEM+SHV+CTX-M	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Pozitif	6	12,0	28	56,0	5	10,0	5	10,0

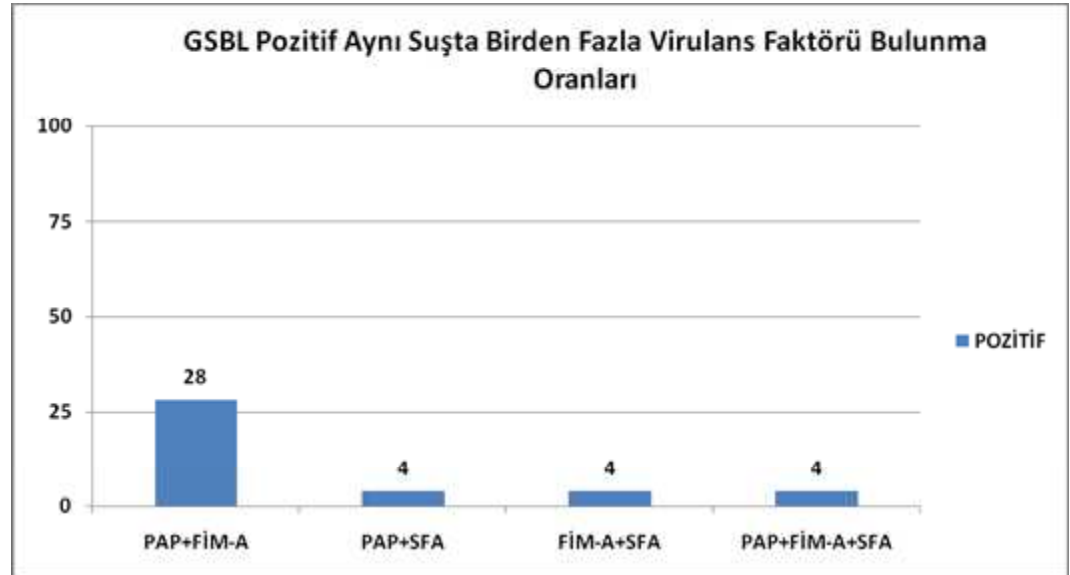


Şekil 10: GSBL Pozitif suşlarda GSBL genlerinin aynı suşlarda birlikte bulunma oranları

GSBL pozitif bulunan *E.coli* suşlarında bir suşta aynı anda birden fazla *E.coli* virulans faktörlerinin bulunma durumları incelendiğinde; 14'ünde (%28,0) pap ve fimA, 2'sinde (%4,0) pap ve sfa, 2'sinde (%4,0) fimA ve sfa ve 2'sinde (%4,0) pap, fimA ve sfa virulans faktörleri birlikte bulunmuş olup bulunma sayısı ve yüzde oranları Tablo 10 ve Şekil 11'de gösterilmiştir.

Tablo 10: GSBL pozitif *E.coli* suşlarında bir suşta aynı anda birden fazla virulans faktörü bulunma durumları.

	pap + fimA		pap + Sfa		fimA + Sfa		pap + fimA + Sfa	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Pozitif	14	28,0	2	4,0	2	4,0	2	4,0



Şekil 11: GSBL pozitif suşlarda aynı suşta birden fazla virulans faktörü bulunma oranları

4.2 GSBL Negatif Suşlarda Bulgular

50 adet GSBL negatif *E.coli* suşlarının GSBL genleri pozitifliği yönünden; 50'sinde (%100,0) TEM geni, 11'inde (%22,0) SHV geni bulunmuş, ancak hiçbir suшта CTX-M geni bulunamamıştır. Ayrıca 20'sinde (%40,0) pap, 37'sinde (%74,0) fim-A, 13'ünde (%26,0) sfa virulans faktörleri pozitif bulunmuştur. Bu suşlarda GSBL genleri ve virulans faktörleri pozitif ve negatif bulunma sayısı ve yüzde oranları Tablo 11'da gösterilmiştir.

Tablo 11: GSBL negatif *E.coli* suşlarının GSBL genleri ve Virulans faktörlerinin oranları

	TEM		SHV		CTX-M		pap		fimA		Sfa	
	SAYI	%	SAYI	%	SAYI	%	SAYI	%	SAYI	%	SAYI	%
POZİTİF	50	100,0	11	22,0	0	0,0	20	40,0	37	74,0	13	26,0
NEGATİF	0	0,0	39	78,0	50	100,0	30	60,0	13	26,0	37	74,0
	50		50		50		50		50		50	

50 adet GSBL negatif *E.coli* suşlarında GSBL genleri ve virulans faktörleri bulunma durumları Tablo 12’da gösterilmektedir.

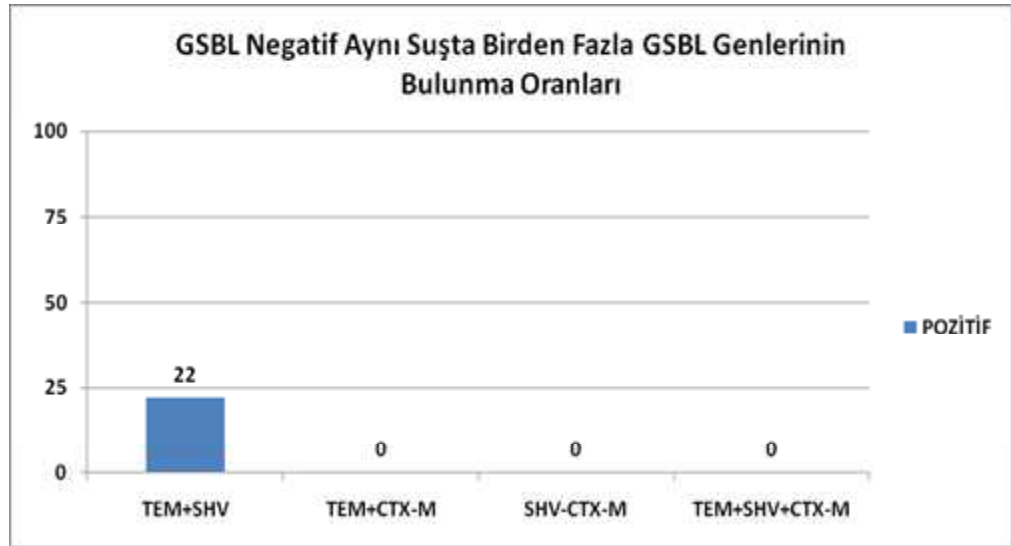
Tablo 12: GSBL negatif *E.coli* suşlarının GSBL genleri ve virulans faktörlerinin bulunma durumu

İZOLATLAR	GSBL Genleri			E.coli Virulans faktörleri			İZOLATLAR	GSBL Genleri			E.coli Virulans faktörleri		
	TEM	SHV	CTX-M	pap	fimA	Sfa		TEM	SHV	CTX-M	pap	fimA	Sfa
1	+	-	-	+	+	-	26	+	-	-	-	-	+
2	+	-	-	-	+	-	27	+	-	-	-	+	-
3	+	-	-	-	+	-	28	+	-	-	-	+	-
4	+	-	-	+	+	-	29	+	-	-	-	-	-
5	+	+	-	-	+	-	30	+	-	-	-	-	-
6	+	+	-	-	+	-	31	+	-	-	+	+	-
7	+	+	-	+	+	-	32	+	+	-	-	+	-
8	+	+	-	+	+	-	33	+	-	-	-	-	-
9	+	-	-	+	+	+	34	+	-	-	-	+	-
10	+	+	-	+	-	+	35	+	-	-	-	-	-
11	+	+	-	-	+	-	36	+	-	-	-	+	-
12	+	-	-	-	+	-	37	+	-	-	-	+	+
13	+	-	-	-	+	+	38	+	-	-	+	+	-
14	+	-	-	-	+	-	39	+	-	-	-	+	-
15	+	-	-	-	-	-	40	+	-	-	+	+	+
16	+	+	-	+	+	+	41	+	+	-	+	+	+
17	+	+	-	+	+	+	42	+	-	-	-	+	-
18	+	-	-	+	-	-	43	+	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	+	-	44	+	-	-	-	+	-
20	+	-	-	-	-	-	45	+	+	-	+	+	-
21	+	-	-	+	-	-	46	+	-	-	+	-	-
22	+	-	-	+	+	-	47	+	-	-	+	+	+
23	+	-	-	-	+	-	48	+	-	-	+	+	+
24	+	-	-	-	-	+	49	+	-	-	+	+	+
25	+	-	-	-	+	-	50	+	-	-	-	+	-

50 adet GSBL negatif *E.coli* suşlarında; bir suşta aynı anda birden fazla GSBL geni bulunma durumları incelendiğinde; 11'inde (%22,0) TEM ve SHV geni bulunmuş, ancak hiçbir suşta TEM ve CTX-M geni, SHV ve CTX-M geni ve TEM, SHV ve CTX-M geni birlikte bulunamamış olup bulunma sayı ve yüzde oranları Tablo 13' ve Şekil 12'de gösterilmiştir.

Tablo 13: GSBL negatif *E.coli* suşlarının bir suşta aynı anda GSBL geni bulunma durumları.

	TEM + SHV		TEM + CTX-M		SHV + CTX-M		TEM+SHV+CTX-M	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Pozitif	11	22,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0



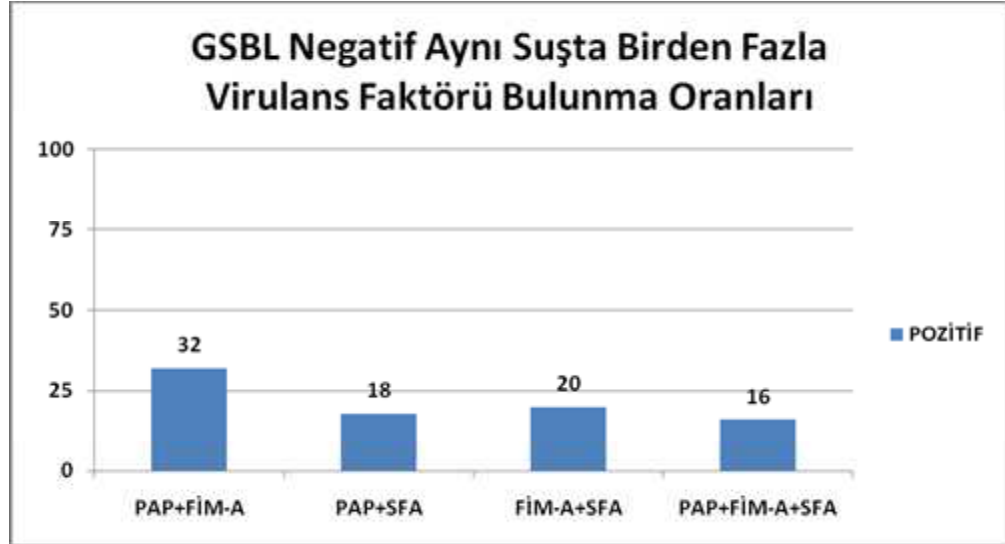
Şekil 12: GSBL negatif *E.coli* suşlarında bir suşta aynı anda GSBL geni bulunma oranları

50 adet GSBL negatif *E.coli* suşlarında; bir suşta aynı anda birden fazla virulans faktörü bulunma durumları incelendiğinde; 16'sında (%32,0) pap ve fimA, 9'unda (%18,0) pap ve sfa, 10'unda (%20,0) fimA ve

sfa, 8'inde (%16,0) pap, fimA ve sfa virulans faktörleri birlikte bulunmuş olup bulunma sayı ve yüzde oranları Tablo 14' ve Şekil 13'da gösterilmiştir.

Tablo 14: GSBL negatif *E.coli* suşlarında bir suшта aynı anda birden fazla virulans faktörü bulunma durumları.

	pap+fimA		pap+sfa		fimA+sfa		pap+fimA+sfa	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Pozitif	16	32,0	9	18,0	10	20,0	8	16,0



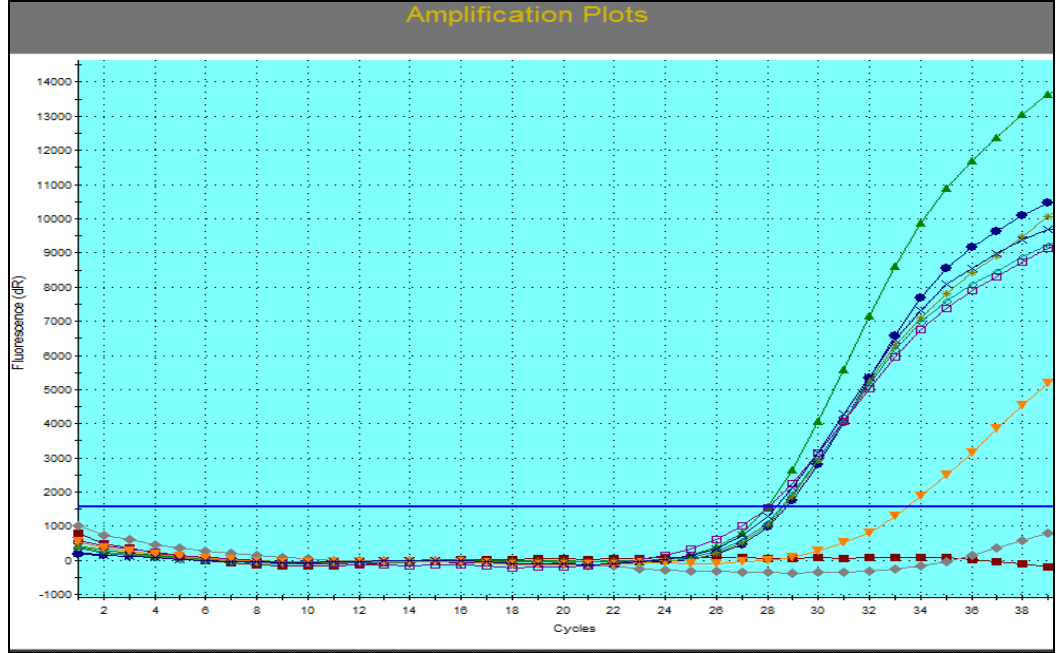
Şekil 13: GSBL negatif *E.coli* suşlarında virulans faktörlerinin birlikte bulunma oranları

4.3 *E.coli* Suşlarında PZR çalışmalarının Erime Eğrisi Analizi Eğrileri

Örneklerin SYBR Green I kullanılarak yapılan PZR çalışması ile Erime Eğrisi Analizi ile doğrulama eğrileri hazırlandı.

