

T.C.
FATİH ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN ÜRETİLEN E.COLİ SUŞLARININ
ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ VE "PULSED-FİELD
GEL ELECTROPHORESİS" GENOTİPİK PROFİLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. TUTKU ARSLANTAŞ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. MUSTAFA ULUKANLIGİL

ANKARA 2011

T.C.
FATİH ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN ÜRETİLEN E.COLİ SUŞLARININ
ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ VE "PULSED-FİELD
GEL ELECTROPHORESİS" GENOTİPİK PROFİLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. TUTKU ARSLANTAŞ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. MUSTAFA ULUKANLIGİL

*Bu tez çalışması Fatih Üniversitesi tarafından P53011018 nolu
projeye desteklenmiştir.*

ANKARA 2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v,vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	2-48
II.1 E.coli	2
II.1.1 Yapısal, biyokimyasal ve serolojik özellikleri	2
II.1.2 Klinik özellikler	3
II.1.1 İntestinal hastalık tabloları	3
II.1.2.2 Extraintestinal hastalık tabloları	5
II.1.2.3 Üropatojenik E.coli	6
II.2 İdrar yolları enfeksiyonları	7
II.2.1 Üriner sistem enfeksiyonlarının fizyopatogenezi	7
II.2.2 ÜSE'de kullanılan mikrobiyolojik tanımlar	11
II.2.3 Epidemiyoloji	12
II.2.4 Etyoloji	14
II.2.5 Patogenez	14
II.2.6 Üriner sistem enfeksiyonlarında semptomlar	17
II.2.7 Klinik	18
II.2.8 Tanı	21
II.2.9 Tedavi	22
II.2.10 Özel grupta üriner sistem enfeksiyonları	27
II.2.11 Üriner sistem enfeksiyonlarından korunma	28
II.3 ESBL	29
II.4 PFGE	36
II.4.1 Restriksiyon profillerinin analizi ve izolatların yakınlık derecelerine göre incelenmesi	38
II.4.2 Genetik olayların PFGE üzerine etkisi	40
II.4.3 Sonuç	41
III. MATERYAL VE METOD	42
III.1 Çalışmada kullanılan izolatlar	42
III.2 Stok suşların canlandırılması ve saflaştırılması	42
III.3 Suşların identifikasyonu ve doğrulaması	42
III.4 BBL Crystal TM Identification System Enteric/Nonfermenter ID Kit	42
III.5 Antimikrobiyal duyarlılık testleri	43
III.6 Disk difüzyon testi	43
III.7 PFGE	43
III.7.1 Kullanılan malzemeler	43
III.7.1.1 Ekipman	43
III.7.1.2 Kimyasallar	44
III.7.2 Test prosedürü	44
III.7.2.1 İzolatların hazırlanması	44
III.7.2.2 İzolatların agaroz gömülmesi	45
III.7.2.3 Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması	46
III.7.2.4 Hücrelerin lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması	46
III.7.2.5 Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi	46

III.7.2.6 Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi	47
III.7.2.7 Elektroforez	48
III.7.2.8 Sonucun gözlenmesi	48
IV. BULGULAR	49
V. TARTIŞMA VE SONUÇ	57
VI. ÖZET	66
VII. SUMMARY	68
VIII. KAYNAKLAR	70-81

Teşekkür;

Öncelikle bu tez çalışmasını yapmama olanak sağlayan, dört yıllık asistanlığım süresince bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, bana her anlamda çok şey öğreten, öğrencisi olmaktan ve kendisini örnek almaktan gurur duyduğum tez danışmanım ve hocam Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı sayın Doç. Dr. Mustafa Ulukanlıgil'e en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Araştırma süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı şefi sayın Prof. Dr. Rıza Durmaz'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını almış olduğum asistan arkadaşım Dr. Gül Güner Soylu'ya ve emeği geçen tüm bölüm ve hastane çalışanlarımıza teşekkür ederim.