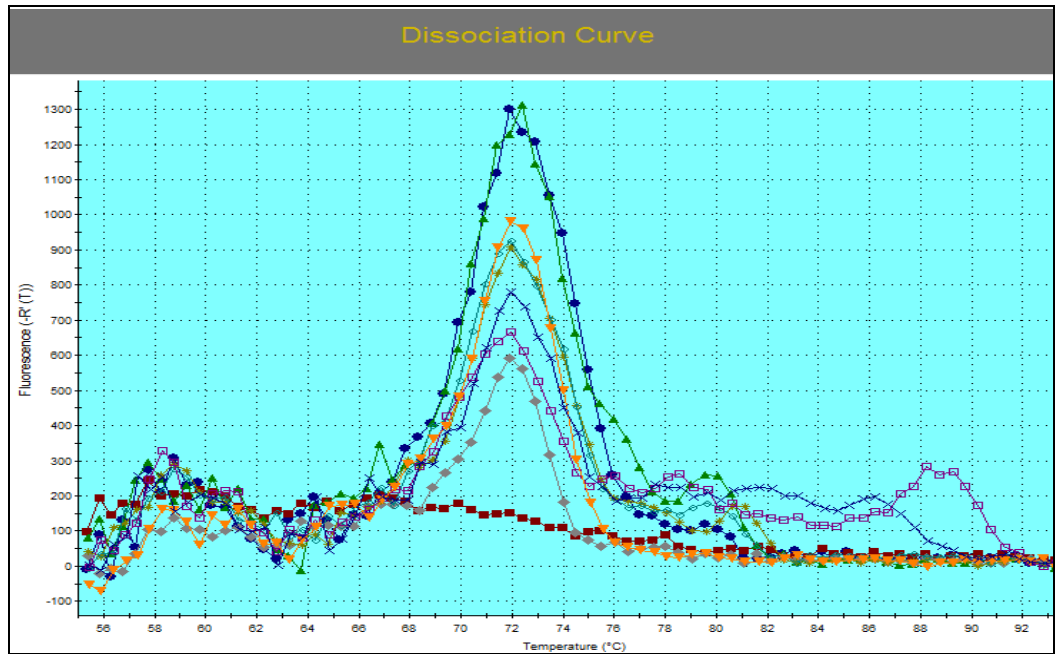
GSBL pozitif bulunan *E.coli* suşlarının GSBL genlerinin saptanması SYBR Green kullanılarak PZR yapıldı ve bu çalışmada Erime Eğrisi Analizi ile doğrulama eğrileri hazırlandı.

TEM genine ait saptanan amplifikasyon grafiği ve dağılım eğrisi analizi Şekil 14'de gösterilmiştir.



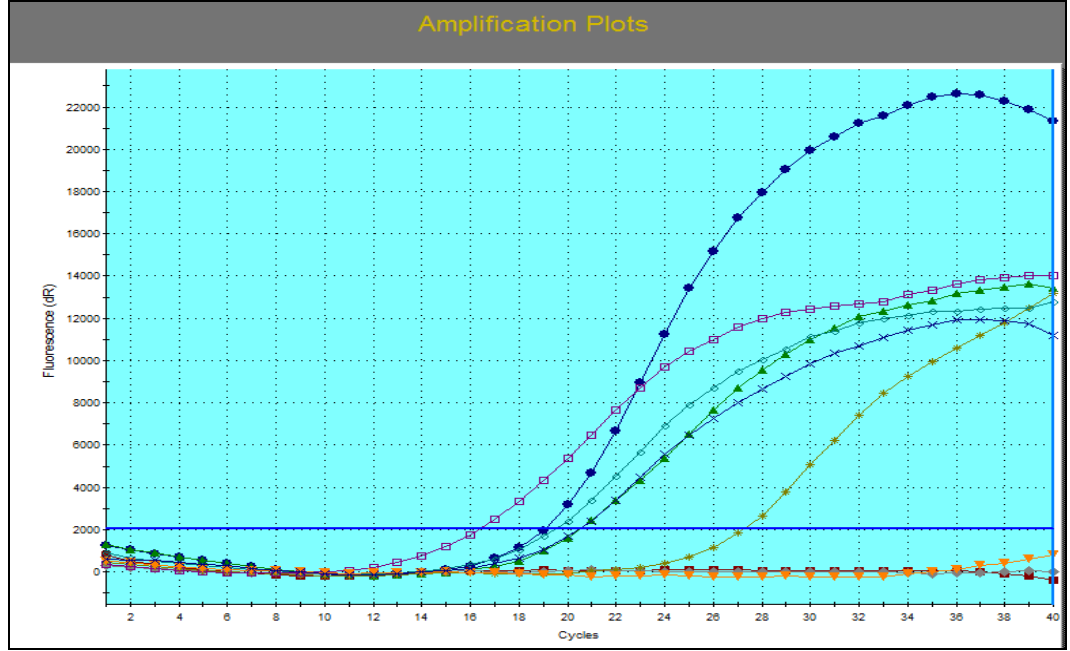
Şekil 14: TEM amplifikasyon grafiği eğrisi

TEM pozitif örneklere erime ısısı 72  C olarak saptanmış olup Şekil 15'de gösterilmektedir.



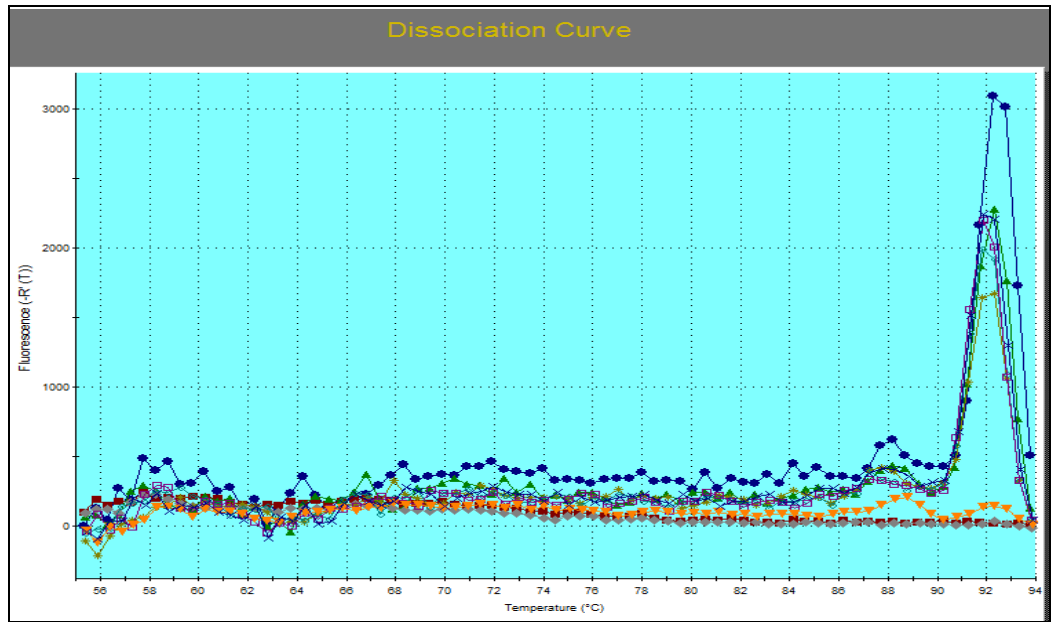
Şekil 15: TEM pozitif örneklere ve 72  C'lik erime ısısı

CTX-M genine ait saptanan amplifikasyon grafiği ve dağılım eğrisi analizi Şekil 16'de gösterilmiştir.



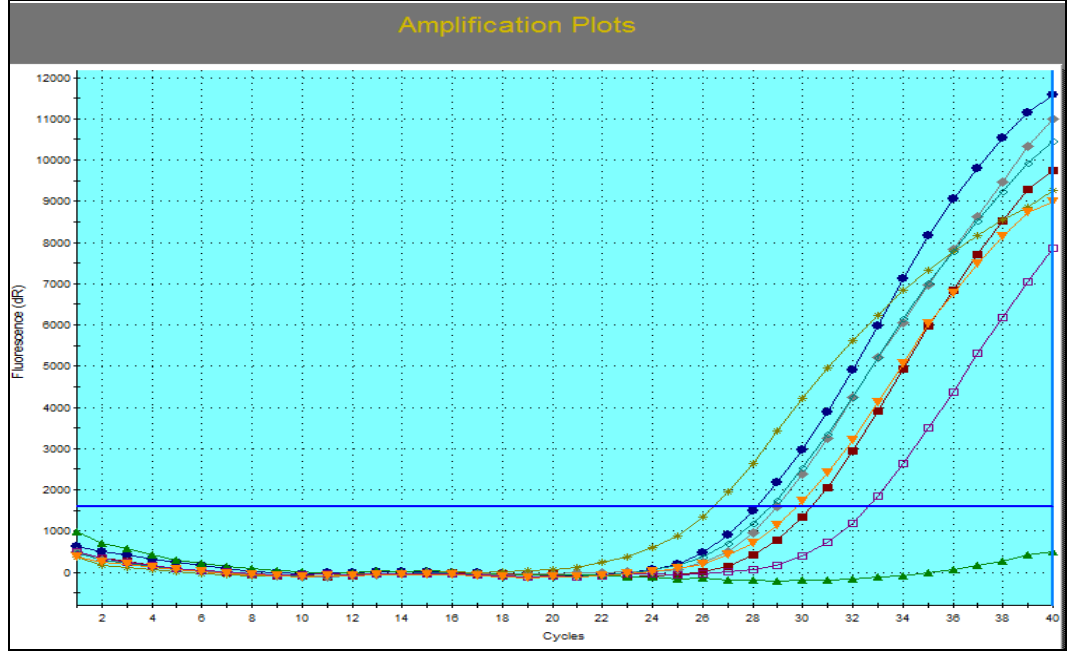
Şekil 16: CTX-M amplifikasyon grafiği eğrisi

CTX-M pozitif örneklere erime ısısı 92  C olarak saptanmış olup Şekil 17'de gösterilmektedir.



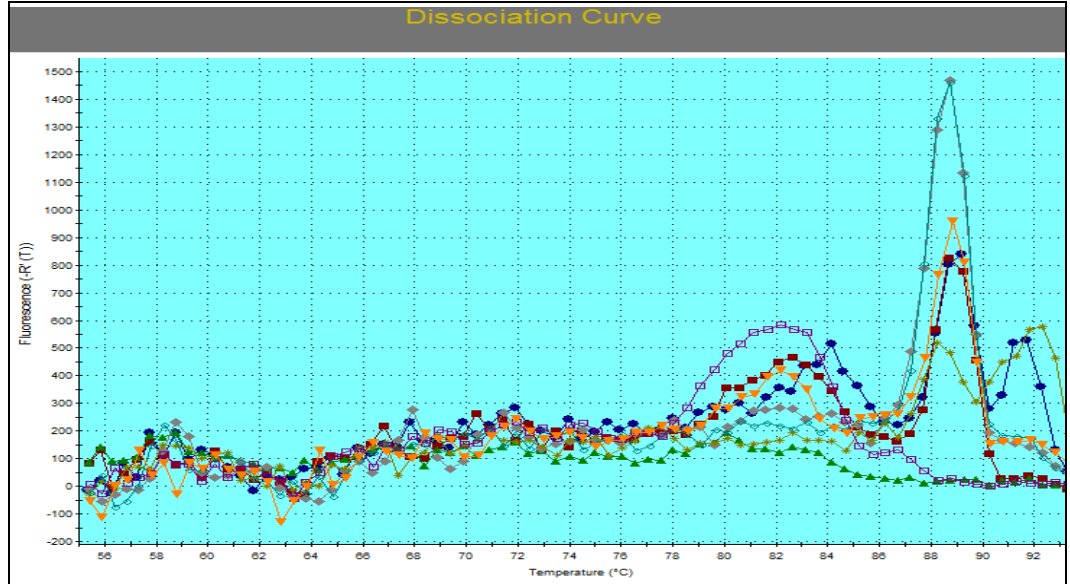
Şekil 17: CTX-M pozitif örneklere ve 92  C erime ısısı

SHV genine ait saptanan amplifikasyon grafiği ve dağılım eğrisi analizi Şekil 18'te gösterilmiştir.



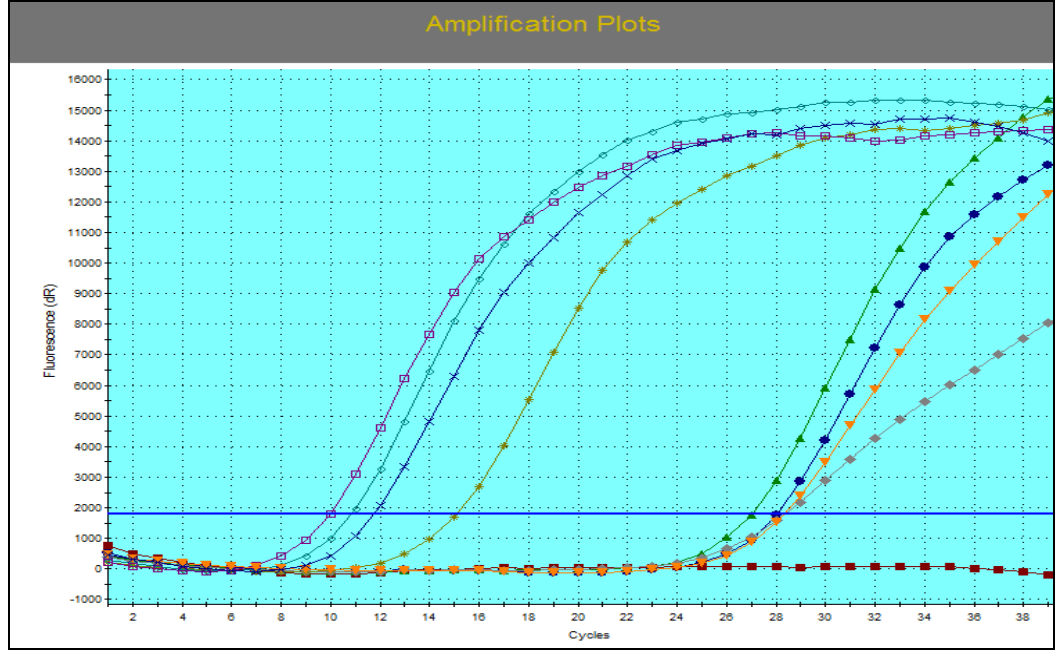
Şekil 18: SHV amplifikasyon grafiği eğrisi

SHV pozitif örneklere erime ısısı 89  C olarak saptanmış olup Şekil 19'da gösterilmektedir.



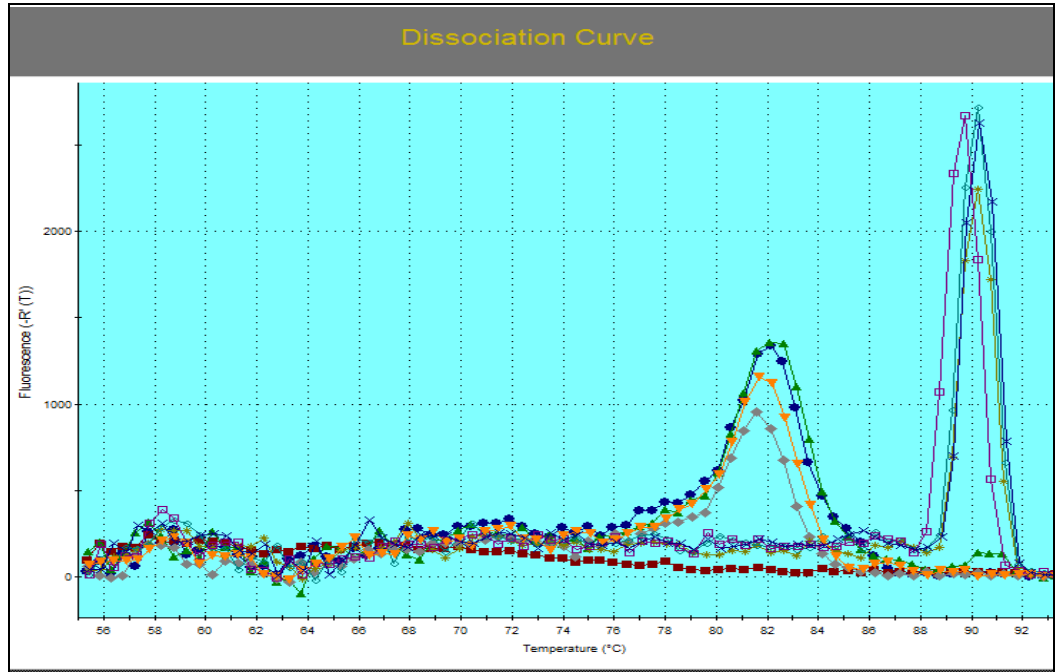
Şekil 19: SHV pozitif örneklere ait eğriler ve 89  C'lik erime ısısı

fim-A virulans faktörüne ait saptanan amplifikasyon grafiği ve dağılım eğrisi analizi Şekil 20’de gösterilmiştir.



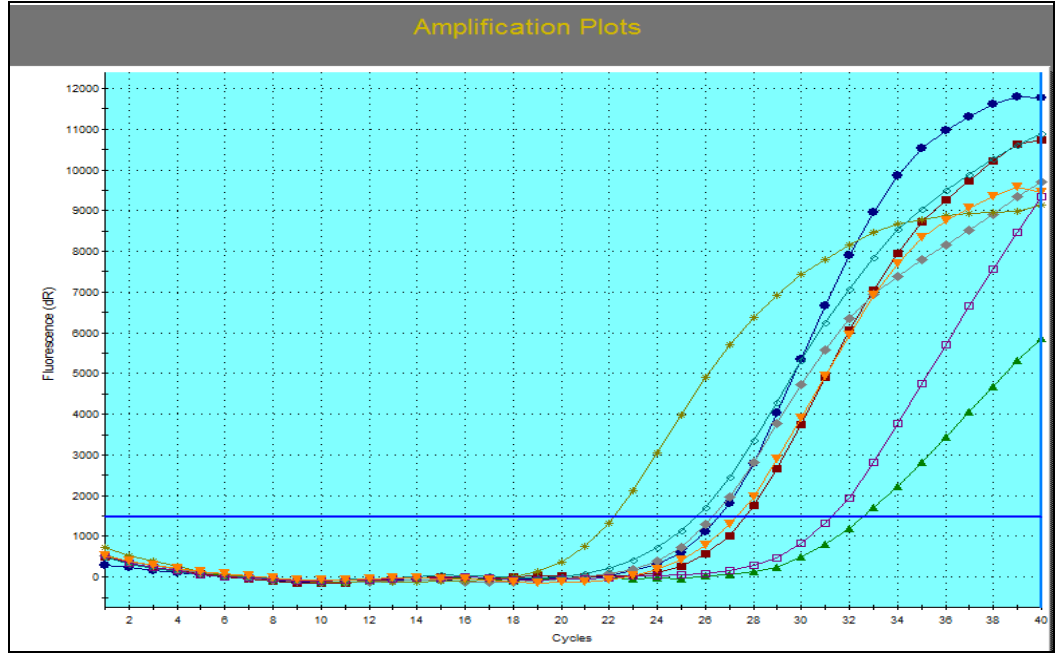
Şekil 20: fimA amplifikasyon grafiği eğrisi

fimA pozitif örneklerde erime ısı 90 °C olarak saptanmış olup Şekil 21’de gösterilmektedir.



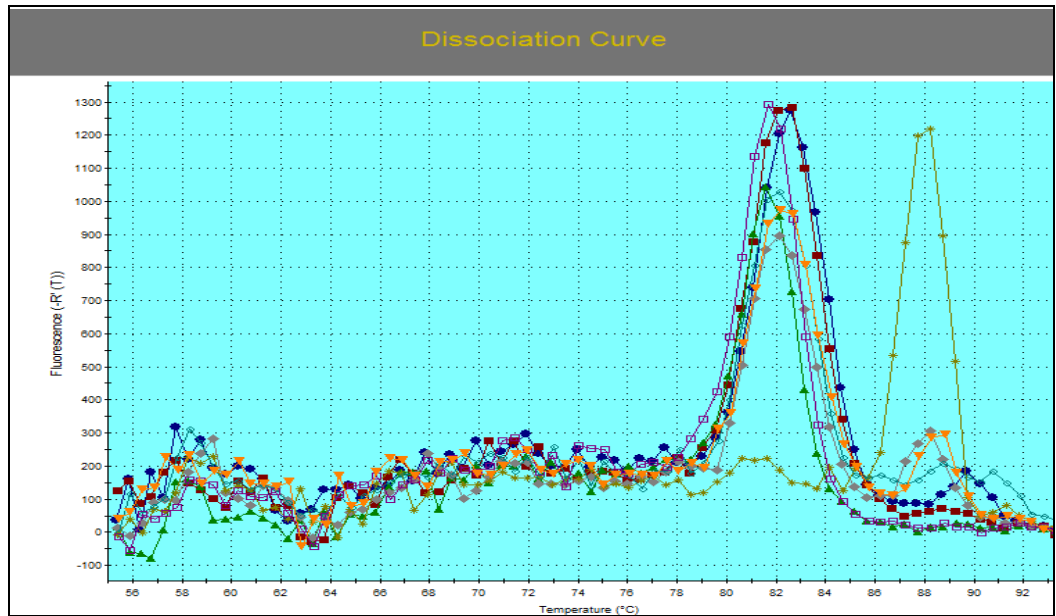
Şekil 21: fim A pozitif örneklere ait eğriler ve 90 °C’lik erime ısı

pap virulans faktörüne ait saptanan amplifikasyon grafiği ve dağılım eğrisi analizi Şekil 22’de gösterilmiştir.



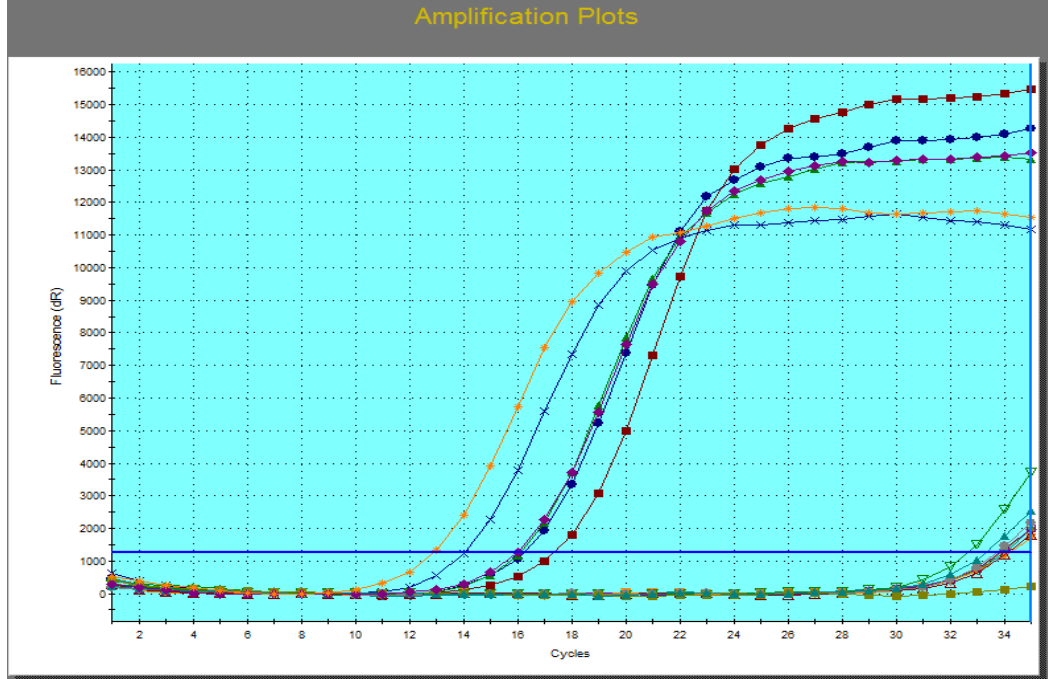
Şekil 22: pap amplifikasyon grafiği eğrisi

pap pozitif örneklerde erime ısısı 82⁰C olarak saptanmış olup Şekil 23’de gösterilmektedir.



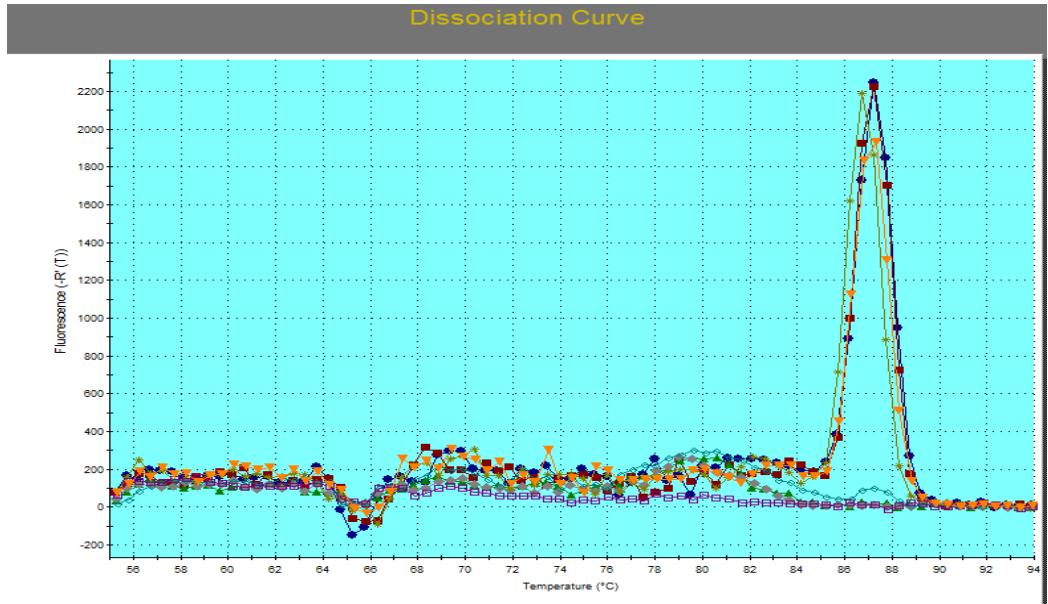
Şekil 23 : pap pozitif örneklere ait eğriler ve 82⁰C'lik erime ısısı

sfa virulans faktörüne ait saptanan amplifikasyon grafiği ve dağılım eğrisi analizi Şekil 24'de gösterilmiştir.



Şekil 24: sfa amplifikasyon grafiği eğrisi

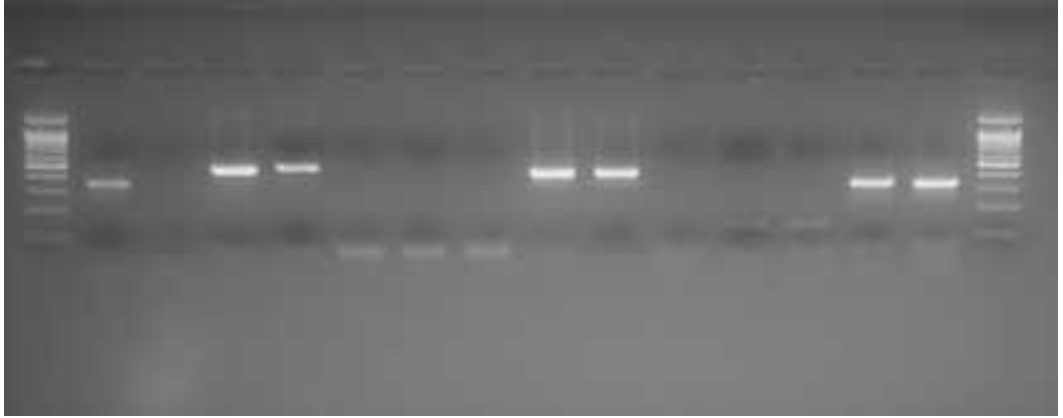
sfa pozitif örneklerde erime ısısı 87⁰C olarak saptanmış olup Şekil 25'de gösterilmektedir.