Tez projemi destekleyerek bana maddi olanak sağlayan Fatih Üniversitesi Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca benden hiçbir maddi manevi desteği esirgemeyen, her zaman yanımda olan, çocukları olmaktan gurur duyduğum canım annem, babam ve kardeşime, çalışmalarım boyunca beni destekleyen hep yanımda olan sevgili eşime ve varlığı ile bana yaşama gücü veren biricik kızıma teşekkür ederim.

Dr. Tutku Arslantaş - 2011

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

İYE	İdrar yolları enfeksiyonu
IMVIC	İndol, metil red, voges preskauer, citrate
cGMP	Cyclic guanozin monofosfat
GER	Granüllü endoplasmik retikulum
ÜSE	Üriner sistem enfeksiyonu
ABD	Amerika birleşik devletleri
TNF	Tümör nekroz faktörü
CRP	Cerum reaktif protein
SF	Serum fizyolojik
USG	Ultrasonografi
CT	Computarise tomografi
TM-SMZ	Trimetoprim-sulfometoksazol
TMP-SXT	Trimetoprim-sulfometoksazol
iv	İntravenöz
ESBL	Extended spektrum beta-laktamaz
MİK	Minimal inhibitör konsantrasyon
B-laktam	Beta-laktam
B-laktamaz	Beta-laktamaz
NCCLS	National Committee For Clinical Laboratory Standarts
Cfu/ml	Colony forming unit/mililitre
ÇDS	Çift disk sinerji
DNA	Deoksribonükleik asit
PCR	Polimerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polimorfizm
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
G+C	Guanosin + Cytosine
CHEF	Contour Clamped Homogeneous Electric Fields

TE	Tris-EDTA
Mm	Mikromol
ADP	Antibiyotik duyarlılık paterni
USA	United States of America
ÜSYE	Üst solunum yolları enfeksiyonu
CIP	Ciprofloksasin

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil.1 FastDigest XbaI PFGE görüntüsü, 2006-1.grup [1-10]	51
Şekil.2 FastDigest XbaI PFGE görüntüsü, 2007-2.grup [11-21]	51
Şekil.3 FastDigest XbaI PFGE görüntüsü, 2008-3.grup [21-30]	52
Şekil.4 <i>E.coli</i> FastDigest XbaI PFGE profili, 2006 [1-10]	53
Şekil.5 <i>E.coli</i> FastDigest XbaI PFGE profili, 2007 [11-20]	53
Şekil.6 <i>E.coli</i> FastDigest XbaI PFGE profili, 2008 [21-30]	54
Şekil.7 <i>E.coli</i> FastDigest XbaI PFGE profili, 2006-2008 [1-30]	55

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo.1 ÜSE'lu (Üriner Sistem Enfeksiyonu) hastalar ile sağlıklı bireylere ait idrar parametrelerinin karşılaştırılması	9
Tablo.2 Hastalarda Bakteriüri Prevalansı	11
Tablo.3 Alt üriner sistem enfeksiyonlu hastaya ilişkin risk faktörleri	18
Tablo.4 Alt üriner sistem enfeksiyonu üç günlük tedavide önerilen oral antimikrobikler	24
Tablo.5 Akut Pyelonefritte Ampirik Tedavi Önerileri	26
Tablo.6 ESBL'lerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler	35
Tablo.7 FastDigest <i>XbaI</i> Restriksiyon enzim karışımı	47
Tablo.8 PFGE koşulları	48
Tablo.9 <i>E.coli</i> suşlarının direnç profili	50
Tablo.10 <i>E.coli</i> suşlarının PFGE ve antibiyotik direnç profillerinin karşılaştırılması	56

I. GİRİŞ

İdrar yolu infeksiyonları (İYE); sık görülen ve doğru tedavi edilmediğinde ya da yetersiz tedavi edildiğinde ciddi komplikasyonların ortaya çıkmasına sebep olan hastalıklardır. Bu özelliğiyle işgücü kaybı ve tedavi maliyetinin artmasına neden olmaktadır. Hastaların çoğu tek bir defa veya nadir ataklar şeklinde hastalıkla karşılaşırken, bir kısmında hastalığın tekrarladığı gözlenmektedir. Özellikle kadınlarda İYE'larının karakteristik özelliği tekrarlamaya eğilimli olmasıdır. Hayat boyu en az bir İYE'ü geçirme riskinin %60 olduğu bildirilmektedir.