Şekil 25 : sfa pozitif örneklere ait eğriler ve 87⁰C'lik erime ısısı

4.4 *E.coli* Suşlarında Genlerin Agaroz Jel Elektroforez Çalışması

GSBL pozitif suşlarda GSBL genleri ve *E.coli* virulans faktörlerine ait genlerin agaroz jel elektroforezde dağılımı şekil 26'da gösterilmektedir.



Şekil 26 : GSBL genleri ve virulans faktörleri jel elektroforezde dağılımı sırasıyla CTX-M, 'e ait 2 örnek, fimA'ya ait 2 örnek, TEM'e ait 3 örnek, sfa'ya ait 2 örnek, SHV'ye ait 3 örnek ve pap'a ait 2 örnek gösterilmiştir.

Sırası; 100 bp marker, 1-1, 1-4, 2-2, 2-4, 3-4, 3-5, 3-6, 4-1, 4-2, 5-4, 5-5, 5-6, 6-1, 6-4, 100 bp marker

4.5 İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada SPSS 10.0 programı kullanılarak Ki-Kare testi ile veriler istatistiksel olarak değerlendirilmeye alındı.

GSBL pozitif *E.coli* suşlarında moleküler olarak yapılan incelemelerde GSBL ve virulans faktörleri genlerinin kendi aralarında ve birbirleri aralarında, virulans faktörleri ve GSBL genlerinin antibiyotiklere olan ilişkileri istatistiksel olarak araştırılmıştır.

50 adet GSBL pozitif suşlarda *E.coli* virulans faktörleri ile GSBL genleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,003$) bir ilişki olduğu saptandı ve Tablo 15'te gösterilmiştir.

Tablo 15: GSBL pozitif suşlarda *E.coli* virulans faktörleri ile GSBL genleri arasında ilişki bulunmaları.

		GSBL Genleri			
		Negatif	Pozitif	Toplam	
Virulans Faktörleri	Negatif	Sayı	3	10	13
		Beklenen Sayı	0,8	12,2	13,8
		VF içinde Yüzdesi %	23,1	76,9	100,0
		GSBL içindeki Yüzdesi %	100,0	21,3	26,0
	Pozitif	Sayı	0	37	37
		Beklenen Sayı	2,2	34,8	37
		VF içinde Yüzdesi %	0,0	100,0	100,0
		GSBL içindeki Yüzdesi %	0,0	78,7	74,0
Toplam		Sayı	3	47	50
		Beklenen Sayı	3	47	50,8
		VF içinde Yüzdesi %	6,0	94,0	100,0
		GSBL içindeki Yüzdesi %	100,0	100,0	100,0

Pearson Ki-Kare değeri; $p=0.003$ bulunmuş olup $p<0.05$

50 adet GSBL pozitif suşlarda virulans faktörleri ile GSBL genleri bulunması arasındaki ilişki incelendiğinde; suşlarda virulans faktörü bulunması ile CTX-M geninin bulunmasının istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.0001$) bir ilişki olduğu saptanmış ve Tablo 16'da gösterilmiştir.

Tablo 16: GSBL pozitif suşlarda *E.coli* virulans faktörleri ile CTX-M genleri arasında ilişki bulunmaları.

		CTX-M			
		Negatif	Pozitif	Toplam	
Virulans Faktörleri	Negatif	Sayı	11	2	13
		Beklenen Sayı	5,2	7,8	13
		VF İçinde Yüzdesi %	84,6	15,4	100,0
		CTX-M içindeki Yüzdesi %	55,0	6,7	26,0
	Pozitif	Sayı	9	28	37
		Beklenen Sayı	14,8	22,2	37
		VF İçinde Yüzdesi %	24,3	75,7	100,0
		CTX-M içindeki Yüzdesi %	45,0	93,3	74,0
Toplam		Sayı	20	30	50
		Beklenen Sayı	20	30	50
		VF İçinde Yüzdesi %	40,0	60,0	100,0
		CTX-M içindeki Yüzdesi %	100,0	100,0	100,0

Pearson Ki-Kare değeri; $p = 0.0001$ bulunmuş olup $p < 0.05$

50 adet GSBL pozitif suşlarda CTX-M geni ile virulans faktörlerinden fimA arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,002$) bir ilişki olduğu saptanmış ve Tablo 17'te gösterilmiştir.

Tablo 17: GSBL pozitif suşlarda fimA ile CTX-M genleri arasında ilişkilendirme.

		CTX-M			
		Negatif	Pozitif	Toplam	
fimA	Negatif	Sayı	26	9	35
		Beklenen Sayı	21	14	35
		fimA İçinde Yüzdesi %	74,3	25,7	100,0
		CTX-M içindeki Yüzdesi %	86,7	45,0	70,0
	Pozitif	Sayı	4	11	15
		Beklenen Sayı	9	6	15
		fimA İçinde Yüzdesi %	26,7	73,3	100,0
		CTX-M içindeki Yüzdesi %	13,3	55,0	30,0
Toplam		Sayı	30	20	50
		Beklenen Sayı	30	20	50
		fimA İçinde Yüzdesi %	60,0	40,0	100,0
		CTX-M içindeki Yüzdesi %	100,0	100,0	100,0

Pearson Ki-Kare değeri; $p = 0.002$ bulunmuş olup $p < 0.05$

GSBL pozitif *E.coli* suşlarında yukarıda belirlenen CTX-M ve fimA arasındaki ilişki dışında, çalışmamızda kullanılan diğer GSBL genleri ile *E.coli* virulans faktörlerinin ve GSBL genlerinin birlikte bulunmaları arasında istatistiksel olarak bir ilişki saptanmamıştır.

GSBL pozitif suşlarda çalışmamızda kullanılan virulans faktörlerinin bir arada bulunması arasındaki ilişki incelendiğinde; pap geni ile fimA geni arasında her ikisinde aynı anda bulunması açısından istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,018$) bir ilişki tespit edilmiş ve Tablo 18'de gösterilmiştir.

Tablo 18: GSBL pozitif suşlarda pap ve fimA virulans faktörleri arasında ilişkilendirme.

			fimA		
			Pozitif	Negatif	Toplam
pap	Pozitif	Sayı	14	1	15
		Beklenen Sayı	10,5	4,5	15
		pap İçinde Yüzdesi %	93,3	6,7	100,0
		fimA içindeki Yüzdesi %	40,0	6,7	30,0
	Negatif	Sayı	21	14	35
		Beklenen Sayı	24,5	10,5	35
		pap İçinde Yüzdesi %	60,0	40,0	100,0
		fimA içindeki Yüzdesi %	60,0	93,3	70,0
Toplam	Sayı	35	15	50	
	Beklenen Sayı	35	15	50	
	pap İçinde Yüzdesi %	70,0	30,0	100,0	
	fimA içindeki Yüzdesi %	100,0	100,0	100,0	

Pearson Ki-Kare değeri; $p=0.018$ bulunmuş olup $p<0.05$

GSBL pozitif suşlardaki virulans faktör genleri ile GSBL genleri arasındaki ilişki araştırıldığında aynı suшта pap ve fimA bulunma olasılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve Tablo 19'da gösterilmektedir. ($p < 0,05$)

Ayrıca suшта CTX-M ile fimA geni bulunma olasılığı istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiş ve Tablo 19'da gösterilmiştir. ($p < 0,01$)

Tablo 19: GSBL pozitif suşlarda GSBL genleri ve *E.coli* virulans faktörleri arasında ilişkilendirme.

		TEM	SHV	CTX-M	pap	fimA	Sfa
TEM	Pearson Korelasyon	1	0,123	0,136	-0,073	0,218	0,084
	Önemlilik		0,394	0,346	0,616	0,128	0,561
	Sayı	50	50	50	50	50	50
SHV	Pearson Korelasyon	0,123	1	0,176	-0,107	0,242	0,166
	Önemlilik	0,394		0,222	0,458	0,091	0,25
	Sayı	50	50	50	50	50	50
CTX-M	Pearson Korelasyon	0,136	0,176	1	0,178	0,455**	0,034
	Önemlilik	0,346	0,222		0,216	0,001	0,813
	Sayı	50	50	50	50	50	50
pap	Pearson Korelasyon	-0,073	-0,107	0,178	1	0,333*	0,202
	Önemlilik	0,616	0,458	0,216		0,018	0,159
	Sayı	50	50	50	50	50	50
fimA	Pearson Korelasyon	0,218	0,242	0,455**	0,333*	1	-0,018
	Önemlilik	0,128	0,091	0,001	0,018		0,899
	Sayı	50	50	50	50	50	50
Sfa	Pearson Korelasyon	0,084	0,166	0,034	0,202	-0,018	1
	Önemlilik	0,561	0,25	0,813	0,159	0,899	
	Sayı	50	50	50	50	50	50

(*) Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlıdır.
(**) Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır.

GSBL pozitif suşlarda GSBL genlerinin birbirlerinin arasında, yukarıda tespit edilenler haricinde virulans faktörleri ile GSBL genleri arasında, virulans faktörlerinin birbirleri arasında, virulans faktörlerin diğer antibiyotikler arasında istatistiksel değerlendirilmesinde anlamlılık tespit edilmemiştir.

GSBL negatif suşlarda; GSBL ve virulans faktörleri arasındaki ilişki Pearson Korelasyon ile araştırılmış, pap ile sfa virulans faktörleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,012$) bulunmuş ve Tablo 20'de gösterilmiştir.

Tablo 20: GSBL negatif suşlarda GSBL genleri ve *E.coli* virulans faktörleri arasında ilişkilendirme

		TEM	SHV	CTX-M	pap	fimA	Sfa
TEM	Pearson Korelasyon	a	a	a	a	a	a
	Önemlilik						
	Sayı	50	50	50	50	50	50
SHV	Pearson Korelasyon		1		0,256	0,205	0,125
	Önemlilik				0,072	0,154	0,385
	Sayı	50	50	50	50	50	50
CTX-M	Pearson Korelasyon	a	a	a	a	a	a
	Önemlilik						
	Sayı	50	50	50	50	50	50
pap	Pearson Korelasyon	a	0,256	a	1	0,112	0,354*
	Önemlilik		0,072			0,44	0,012
	Sayı	50	50	50	50	50	50
fimA	Pearson Korelasyon	a	0,205	a	0,112	1	0,040
	Önemlilik		0,154		0,44		0,785
	Sayı	50	50	50	50	50	50
Sfa	Pearson Korelasyon	a	0,125	a	0,354*	0,040	1
	Önemlilik		0,385		0,012	0,785	
	Sayı	50	50	50	50	50	50
(*) Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlıdır.							
(a) Değişkenlerden en az biri sabit olduğundan hesaplanamadı.							

GSBL negatif olan suşlarda, virulans faktörlerinin birbirleri arasında ilişki değerlendirildiğinde; pap ve sfa genleri arasında anlamlı ($p < 0,012$) bir ilişki olduğu saptandı ve Tablo 21’de gösterilmiştir.

Tablo 21: GSBL negatif suşlarda *E.coli* virulans faktörleri arasında ilişkilendirme.

		Sfa			
		Pozitif	Negatif	Toplam	
pap	Pozitif	Sayı	9	11	20
		Beklenen Sayı	5,2	14,8	20
		pap İçinde Yüzdesi %	45,0	55,0	100,0
		Sfa içindeki Yüzdesi %	69,2	29,7	40,0
	Negatif	Sayı	4	26	30
		Beklenen Sayı	7,8	22,2	30
		pap İçinde Yüzdesi %	13,3	86,3	100,0
		Sfa içindeki Yüzdesi %	30,8	70,3	60,0
Toplam		Sayı	13	37	50
		Beklenen Sayı	13	37	50
		pap İçinde Yüzdesi %	26,0	74,0	100,0
		Sfa içindeki Yüzdesi %	100,0	100,0	100,0

Pearson Ki-Kare değeri; $p=0.012$ bulunmuş olup $p<0.05$

GSBL negatif suşlarda yukarıda tespit edilenler haricinde; GSBL genlerinin birbirlerinin arasında, virulans faktörlerinin birbirleri arasında, virulans faktörleri ile GSBL genleri arasında istatistiksel değerlendirilmesinde anlamlılık tespit edilmemiştir.

5. TARTIŞMA

ÜSE, hem toplum hem de hastane kaynaklı olarak sık görülmeleri, mortalite üzerine olumsuz etkileri nedeniyle önemlidir. ÜSE, en sık karşılaşılan toplum kökenli enfeksiyonlardır.¹⁰ Antibiyotiklerin çok yaygın kullanılmalarının sonucu olarak da beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç giderek artmaktadır. *Enterobacteriaceae* ailesi arasında beta-laktam antibiyotiklere karşı direncin en yaygın nedeni beta-laktamaz üretimidir.⁴⁸

Blanco ve arkadaşları UPEC suşlarında pap, sfa ve afa adezin kodlarının saptanması ile ilgili 243 *E.coli* suşunda PZR ile yaptığı araştırmada sırasıyla %54 pap, %53 sfa ve %2 afa suşlarını saptamıştır. pap ve sfa pozitif suşlar daha sıklıkla akut pyelonefrit (%94), akut sistit (%67) ve %57 asemptomatik bakteriüri vakalarında saptanmıştır. pap ve/veya sfa operonları %90 mannoz dirençli hemagglütinasyona karşı %37 mannoz dirençli hemagglütinasyon negatif suşlarda görülmüştür. %85 suşta ise hem pap hem sfa saptanmıştır.⁸⁹

Çalışmamızda; GSBL negatif 50 adet *E.coli* suşlarının 20'sinde (%40) pap, 37'sinde (%74) fim-A, 13'ünde (%26) sfa virulans faktörleri pozitif bulunmuştur. Ayrıca suşların 9'unda (%18) pap ve sfa saptanmıştır.

Fransa'da uzun dönem yatan hastalarda üriner enfeksiyonların %49,5'ünü CTX-M GSBL pozitif *E.coli*'lerin oluşturduğu, ayrıca sefotaksim ve seftriakson'a karşı seftazidim'den daha yüksek oranda dirençli oldukları gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda; amoksisilin ve tikarsiline yüksek düzeyde direnç, sefotaksime seftazidime göre daha fazla dirençli oldukları, suşların siprofloksasin ve gentamisine dirençli fakat trimetoprim /sulfometakzasol duyarlı olduğu gösterilmiştir.⁹⁰

Akram ve arkadaşlarının Hindistan'daki bir çalışmasında; ÜSE'lerinin %61 nin *E.coli* tarafından oluşturulduğu, ampisillin ve ko-trimakzazole karşı yüksek düzeyde dirençli oldukları, bir çok izolatta 4 ve daha yukarı sayıda antibiyotiğe direnç geliştiği ve saptanan *E.coli*'lerin %34,4 ünün %42'sinde GSBL üretimi olduğu tespit edilmiştir.⁹¹

Cekanová ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; Çek Cumhuriyetinde gastrointestinal sistemdeki enterobakterlerde GSBL pozitif sıklığı araştırılmış, Vitek 2 otomatize sistem ile tanımlanmış ve sonuçlar PZR ile CTX-M pozitif sekansı saptanarak doğrulanmıştır. Gastrointestinal sistemdeki GSBL pozitif bakteri oranı %1,2 saptanmıştır. Tüm vakalarda CTX-M tipi GSBL üreten *E.coli* saptanmıştır. İzolatlarda en sık CTX-M 15 tipi belirlenmiştir.⁹²

Villegas ve arkadaşları Colombia'da *Klebsiella pneumoniae* and *E.coli*'lerin yaptıkları GSBL üretimi ile ilgili sıklık araştırmasında, 6 ay içinde hastane laboratuvarından 1074 *E.coli* ve 394 *K.pneumoniae* isolatlarından 3. jenerasyon sefalosporin ve aztreonama dirençli olanları merkez laboratuvarına gönderilmiş, yapılan çalışmada TEM ve SHV enzimleri bulunmasına rağmen, CTX-M enzimi baskın bulunmuştur.⁹³

Çalışmamızda; GSBL pozitif bulunan 50 adet *E.coli* suşlarının 45'inde (%90) TEM, 6'sında (%12) SHV, 30'unda (%60) CTX-M geni bulunmuş olup, Villegas ve arkadaşlarının çalışmalarından farklı olarak bizim çalışmamızda TEM geni daha baskın olarak saptanmıştır.

Jemima ve arkadaşları; GSBL üreten GN'lerde CTX-M ve SHV için multipleks PZR ile *E.coli*'lerin %14'ünde SHV, %50'sinde CTX-M geni saptanmıştır. ⁹⁶

Çalışmamızda CTX-M ve SHV genlerinin 6'sında (%12) SHV geni, 30'unda (%60) CTX-M geni bulunmuş, bulunma sıklığı açısından uyumlu olduğu görülmektedir.

Naas ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; *Enterobacteriaceae* içeren 4200 klinik örnekten %2,1'inin çift disk antibiyotik duyarlılık testine göre GSBL pozitif bulunduğu, %56'sında (48 suş) *E.coli* ve bunların %86'sının idrardan elde edildiği, bu suşlarda GSBL genleri SYBR Green ile LightCycler PZR kullanılarak 48 suşun 44'ünde CTX-M tespit edildiği bildirilmiştir. ⁹⁷

Çalışmamızda; GSBL pozitif bulunan *E.coli* suşlarında SYBR Green ile PZR uygulanmasında 50 suşun 30'unda (%60) CTX-M geni bulunmuştur. Naas ve arkadaşlarından farklı olarak daha düşük oranda CTX-M pozitifliği olduğu görülmüştür.

Arısoy ve arkadaşları tarafından pedatrik *E.coli* isolatlarında virulans faktörleri ile antimikrobiyal duyarlılık arasındaki ilişkiler multiplex PZR ile virulans faktörleri saptanmış ve antimikrobiyal duyarlılık ile ilgili yapılan çalışmada; üriner enfeksiyonlu 136 *E.coli* suşunun %40'ında virulans faktörleri bulunmamış, %4 pap, %1 sfa, %2'sinde pap+sfa her ikisi birden tespit etmişler. pap virulans faktöründe ampisiline ve trimetoprim/ sulfometaksazol'a %67 dirençli, %33 duyarlı, tobramisin ve siprofloksasine %100 duyarlılık seftriakson ve sefalotine %87 duyarlılık tespit edilmiştir. Aynı çalışmada sfa bulunan suşlarda; ampisilin ve sefalotine %100 dirençli, tobramisin, seftriakson ve siprofloksasine %100 duyarlılık, trimetoprim/ sulfometaksazol'a %50 duyarlılık ve direnç tespit edilmiştir. ⁹⁴

Vranes ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; pap geni bulunan *E.coli* suşlarında amoksisillin direnci gösterilmiştir. ⁹⁵

Bogyová ve arkadaşları tarafından ekstra intestinal *E.coli* suşlarında P-fimbria, S-fimbria PZR'da yapılan spesifik sekanslarının tespitinde %74 pap, %65 sfa, bunun yanında %56'sında pap ve sfa birlikte saptamışlardır. ¹⁰⁸

Hull ve arkadaşları asemptomatik ÜSE'li hastalarda PZR ile yapılan analizlerinde isolatların %32'sinde pap, %14 ünde sfa geni, asemptomatik bakteriüri hastaların isolatlarının %27 sinde pap, %10'unda sfa virulans genlerini saptamışlardır. ⁸⁸

Arsoy ve arkadaşları tarafından pedatrik *E.coli* isolatlarında virulans faktörlerinin multiplex PZR *E.coli* genlerinin tespitinde; pap, sfa, afaI, hly, cnfl ve aer genleri sırayla %22,98; 6,21; 9,94; ve 39,75 bulunmuştur. Ayrıca sfa-pap arasında ($p<0,001$); pap-aer, afaI-aer ve cnfl-pap arasında ($p<0,05$) ve hly-sfa arasında ($p<0,01$) önemli bir ilişki saptamışlardır. Buna göre pap geninin ÜSE'lerinde önemli bir neden olduğunu belirlemişlerdir. ⁹⁸

Çalışmamızda; GSBL negatif 50 adet *E.coli* suşlarının 20'sinde (%40) pap, 13'ünde (%26) sfa virulans faktörleri pozitif, suşların 9'unda (%18) pap ve sfa ($p<0,05$) bulunmuştur. Arsoy ve arkadaşlarının çalışmaları ile aynı suşta pap ve sfa virulans faktörlerinin birlikte bulunmalarında istatistiksel olarak anlamlılık açısından uyumluluk olduğu düşünülmektedir. Ayrıca Bogyová ve arkadaşları ile Hull ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarla bizim çalışmamız arasında sıklık sırası açısından uyumluluk olduğu görülmektedir.

Shannoon ve arkadaşları Philadelphia'da CTX-M beta laktamaz sıklığına yönelik yaptıkları çalışmada; GSBL içeren *Enterobacteriaceae*'da %70 ve üzerinde CTX-M pozitifliği PZR kullanılarak bulunmuştur. 291 genişlemiş spektrumlu sefalosporine dirençli GN bakteri içeren *E.coli*'nin suşların %48'sinde CTX-M pozitif saptanmıştır. *E.coli*'deki CTX-M gruplarının %57'si Grup I, %37'si Grup IV, %3'ü Grup II ve %3'ünde Grup saptanmamıştır. Grup IV izolatların üçünde CTX-M-18 ve Grup I izolatların üçünde CTX-M-15 saptanmıştır. ¹⁰⁰

Chmelinsky ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; GSBL üreten 20 suşun hepsinde en az bir GSBL geni (TEM, SHV ve CTX-M) bulunmuş ve bu genlerden CTX-M %80 oranında en sık rastlanan olarak saptanmıştır. ⁸⁵

Çalışmamızda 50 adet GSBL pozitif suşun 47'sinde (%97) en az bir GSBL geni (TEM, SHV ve CTX-M) bulunmuş ayrıca bu genlerden CTX-M %60 oranında TEM geninden sonra ikinci sıklıkta saptanmıştır. Bu sonuçlar Shannoon ve arkadaşlarının tespitleri ile uyumlu olduğunu, Chmelinsky ve arkadaşlarının çalışmalarında farklı olduğunu göstermektedir.

Siiri ve arkadaşları; tekrarlayan ÜSE'lerinde *E.coli*'nin antimikrobiyal duyarlılık profinde; 78 isolatın %33'ünde trimetoprim-sulfometakzasol, %78'inin sulfometakzasol dirençli olduğu, sulfometakzasol dirençli suşların %59'unun trimetoprim-sulfometakzasol ile kombinasyonunda hassasiyet görülmüştür. 78 isolatın %1'i gentamisin, %40'ı ampicillin, %17'si sefuroksime ve %3'ü sefotaksime ayrıca %44'ü beta-laktamların hepsine dirençli saptanmıştır. ⁹⁹

Bülüç ve arkadaşları tarafından Türkiye'de GSBL sıklığı araştırması hakkında yapılan bir çalışmada; GSBL sıklığına bakıldığında 482 suşun 136'sında GSBL saptandığı, alınan çeşitli klinik örneklerde en fazla %37 ile idrarda GSBL pozitifliği saptanmış, izole edilen suşlarda

GSBL pozitifliği oranları *E.coli*'de %14, *E.coli*'lerde antibiyotiklere direnç oranları; ampisilin %94, sefuroksim %82, seftriakson %70, sefepim %21, gentamisin %59, tobramisin %51, amoksisilin-klavulanat %62, ampisilin-sulbaktam %90, sefoperazon-sulbaktam %5, netilmisin %15, amikasin %7, siprofloksasin %77, ofloksasin %74, trimetoprim-sulfometakzasol %85 saptanmıştır.¹⁰¹

Çalışmamızda; GSBL pozitif suşlarda Vitek otomatize sistem ile yapılan antibiyotik direnç oranları ampisilin %100, seftriakson %100, gentamisin %38, tobramisin %82, amikasin %6, siprofloksasin %82, trimetoprim/ sulfametoksazole %64 saptanmıştır. Bülüş ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma bulguları ile uyumlu olduğu düşünölmektedir.

2004 yılında Kepekçi tarafından yapılan bir çalışmada; idrar örneklerinden izole edilen suşların %52'sinin *E.coli* olduğu; poliklinik hastalarının %14'ünde, yatan hastaların %6'sında GSBL pozitifliği tespit edildiği ve yatan hastalarda bu GSBL üretimi anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır (p= 0.028).¹⁰²

Kalem ve arkadaşları tarafından idrardan izole edilen 178 *E.coli* suşunun CLSI kriterleri temel alınarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik dirençleri araştırılmış; imipeneme 178 (%100), amikasine 157 (% 88.2), nitrofurantoine 151 (%84.8), gentamisine 129 (%72.5), sefuroksime 124 (%69.7), siprofloksasine 111 (%62.4), ampisilin/ sulbaktama 92 (%51.7), trimetoprim/ sulfametoksazol 79 (% 44.4) ve ampisiline 39 (% 21.9) duyarlı bulunmuştur.¹⁰⁴

Bizim çalışmamızda; GSBL pozitif 50 suşta Vitek ile yapılan antibiyotik duyarlılığında; imipeneme (%100), amikasine (%94), nitrofurantoine (%98), gentamisine (%62), siprofloksasine (%18), trimetoprim/ sulfametoksazole (%36) ve ampisiline (%0) duyarlılık saptanmıştır. Kalem ve arkadaşlarının kullandıkları Kirby-Bauer disk

difüzyon yöntemi ile bizim çalışmamızda kullanılan Vitek sistemi arasında uyumluluk olduğu görülmektedir.

Çetin ve arkadaşları tarafından çocukluk çağı idrar yolu enfeksiyonlarında *E.coli* ve antibiyotik direnci hakkında retrospektif olarak yaptıkları çalışmada; alınan suşlarda en fazla %45,7 *E.coli* saptanmış olan 132 idrar yolu enfeksiyonunda ampisiline %79, ampisilin-sulbaktama %63.2, amoksisilin klavunata %53, ko-trimoksazole %82.2, gentamisine %6.6, netilmisine %10, amikasinine %11.5, sefuroksime %21.9 ve seftriaksona %6.8 oranında direnç saptanmıştır.¹⁰⁵

Dündar ve arkadaşlarının idrar kültürlerinde mikroorganizmaların izole edilmesi ve antibiyotik duyarlılıkları için Vitek-2 ile yapılan çalışmalarında; GSBL saptanma oranı *E.coli*'de poliklinikten başvuran hastalarda %14, yatan hastalarda %24 bulunmuştur. Yatan hastaların %35'inde, poliklinikten başvuran hastaların %58'inde *E.coli* izole edilmiştir, ikinci sırayı *Klebsiella spp.* aldığı, Poliklinik ve servis hastalarında siprofloksasin direnci sırasıyla *E.coli*'de %28 ve %49, trimetoprim-sulfametoksazol direnci ise *E.coli*'de %44 ve %49, olarak; duyarlılığı ise ampisilin %39 ve %32, ampisilin/sulbaktam %50 ve %38, piperasilin/ tazobaktam %83 ve %82, sefoperazon/ sulbaktam %92 ve %88, sefuroksim aksetil %70 ve %54, seftriakson %84 ve %74, imipenem %100 ve %100, siprofloksasin %72 ve %51, ko-trimoksazol %56 ve %51, gentamisin %80 ve %75, amikasin %87 ve %63, nitrofurantoin %88 ve %88 saptanmıştır.¹⁰⁶

Akay ve arkadaşları ÜSE'de *E.coli* suşlarına antibiyotik duyarlılığı araştırmasında; sefepim %98,3, meropenem %97,7, amikasin %95,0 ve netilmisin'e %95,8 oranlarında duyarlılık, ampisilin %50,8, ko-trimoksazol %60,6 ve amoksisilin klavunata %69,6 direnç saptamışlardır.¹⁰⁷

Yavuzdemir ve arkadaşları tarafından GSBL varlığı modifiye çift disk sinerji testiyle belirlenmiştir. GSBL yapan 50 *E.coli* suşunun en duyarlı olduğu antibiyotiğin, imipenem 49/50 (%98), en dirençli olduğu ise tikarsilin/klavulanik asid 42/50 (%84) olarak saptanmıştır. Diğer antibiyotiklere duyarlılık oranları sırasıyla; meropeneme %96, piperasilin/tazobaktama %86, amikazine %84, sefoksitine %72, netilmisine %48, kinolonlar ve gentamisine %32, sefepime %30, tobramisine %20, trimetoprim/sulfametoksazol %14, tetrasikline %12 olarak belirlenmiştir. Tüm suşlar kolistine duyarlı bulunmuştur.¹⁰⁹

Ece tarafından yapılan GSBL varlığı çift disk sinerji yöntemiyle incelenmiş ve GSBL pozitif bulunan *E.coli* suşlarının en duyarlı oldukları antibiyotik imipenem %100, piperasilin/tazobaktam %94,7, amikasin %78,9 en dirençli oldukları amoksisilin/ klavulanik asit %100, trimetoprim/ sulfometaksazol %94,7, seftazidim, siprofloksasin %84,2 olarak bulunmuştur.¹¹⁶

Çalışmamızda, GSBL pozitif 50 adet *E.coli* suşunda en duyarlı antibiyotiğin imipenem %100, en dirençli olanların ise ampisillin %100 olduğu, difüzyon testlerinde ertapeneme %100 duyarlılık saptanmıştır. Yavuzdemir ve arkadaşlarının çalışmalarında kullanılan modifiye çift disk sinerji testiyle bizim çalışmamızda kullanılan Vitek sistemi ile duyarlılık açısından uyumluluk olduğu görülmektedir. Ayrıca Dündar ve arkadaşları ile birlikte Ece tarafından imipenem'e duyarlılık ile ilgili bulgular bizim çalışmamızdaki bulgularla uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Branger ve arkadaşları tarafından GSBL pozitif *E.coli*'lerde TEM, SHV ve CTX-M genlerine göre siprofloksasin duyarlı ve dirençliliğin virulans faktörleri ile ilişkisinde; siprofloksasin dirençli suşlar TEM (15 suşta) pap geni %20, SHV (3 suşta) pap geni %0, CTX-M (27 suşta) pap geni %13 saptanmıştır. Siprofloksasin duyarlılığında ise TEM (40 suşta)

pap geni %35, SHV (19 suşta) pap geni %68, CTX-M (25 suşta) pap geni %20 olarak saptanmıştır. ¹¹⁰

Avrupa'da 2478, Türkiye'de 295 adet *E.coli* suşlarında direnç oranları (%) araştırılması için yapılan bir çalışmada; Avrupa ve Türkiye'de direnç oranları sırasıyla ampisiline %29,8, %51,1; trimetoprim/sulfametoksazol'a %14.1, %36.2; siprofloksasine %2.3, %17.6 nitrofurantoin'e 1.2, 4.4; fosfomisin'e ise 0.7, 0.3 olarak tespit edilmiştir. ⁷²

Özkaya ve arkadaşları tarafından kadınlarda birincil ve tekrarlayan ÜSE'leri antibiyotik direnci açısından karşılaştırıldığında tüm antibiyotiklere karşı belirgin bir derecede direnç artışı saptanmakla birlikte bu artışın ampisilin, amoksisilin-klavulanat, siprofloksasin, sefuroksim ve seftriakson'da istatistiksel açıdan anlamlı olduğu saptanmıştır. ¹¹⁴

Rad ve arkadaşları, 677 *E.coli* suşunun Vitek 32 GNS-121 kiti ile ampisilin, seftriakson, amikasin, nitrofurantoin, siprofloksasin, sulfometaksazol ve GSBL duyarlılık sonuçları karşılaştırılmıştır. Siprofloksasin'e karşı *E.coli* suşlarının % 70,8'inin duyarlı, % 29,2' inin dirençli olduğu bulunmuştur. GSBL pozitif suşlarda siprofloksasine duyarlılık %10,9 dirençlilik %89,1 saptanmıştır. Siprofloksasin'e duyarlı ve dirençli olan bu iki *E.coli* grubunun diğer antibiyotiklerle direnç oranları karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,01$). ¹¹¹

Çalışmamızda GSBL pozitif suşlarda siprofloksasine duyarlılık %18, dirençlilik %82 olarak saptanmış olup, Rad ve arkadaşlarının çalışması ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Mulvey ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 232 vakanın 209 tanesi sefoksitine dirençli *E.coli* saptanmış, bu suşların 162 tanesi üriner sistemden kaynaklandığı, suşlardaki antimikrobiyal direnç çalışması

Vitek GNS 121 kartı ile çalışılmış ve AmpC üreten *E.coli*'lerde en yüksek direnç Ampisillinlerde tespit edilmiştir. ¹¹²

Çalışmamızda; Vitek GNS 121 kartı ile yapılan antimikrobiyal direnç çalışmasında en yüksek direnç %100 ampisillin, seftazidim, seftriakson'a olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar Mulvey arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Mulvey arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; GSBL pozitif 74 *E.coli* suşlarının Vitek GNS 121 kart ile yapılan antibiyotik direnci ampisilin %99, sefazolin %76, trimetoprim/ sulfametoksazol %69, imipenem, sefotetan %0 saptanmıştır. GSBL negatif 351 *E.coli* suşunda ise ampisilin %87, amoksisilin klavulanat %64, sefazolin %41, imipenem, sefotetan, seftazidim, seftriakson ve amikasin %0 saptanmıştır. ¹¹³

Çalışmamızda; GSBL pozitif 50 *E.coli* suşunda Vitek GNS 121 kartı ile yapılan antibiyotik duyarlılık ampisilin %100, sefazolin %96, trimetoprim/ sulfametoksazol %64, imipenem, sefotetan %0 olarak saptanmıştır. Çalışmamızın, Mulvey ve arkadaşlarının çalışmaları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Mulvey arkadaşları tarafından yapılan aynı çalışmada; suşların %71 (82 suş) multiple olarak beta-laktamaz genleri içermektedir. Bunun %69'u iki geni birlikte (TEM ve SHV içeren 55 suş, TEM ve CTX-M içeren 24 suş), %2,6'sı (3 adet suş) üç geni birlikte içerdiği saptanmıştır. Ayrıca suşların %30'u (34 adet suş) tek bir gen içermektedir. Bunların %77'si TEM, %67,5'i SHV ve %28'i CTX-M geni içermektedir. ¹¹³

Bizim çalışmamızda; GSBL pozitif bulunan *E.coli* suşlarının %94'ü birden fazla GSBL geni içerdiği, %78'inde (39 suşta) iki geni birlikte (6'sında (%12) TEM ve SHV geni, 28'inde (%56) TEM ve CTX-M geni, 5'inde (%10) SHV ve CTX-M geni ve %10'unda da her üç geni birlikte (5 adet suşta TEM, SHV ve CTX-M geni) içerdiği saptanmıştır. Ayrıca 45'inde

(%90) TEM geni, 6'sında (%12) SHV geni, 30'unda (%60) CTX-M geni bulunmuştur. Mulvey ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile bizim çalışmamız arasında birden fazla genin aynı suşta yüksek oranlarda bir arada bulunması açısından uyumluluk olduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada idrar klinik materyallerinden izole edilen *E.coli* suşları fenotipik ve genotipik olarak belirlenmiştir. Suşların antibiyotik dirençleri ve beta-laktamaz direnci konvansiyonel ve otomatize sistem ile belirlenerek suşlarda PZR ile DNA araştırılması yapılmıştır.

GSBL pozitif bulunan 50 *E.coli* suşunun GSBL genleri pozitifliği yönünden 45'inde (%90,0) TEM geni, 30'unda (%60,0) CTX-M geni 6'sında (%12,0) SHV geni olduğu görüldü. Ayrıca 35'inde (%70,0) fim-A, 15'inde (%30,0) pap, 3'ünde (%6,0) sfa virulans faktörleri bulunduğu görüldü.

GSBL pozitif suşlarda disk difüzyon yöntemi ile yapılan tarama testinde bütün suşlar Ertapeneme duyarlı olarak tespit edilmiştir. Çift disk sinerji testinde 50 adet suşun 44'ünde (%88,0) GSBL pozitif, kombine disk difüzyon testinde 50 suşun 45'inde (%90,0) GSBL pozitif bulunmuştur.

GSBL negatif *E.coli* suşlarının GSBL genleri pozitifliği yönünden 50'sinde (%100,0) TEM geni, 11'inde (%22,0) SHV geni olduğu, CTX-M geninin hiçbir suşta bulunmadığı görüldü. Ayrıca 37'sinde (%74,0) fimA, 20'sinde (%40,0) pap, 13'ünde (%26,0) sfa virulans faktörlerinin bulunduğu görüldü.

Yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak; bu çalışmada GSBL pozitif suşlarda GSBL genleri ile virulans faktörlerinin bir arada bulunması açısından istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,003$) belirlenmiştir.

Virulans faktörleri ile GSBL genlerinden CTX-M geni bulunması arasında ($p < 0,0001$) ileri derecede anlamlılık olduğu, özellikle fimA bulunan suşlarda bu ilişkinin ($p < 0,002$) olduğu belirlenmiştir.

GSBL pozitif suşlarda pap ve fimA virulans faktörlerinin birlikte bulunmalarının ($p < 0,018$) anlamlı olduğu saptanmıştır.

GSBL negatif suşlarda ise pap ve sfa virulans faktörlerinin bir arada bulunduğu ($p < 0,012$) belirlenmiştir.

Çalışmamızın tüm verileri ışığında; *E.coli* suşlarının virulans faktörlerinden fimA ile GSBL oluşturan genlerden CTX-M'in ilişkili olduğu, GSBL pozitif ve negatif suşlarda aynı anda birden fazla virulans faktörünün bulunabileceği, GSBL pozitif suşlarda CTX-M geni ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunduğu bu genin GSBL negatif suşların hiç birinde saptanmadığı görülmektedir. CTX-M geninin beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç gelişiminde daha baskın olduğu görülmektedir.

7. ÖZET

İdrar Yolları Enfeksiyonu Etkeni *E.Coli*'lerin Adezinleri İle Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişkinin Klasik Ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması.

Ağustos 2006 – Eylül 2007 tarihleri arasında polikliniklere başvuran hastaların idrar örneklerinde, idrar yolu enfeksiyonu tanısı alan hastalardan klasik, bakteri identifikasyonu, antibiyotik duyarlılık, Vitek-32 sistem ve disk difüzyon metodu ile GSBL varlığı yönünden araştırılmıştır.

Araştırma için 50 GSBL pozitif, 50 GSBL negatif toplam 100 hastada *E.coli* suşunda virulans genleri ve GSBL genleri araştırılmıştır.

GSBL pozitif olarak tespit edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılığı pozitif GSBL negatif olan bakterilerin gen araştırılması için SYBR Green I ile Erime Eğrisi Analizi yapılarak PZR testi uygulanmıştır.

GSBL pozitif bulunan 50 suşun 50'si (%100,0) ampicillin, seftazidim, seftriakson'a karşı dirençli, (%100,0) ise sefotetan ve imipenem'e duyarlı olduğu belirlenmiştir.

GSBL pozitif bulunan 50 adet *E.coli* suşlarının GSBL genleri pozitifliği yönünden; 45'inde (%90,0) TEM geni, 6'sında (%12,0) SHV geni, 30'unda (%60,0) CTX-M geni bulunmuştur. Ayrıca bu suşların 15'inde (%30,0) pap, 35'inde (%70,0) fimA, 3'ünde (%6,0) sfa virulans faktörleri pozitif bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan 3 suşta GSBL genleri ve *E.coli* virulans faktörlerinden hiç biri bulunamamıştır.

GSBL pozitif bulunan 50 adet *E.coli* suşlarında GSBL genlerinin bir suşta aynı anda birden fazla bulunma durumlarında; 6'sında (%12,0) TEM ve SHV geni, 28'inde (%56,0) TEM ve CTX-M geni, 5'inde (%10,0) SHV ve CTX-M geni ve 5'inde (%10,0) TEM, SHV ve CTX-M geni birlikte saptanmıştır.

GSBL pozitif bulunan *E.coli* suşlarında virulans faktörlerinin bir suşta aynı anda birden fazla bulunma durumlarında; 14'ünde (%28,0) pap ve fimA, 2'sinde (%4,0) pap ve sfa, 2'sinde (%4,0) fimA ve sfa ve 2'sinde (%4,0) pap, fimA ve sfa virulans faktörleri birlikte bulunduğu görülmüştür.

GSBL pozitif suşlarda disk difüzyon yöntemi ile yapılan tarama testinde bütün suşlar Ertapeneme duyarlı olarak tespit edilmiştir. Çift disk sinerji testinde 50 adet suşun 44'ünde (%88,0) GSBL pozitif, kombine disk difüzyon testinde 50 suşun 45'inde (%90,0) GSBL pozitif bulunmuştur.

GSBL negatif 50 adet *E.coli* suşlarının GSBL genleri pozitifliği yönünden 50'sinde (%100,0) TEM geni, 11'inde (%22,0) SHV geni bulunmuş, ancak hiçbir suşta CTX-M geni bulunamamıştır. Ayrıca 20'sinde (%40,0) pap, 37'sinde (%74,0) fim-A, 13'ünde (%26,0) sfa virulans faktörlerinin bulunduğu görülmüştür.

GSBL negatif 50 adet *E.coli* suşlarının GSBL genlerinin bir suşta aynı anda birden fazla bulunma durumlarında; 11'inde (%22,0) TEM ve SHV geni bulunmuş, ancak hiçbir suşta TEM ve CTX-M geni, SHV ve CTX-M geni ve TEM, SHV ve CTX-M geni birlikte bulunamamıştır.

GSBL negatif 50 adet *E.coli* suşlarının virulans faktörlerinin bir suşta aynı anda birden fazla bulunma durumlarında; 16'sında (%32,0) pap ve fimA, 9'unda (%18,0) pap ve sfa, 10'unda (%20,0) fimA ve sfa, 8'inde (%16,0) pap, fimA ve sfa virulans faktörleri birlikte saptanmıştır.

GSBL pozitif bulunan *E.coli* suşlarının GSBL genlerinin saptanması SYBR Green kullanılarak PZR yapılmış ve bu çalışmada Erime Eğrisi Analizi ile doğrulama eğrileri hazırlanmıştır.

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 10.0 programında Ki-kare testi kullanılmıştır. İstatistiksel analiz için $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

GSBL pozitif suşlarda *E.coli* virulans faktörleri ile GSBL genleri arasında bulunmaları açısından ileri derecede anlamlı ($p < 0,003$) bir ilişki saptanmıştır.

GSBL pozitif suşlarda virulans faktörleri bulunması ile GSBL genleri bulunması arasında yapılan değerlendirmede suşlarda tek bir virulans faktörü bulunması halinde CTX-M geninin bulunması istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı ($p < 0,0001$) olduğu saptanmıştır.

GSBL pozitif suşlarda her bir virulans faktörleri ayrı ayrı GSBL genleri ile aralarındaki ilişkileri incelendiğinde; fimA virulans faktörü ile CTX-M geni arasında anlamlı ($p < 0,002$) olduğu bulunmuştur.

GSBL pozitif suşlarda virulans faktörleri arasında pap geni ile fimA geni arasında her ikisini de aynı anda bulunması açısından da anlamlı ($p < 0,018$) olduğu belirlenmiştir.

GSBL negatif olan suşlarda GSBL ve virulans faktörleri arasındaki ilişki Pearson Korelasyon ile araştırılmış, pap ile sfa virulans faktörlerinin bir arada bulunduğu ($p < 0,012$) belirlenmiştir.

Çalışmamızın tüm verileri ışığında; *E.coli* suşlarının virulans faktörlerinden fimA ile GSBL oluşturan genlerden CTX-M'in ilişkili olduğu, GSBL pozitif ve negatif suşlarda aynı anda birden fazla virulans faktörünün bulunabileceği, GSBL pozitif suşlarda CTX-M geni ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunduğu bu genin GSBL negatif suşların hiç birinde saptanmadığı görülmektedir. CTX-M geninin beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç gelişiminde daha baskın olduğu görülmektedir.

8. SUMMARY

The investigation of relationship between adhesins and antibiotic resistance in *E.coli* induced urinary tract infections by using classic and molecular methods.

The urine samples of the patients diagnosed with urethra infection that consulted to polyclinics during the period of August 2006 and September 2007, were analyzed for classical bacterial identification, antibiotic sensitivity and Vitec-32 system and disc diffusion method and the presence of ESBL.

The virulence genes and ESBL genes in *E.coli* strains were studied on a total of 100 patients, 50 with ESBL positive and 50 with ESBL negative for our study.

PCR test has been used by making SYBR Green I and Melting Curve analysis for the gene study of bacteria with ESBL negative and bacteria determined as ESBL positive.

Of the 50 strains identified as ESBL positive, 50 (100 %) have been identified sensitive to Cefotetan and Imipenem if they were resistant to Ampicilin, Ceftazidime, and Ceftriaxone.

Of the 50 *E.coli* strains with ESBL positive studied for the positivity of ESBL genes, in 45 cases (90 %) TEM gene, in 6 cases (12 %) SHV gene, in 30 cases (60%) CTX-M genes have been found. Furthermore, in 15 of these strains (30 %) pap, in 35 of these strains (70 %) fim-A, and in 3 (6 %) sfa virulence factors have been found positive. In 3 strains used in our study, none of the ESBL genes and *E.coli* virulence factors have been found.

In the cases where ESBL genes exist more than 1 at the same time in 1 strain, of the 50 *E.coli* strains with ESBL positive; it has

been found out that, in 6 (12 %) TEM and SHV gene, in 28 (56 %) TEM and CTX-M gene, in 5 (10 %) SHV and CTX-M gene and in 5 (10 %) TEM, SHV and CTX-M gene co-existed.

In the cases where virulence factors exist more than 1 at the same time in 1 strain in *E.coli* strains found to be ESBL (+), it has been observed that, in 14 (28 %) pap and fimA, in 2 (4 %) pap and sfa, in 2 (4 %) fimA and sfa virulence factors co-existed.

In ESBL positive strains, it has been found to be sensitive Ertapeneme to all strains by disc diffusion method. In the cases where ESBL genes of 50 *E.coli* strains with ESBL positive, it has been observed in 44 (88%) with double disk synergy test, in 45 (90%) with combined disk synergy test.

Of the 50 *E.coli* strains with ESBL negative studied for the positivity of ESBL genes; in 50 (100 %) TEM gene, in 11 (22 %) SHV gene has been found no CTX-M gene has been found in any of the strains. Furthermore, it has been observed that in 37 (74 %) fim-A, in 13 (26 %) sfa virulence factors existed.

In the cases where ESBL genes of 50 *E.coli* strains with ESBL negative exist more than 1 at the same time in 1 strain; TEM and SHV genes have been found in 11 (22 %) cases, but in none of the strains TEM and CTX-M gene, SHV and CTX-M gene and TEM, SHV and CTX-M gene co-existed.

In the cases where virulence factors of 50 *E.coli* strains with EBSL negative exist more than 1 at the same time in 1 strain; it has been observed that in 16 of these (32 %) pap and fimA, in 9 (18%) pap and sfa, in 10 (20%) fimA and sfa and in 8 (16 %) pap, fimA and sfa virulence factors co-existed.

The identification of ESBL genes of *E.coli* strains with ESBL positive has been accomplished by PCR, using SYBR Green, and verification curves have been prepared by using Melting Curve Analysis.

Chi-Square test in SPSS 10.0 has been used for the statistical evaluation of the results. Statistical meaningfulness of $p < 0.05$ has been accepted for statistical analysis.

In ESBL positive strains, it has been observed that a very meaningful relation ($p < 0,003$) existed between *E.coli* virulence factors and ESBL genes.

In ESBL positive strains, it has been observed that a very meaningful statistical meaning ($p < 0,0001$) existed in cases where only 1 virulent factor is present in strains when the co-existence of virulence factors and ESBL genes evaluated.

In ESBL positive strains, when the relation between each virulence factors and ESBL genes examined one by one, the relation between *fimA* virulence factors and CTX-M gene has been observed as meaningful ($p < 0,002$).

In ESBL positive strains, the co-existence of *pap* gene and *fimA* gene among the virulence factors has been found to be meaningful ($p < 0,018$)

In strains with ESBL negative, the relation between ESBL and virulence factors has been searched with Pearson Correlation, and found that *pap* and *sfa* virulence factors co-existed ($p < 0,012$).

In the light of all above data, it has been observed that *fimA* from virulence factors of *E.coli* strains with CTX-M genes from formation of ESBL genes have a positive effect, and that more than one virulence factors in one strain could be available in the same ESBL positive and

negative strain, that has been found meaningful relation with CTX-M gene in ESBL positive strains, but that CTX-M gene has been found in any of the strains of ESBL negative. CTX-M gene in the development of resistance to beta-lactam group of antibiotics is seen as more dominant.

9. KAYNAKLAR

- 1 Yoldaş M.A. Enterik Bakterilerde Hızlı Antibiyotik Duyarlılık Testi İçin Yeni Bir Besiyeri Geliştirilmesi. Doktora Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2007
- 2 Kucheri R, Dasgupta P, Sacks SH, Khan MS, Sheerin NS. Urinary tract infections: new insights into a common problem. Postgrad Med J 2005; 81(952): 83-86.
- 3 Akçam FZ, Gönen İ, Kaya O, Yaylı G. Hastane infeksiyonu etkeni enterobakterlerde beta-laktam antibiyotiklere duyarlılık ve ESBL sıklığının araştırılması. Süleyman Demirel Tıp Fakültesi Dergisi 2004; 11(1): 6-9.
- 4 Demir N. Gram Negatif Bakterilerde GSBL Üretimine Katkıda Bulunan Çeşitli Risk Faktörlerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul: Kartal Eğitim Araştırma Hastanesi; 2006.
- 5 Yuluğkural Z, Mutlu B. İdrar kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının sık kullanılan antibakteriyellere karşı duyarlılıkları. Trakya Univ Tıp Fak Derg 2007; 24(1): 6-11.
- 6 Küçükbayrak A, Behçet M, Güler S, Özdemir D. Üriner semptomu olan poliklinik hastalarının idrarında üreyen *E.coli* suşlarının antibiyotik duyarlılığı. Tıp Araştırmaları Dergisi 2006; 4 (1): 18-21.
- 7 Tabibian J H, Gornbein J, Heidari S, Dien S. Uropathogens and Host Characteristics. J. Clin. Microbiol 2008; 46 (12): 3980–3986
- 8 Orak FF. Hastane enfeksiyonuna neden olan Gram Negatif Bakterilerde direnç paterni ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz tayini. Uzmanlık Tezi. Adana: Çukurova Tıp Fak; 2005.
- 9 Tullus K, Winberg J. Urinary tract infections in childhood. In : Brumeitt W, Hamilton-Miller J, Bailey R (eds). Chapman and Hall Medical, London 1998; 175-197.
- 10 İnan D. Genel Kavramlar. Arman D. Leblebicioğlu H. Üriner Sistem İnfeksiyonlarının Tedavisi. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2003; 1: 9-14.

- 11 Nicole LE. Epidemiology of urinary tract infection. *Infect Med* 2001; 18:153-62.
- 12 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.
- 13 Unat EK “*Escherichia coli*” Prof. Dr. Ekrem Kadri Unat, Tıp bakteriyolojisi ve virolojisi, Dergah Tıp yayınları, 1986, ikinci baskı, cilt 1: sayfa 546
- 14 Töreci K “*Escherichia türleri*” Ayşe Willke Topçu, Güner Söyletir, Mehmet Doğanay, infeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi, Nobel tıp kitapçevleri, 2002, cilt 2: sayfa 1564-1574.
- 15 Todar K. University of Wisconsin-Madson Department of Bacterology. Available from : URL :
<http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html>
- 16 Bilgehan H. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi Kitabı, 10. Baskı, Bağışık Yanıt ve Temelleri, Barış Yayınları, İzmir 2002; sayfa.303-317.
- 17 Bilgehan H. “*Escherichia*” Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış yayınları, 2000, 10. baskı: sayfa 3-17.
- 18 Erdem B “*Enterobacteriaceae*” Prof. Dr. Şemsettin Ustaçelebi, Temel ve Klinik mikrobiyoloji,).).
- 19 Ruiz J, Simon K, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M et al. Differences in Virulence Factors among Clinical Isolates of *Escherichia coli* Causing Cystitis and Pyelonephritis in Women and Prostatitis in Men. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40 (12): 4445-4449.
- 20 Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive desination for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*. *ExPEC. J Infect Dis* 2000; 181: 1753-1754 .

- 21 Einstein BI, Zalesnik DF. 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.
- 22 Erayman İ, Erayman B, Arıbaş ET. İdrar örneklerinden izole edilen Gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2001; 15 : 164.
- 23 Öztürk R. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları, antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişmesi ve günümüzde direnç durumu. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri pratikte antibiyotik kullanımı sempozyumu mayıs 1997, s.27-51
- 24 Chromek M, Brauner A. Urinary Tract Infection. Why Do Some Children Get Complications, While Others Don't? Current Pediatric Reviews, 2007; 3: 35-44
- 25 Kunin C M. Urinary tract infecion detection, prevention and management 5th Ed. Willams and Wilkins, Baltimore 1997; 78-98, 280- 321
- 26 Colle JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A (eds). Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology, 14. Ed. Churchill Livingstone, Newyork 1996; 363-367 .
- 27 Brooks GF, Butel JS, Morse SA eds. Jawetz, Melnck, and Adelberg's Medical Microbiology. 22nd Ed. Newyork : McGraw-Hill 2001; 146
- 28 Norrby SR. Urinary tract infections In: Finch RG. Greenwood D., Norrby SR., Whitley RJ., Antibiotic And Chemotherapy eighth edition, Churchill Livingstone, Toronto 2003; 764-771.
- 29 Baron EJ, Peterson LR, Finogold SM. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 9. Ed.,The CV, Toronto 1994; 362
- 30 Dieckhaus KD. Urinary Tract Infections In: Grace C. Medical Management of Infectious Disease 2003; 289-291

- 31 Strohl WA, Rouse H, Fisher BD, Harvey RA, Champe PC eds. Pathogenicity of Microorganisms, Illustrated Reviews. Microbiology, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2001; 3:11-14.
- 32 Johnson J. Virulence factors in Escherichia coli Urinary Tract Infection. Clin Microbiol. 1991; 4: 82-113
- 33 Tunçkanat F. Üriner sistem infeksiyonu patogenezinde bakteriyel virülans faktörleri. Klimik Derg. 1993; 6 (1): 3-5
- 34 Synder JA, Haugen BJ, Lockett V et al. Coordinate Expression of Fimbriae in Uropathogenic Escherichia coli. Infect and Immunity, 2005; 75:88-7596
- 35 Erdem B. Enterobacteriaceae. İn: Ustaçelebi S. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. ed. Ankara: Günes Kitabevi; 1999. sayfa 471-515
- 36 Naveen R, Mathai E. Some virulence characteristics of uropathogenic Escherichia coli in different patient groups. Indian J Med Res 2005; 122: 143-147.
- 37 Schembri MA, Blom J, Krogfelt KA, Klemm P. Capsule and fimbria interaction in Klebsiella pneumoniae. Infect Immun 2005; 73(8): 4626-33
- 38 Rytlevska M, Wisniewska GS, Liberek A. Selected virulence factors of uropathogenic Escherichia coli strains and clinical course of urinary tract infections in children. Med Sci Monit, 2003; 9 (4): 56-59
- 39 Drews SJ, Poutanen SM, Mazzulli T, McGeer AJ. Decreased Prevalence of Virulence Factors among Ciprofloxacin-Resistant Uropathogenic Escherichia coli Isolates J. Clin. Microbiol. 2005; 42:18–4220
- 40 Mulvey MA. Adhesion and entry of uropathogenic Escherichia coli. Cellular Microbiology 2002; 4(5): 257-271

- 41 Kucheri R, Dasgupta P, Sacks SH, Khan MS, Sheerin NS. Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgrad Med J* 2005; 81(952): 83-86
- 42 Wullt B. The role p-fimbria for *Escherichia coli* establishment and mukozal inflammation in the human urinary tract. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21 (6): 605-21
- 43 Dobrindt U, Blum-Oehler G, Hartsch T. S-Fimbria-Encoding Determinant *sfa I* Is Located on Pathogenicity Island III 536 of Uropathogenic *Escherichia coli* Strain 536, *Infection And Immunity*, 2001; 4248–4256.
- 44 İnci O. Çocuk ve Erişkinlerde Ürogenital İnfeksiyonlar Kitabı, Üriner İnfeksiyonlar, Nobel Tıp Kitabevleri 1996; 34-35.
- 45 Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı Kitabı, 3. Baskı. İdrar Yolları Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik İncelenmesi, Barış Yayınları, İzmir 2002; 279-381.
- 46 <http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/E.coli.html>.
- 47 Available from : URL : www.path.cam.ac.uk/partIB_pract/P16/
- 48 Yapar ŞM. Hastane Kökenli *Escherichia Coli* İzolatlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar. Uzmanlık Tezi. Edirne: Trakya Üniversitesi; 2007.
- 49 Akova M. Dikkat: Denişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz (GSBL) var! *ANKEM Dergisi* 2004; 18 (Ek 2): 98-103
- 50 Data compiled from <http://www.lahey.org/studies/webt.stm>. (February, 2003).
- 51 Güler Ö. Klinik Örneklerden İzole Edilen Bakterilerde Beta-Laktamaz Varlığının Ve Çeşitli Antibiyotik Gruplarına Karşı Duyarlılıklarının Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Erzurum: Atatürk Üni; 2007.

- 52 Öksüz L, Gürler N, Akıncı N, Şirin A. Aylık bir dönemde pediatrik poliklinik hastalarının idrar örneklerinden izole edilen GSBL oluşturan *Escherichia coli* ve *Klebsiella* suşları ANKEM Derg 2008;22(1):14-19
- 53 Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler Class A extended - spectrum *Blactamases* in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2385-2392
- 54 Bradford P. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important threat, *Clin Microbiol Rev* 2001;14: 933-51.
- 55 Boyd D, Tyler S, Christianson S. Complete nucleotide sequence of a 92 kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 ESBL involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimic. Agent and Chemo* .2004; 3758-3764
- 56 Chaibi EB, Sirot D, Paul G et al: Inhibitor-resistant TEM-beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics, *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 447-58.,
- 57 Pitout J DD, Hossain A, Hanson N. Phenotypic and Molecular Detection of CTX-M- β -Lactamases Produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J of Clin Microbio*, 2004; 42 (12): 5715–5721.
- 58 Paterson DL. Resistance in Gram Negative Bacteria: enterobacteriaceae *The American Journal of Medicine* 2006; 119: 20-28.
- 59 Discovery of CTX-M-Like Extended-Spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Five U.S. States. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2003; 2382–2383.
- 60 Akova M. Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar ve Klinik Önemi. "İçinde" Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D (yazarlar). *Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004: 85-94.

- 61 Durupınar B. Antibiyotiklere Dirençte Yeni Eğilimler Klimik Dergisi 2001; 14 (2): 47-56.
- 62 Mehli M, Zer Y, Gayyurhan E. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Enterobacteriaceae suşlarında GSBL oluşturmanın ÇDST ve Vitek2 yöntemler ile araştırılması. Ankem Derg 2007; 21(2):71-75
- 63 Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman. 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.
- 64 Vahaboglu H, Coskuncan F, Tansel O et al. Clinical importance of extended spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing Acinetobacter spp. And Pseudomonas aeruginosa strains. J Med Microbiol 2001; 50: 642-5.
- 65 Livermore DM. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. J Antimicrob Chemother 1998; 41(Suppl 1): 25-41.
- 66 Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). Clin Microbiol Infect 2000; 6: 460-3.
- 67 Amyes SGB, Miles RS. Extended-spectrum beta-lactamases: the role of inhibitors in therapy. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 415-7.
- 68 Piroth L, Aube H, Doise JM, Vincent-Martin M. Spread of extended spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae: Are betalactamase inhibitors of therapeutic value. Clin Infect Dis 1998; 27: 76-80.
- 69 Akhan SÇ, Coskuncan F, Tansel O, Vahaboglu H: Conjugative resistance to tazobactam plus piperacillin among extended-spectrum beta-lactamase producing nosocomial Klebsiella pneumoniae. Scand J Infect Dis 2001; 33: 512-5.

- 70 Bonomo RA, Rudin SA, Shlaes DM: Tazobactamis a potent inactivator of selected inhibitor-resistant classA beta-lactamases, FEMS Microbiol Lett 1997;148: 59-62.
- 71 Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum betalactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia, Clin Infect Dis 2000; 30: 473-8.
- 72 Available from: URL : <http://www.drinh.com/konsultasyon/k17.pdf>
IntJ Antimicrob Agents 2003;22:S49-52.
- 73 Danel F, Hall LMC, Duke B, GurD, Livermore DM: OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:1362-6.
- 74 Rice LB, Eckstein EC, DeVente J, Shlaes DM. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered at the Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Clin Infect Dis 1996; 23:118-24.
- 75 Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β - lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents. Chemoter. 1995; 39: 1211-1239.
- 76 Yetkin G, Kuzucu Ç, çalışkan A, Ay S. Kan Kültürlerinde üreyen *Escherichia coli*'lerin antibiyotik duyarlılıkları, GSBL oranları ve hastane birimlerine göre dağılımı İnönü Üni. Tıp fak. Derg. 2006; 13(3): 147-150
- 77 Available from: URL :
Kaynak: <http://www.dotmed.com/listing/654112>
- 78 İşler H. Klinik Ve Poliklinik İdrar Örneklerinden İzole Edilen *Escherichia Coli* Ve *Klebsiella* Suşlarında Extended Spectrum Beta Lactamase Oranlarının Belirlenmesi, Bu Oranların Vitek-2 Ve Çift Disk Sinerji Yöntemleriyle Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Samsun: OnDokuz Mayıs Üniversitesi; 2008.

- 79 Thomson K, Cornish N, Hong S, Hemrick K, Herdt C, Molan E. Comparison of Phoenix and VITEK 2 Extended-Spectrum- β -Lactamase Detection Tests for Analysis of Escherichia coli and Klebsiella Isolates with Well-Characterized β -Lactamases J of Clinl Microbio. 2007; 45 (8): 2380-2384.
- 80 Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Stürenburg E, Seifert H. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. J Clin Microbiol. 2007; 45(4): 1167-74.
- 81 Lee BY, Jeong SH, Jeong TS, Nam HJ, Ji JH, Hong YR. Detection of Extended-spectrum beta-Lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella spp. with the Vitek GNS 121 Card. Korean J Clin Pathol. 2001; 21(5): 350-354.
- 82 Sanders CC, Barry AL, Washington JA. Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Members of the Family Enterobacteriaceae with the Vitek ESBL Test. J Clin Microbiol. 1996; 34 (12): 2997–3001
- 83 Durmaz R. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji 2. baskı. Nobel Tıp Kitabevi 2001. Sayfa 21-34
- 84 Durmaz R. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Tipleri. Multipleks PZR. Available from: URL :
<http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/035.pdf>
- 85 Chmelnitsky I, Carmeli Y, Leavitt A, Schwaber M, J. Venezia S N. CTX-M-2 and New CTX-M-39 Enzyme are the major ESBL in multiple Escherchia coli clones isolated in Tel Aviv, Israel. Antimic. Agents and Chemo. 2005; 4745-4750
- 86 Birkett C, Ludlam H.A, Woodford N. Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum β lactamases. J Clin Microbiol. 2007; 56: 52-55

- 87 Santo E, Madeco C, Marin JM. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Riberira Preto Sao Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop.* 2006; 48 (4):185-188.
- 88 Hull R, Rudy D, Wieser I, Donovan W. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates from patients with symptomatic and asymptomatic bacteriuria and neuropathic bladders due to spinal cord and brain injuries. *J Clin Microbiol.* 1998; 115-117
- 89 Blanco M, Blanco J.E, et al. Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: Relationship with expression of adhesins and production of toxins. *Res Microbiol.* 1997;148(9):745-55.
- 90 Emerging Infectious Diseases. www.cdc.gov/eid. Vol.10, No.9, September 2004 1697-1698.
- 91 Akram M, Shahid M, Khan AU. Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in JNMC Hospital Aligarh India. *Ann of Clinical Microbio and Antimicrobials* 2007; 6 (4): 2-7.
- 92 Cekanová L, Kolár M. Prevalence of ESBL-positive bacteria in the community in the Czech Republic. *Med Sci Monit.* 2009; 15(7):202-6.
- 93 Villegas M, Correea A, Pereza F, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2004; 49 (3): 217-222.
- 94 Arsoy M, Rad A Y, Akin A, Akar N. Relationship between susceptibility to antimicrobials and virulence factors in paediatric *Escherichia coli* isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008; 31: 4-8.

- 95 Vranes J, Schönwald S, Zagar Z. Relation between P-fimbriae and resistance to amoxicillin, carbenicillin and tetracycline in uropathogenic strains of *Escherichia coli*. *Lijec Vjesn.* 1994;116(7-8):178-81.
- 96 Jemima SA, Verghese S. Multiplex PCR for bla CTX-M & bla SHV in the extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing Gram-negative isolates. *Indian J Med Res* 2008; 313-317
- 97 Naas T, Oxacelay C, Nordmann P. Identification of CTX-M-Type Extended-Spectrum--Lactamase Genes Using Real-Time PCR and Pyrosequencing Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 2007; 223–230
- 98 Arsoy M, Aysev D, Ekim M, Ozel D, Köse SK, Ozsoy ED, Akar N. Detection of virulence factors of *Escherichia coli* from children by multiplex polymerase chain reaction. *Int J Clin Pract.* 2006; 60(2):170-3
- 99 Siiri K, Kai T, Inga V, et al. Persistence of *Escherichia coli* Clones and Phenotypic and Genotypic Antibiotic Resistance in Recurrent Urinary Tract Infections in Childhood. *J Clin Microbiol.* 2009; 99–105.
- 100 Shannon E. M, Baofeng H, Kathleen A, Irving N, Paul H. E. Prevalence of CTX-M β -lactamases in Philadelphia. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 10:1128.
- 101 Bülüş M, Gürol Y, Bal. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Oranları 2000-2002. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2003; 33: 31-34.
- 102 Kepekçi P. İdrar Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia Coli* Ve *Klebsiella* Suşlarında Fosfomisin Trometamol Duyarlılığı. Uzmanlık Tezi. İstanbul: Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2005.
- 103 Murray PR, Baron EJ et al. *Klinik Mikrobiyoloji*. Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M. (Çev) 9. Baskı. Ankara. Atlas Kitapçılık. 2009.

- 104 Kalem F, Gündem NS, Arslan U, Tuncer İ. İdrar Örneklerinden İzole Edilen Escherichia Coli Suşlarında Antimikrobiyal Duyarlılığı ANKEM Derg 2008;22(4):193-197
- 105 Çetin H, Öktem F, Örmeci A.R, Yorgancıgil B, Yaylı G. Çocukluk çağı idrar yolu enfeksiyonlarında Escherichia coli ve antibiyotik direnci. S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 2006: 13(2)/ 12-16
- 106 Dündar D, Willke A, Tamer G, İdrar Yolu Enfeksiyonu Etkenleri ve Antimikrobiyal Duyarlılıkları. Klimik Dergisi. 2008; 21 (1):7-11.
- 107 Akay H, Duranay M, Akay A. Üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen mikroorganizmaların dağılımı ve Escherichia coli suşlarında antibiyotik duyarlılığı. İst. Tıp Fak. Derg. 2006;69; 1-4.
- 108 Bogyiová E, Kmetová M, Biros E, Siegfried L. Detection of pap-, sfa- and afa-specific DNA sequences in Escherichia coli strains isolated from extraintestinal material. Folia Microbiol (Praha). 2002;47(6):723-6.
- 109 Yavuzdemir Ş, Aysev D, Güriz H. Genişlemiş Spektrumlu Betalaktamaz Yapan E.coli Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları Türk Mikrobiyoloji Cem Derg (2003) 33:126-129.
- 110 Branger C, Zamfir O, Geoffroy S. Genetic background of Escherichia coli and Extended spectrum β – lactamase type. Emerging Infectious Diseases. 2005; 11(1): www.cdc.gov/eid.
- 111 Rad AY, Bilge S, Fidan A. Escherichia coli Suşlarının Vitek-32 ile çalışılan Siprofloksasin ve diğer antibiyotik MİK değerlerinin karşılaştırılması. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi Klimik 2007.
- 112 Michael RM, Elizabeth B. Molecular Characterization of Cefoxitin-Resistant Escherichia coli from Canadian Hospitals. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 2005; 358-365

- 113 Mulvey MR, Bryce E, Boyd D at all. Ambler Class A Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(4): 1204–1214.
- 114 Özkaya D, Gökengin D. Kadınlarda Yineleyen Üriner Sistem İnfeksiyonları ve Antibiyotik Direncindeki Değişiklikler. *Klinik Dergisi.* 2007; 20 (3):77-82
- 115 Bouguessa NR, Mendonic N, Leita J. CTX-M-3 and CTX-M-15 Extended-Spectrum β -Lactamases in Isolates of *Escherichia coli* from a Hospital in Algiers, Algeria. *J Clin. Microbiol.* 2006; 44 (12): 4584-6
- 116 Ece GV. Klinik Örneklerden İzole Edilen *K.pneumonia*, *K.oxytoca*, *E.coli* suşlarında GSBL enzimi varlığının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi: Ankara; 2005
- 117 Clinical and Laboratory Standards Institute. Antibiyotik Duyarlılık Testleri İçin Uygulanan Standartlar. Pennsylvania: 2007

10. TEŞEKKÜR

Bu tez aşamasına gelmek benim ve hocalarımla çok uzun zamanlarını aldı. Arada yaşadığım aksilikleri saymazsak bu teşekkürleri yazabildiğim için çok mutluyum. Başta Sayın hocam Prof. Dr. Semra Kuştımur olmak üzere Gazi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalındaki tüm hocalarıma ayrı ayrı teşekkür ederim. Bu arada evde bana sürekli “baba hadi derslerin bitmedimi” diyen kızım Zeynep Gaye’ye gösterdiği sabır için ve son olarak eşime hep yanımda olduğu için teşekkür ederim.

11. ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında İstanbul'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi İstanbul'da tamamladıktan sonra yüksek öğrenimimi 1991 yılında İstanbul Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde tamamladım. 1996 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilimdalı'nda Yüksek Lisansımı tamamladım. 2009 yılında Anadolu Üniversitesi Sağlık Kurumları İşletmeciliği bölümünü bitirdim. 1991 yılından itibaren Sağlık Bakanlığı merkez ve il teşkilatlarının her basamağında hekim ve üst düzey yöneticilikler yaptıktan sonra 2004 yılından itibaren özel sektörde (Ankara Mesa Hastanesi, Ankara Güven Hastanesi'nde) hastane yöneticilikleri yaptım. Halen bir özel sağlık kuruluşunda (Dirimsel Tıp Merkezi) başhekim olarak çalışmaktayım. Evliyim ve 1 kız çocuğum var.