İYE'ları; akut nonkomplike sistit (kadınlarda), akut nonkomplike pyelonefrit, komplike İYE (erkeklerdeki İYE), asemptomatik bakteriüri ve tekrarlayan İYE olarak 5 gruba ayrılmaktadır. Akut nonkomplike sistit; en sık karşılaşılan klinik formdur. Tekrarlayan idrar yolu infeksiyonları, antimikrobik tedavinin sonlandırılmasından sonraki 2 hafta içinde ve bir önceki epizoddan sorumlu bakteriye bağlı olarak ortaya çıkarsa relaps (nüks); ilk altı ay içinde ve yeni bir bakteriye bağlı olarak ortaya çıkarsa reinfeksiyon olarak adlandırılır. Akut sistit geçiren kadınların yaklaşık %20'sinde infeksiyon tekrarlamaktadır. Tekrarlayan asemptomatik bakteriürinin de tekrarlayan idrar yolu infeksiyonu için hazırlayıcı bir faktör olduğu bilinmektedir.

Genç yaştaki hastalarda, hastalık prevalansının kadınlarda daha yüksek olduğu gözlenirken, yaşlı grupta kadın ve erkeklerde prevalans birbirine benzemektedir. Genç kadınlarda sık cinsel ilişki, diyafram kullanımı, cinsel ilişki sonrası idrara çıkmama ve hikayesinde tekrarlayıcı infeksiyonların varlığı üriner infeksiyon için risk faktörleridir .

Bu çalışmada 2006-2008 yılları arasında Fatih Üniversitesi Hastanesi'ne idrar yolu enfeksiyonu şüphesi ile başvuran hastaların idrar örneklerinden elde edilen *E. coli* suşlarının antimikrobial direnç paternleri ve PFGE genotipik profillerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

II. GENEL BİLGİLER

II.1 E.COLİ

II.1.1 Yapısal, Biyokimyasal ve Serolojik Özellikleri

Escherichia coli 2-6 µ boyunda ve 1-1,5 µ eninde düz, uçları yuvarlak çomakçık şeklinde bakterilerdir. EMB besiyerinde küçük koyu renkli ve metalik refle veren koloniler oluşturur. Hareketlidir, 44°C ve daha düşük sıcaklıklarda laktozdan asit ve gaz oluşturur (laktoz pozitif). İndol pozitif, metil kırmızısı testi pozitif, Voges Praskauer testi negatiftir. Sitratlı besiyerinde üremezler, özetle *E.coli* için IMVIC testleri (++--)'dir. *E.coli* üreyi parçalamaz, H₂S oluşturmaz. Lizin dekarboksilaz pozitifdir, ornitin dekarboksilaz değişken özellik gösterir.

E.coli'nin O,H,K antijenleri vardır. Bunların farklı kombinasyonları ile yüzlerce değişik serotip ortaya çıkabilir. Ancak bunların sadece sınırlı sayıdaki kısmı klinik öneme sahiptir. O antijenleri somatik ısıya dayanıklı lipopolisakkarit yapıda antijenlerdir. Kaynatmaya ve alkole dirençli formole dayanıksızdırlar. Bu antijenler spesifik insan hastalıkları ile ilgilidir. K antijenleri kapsül antijeni niteliğindedir. K antijeni O antijeninin dışında bulunur. Bazıları polisakkarit bazıları protein yapısındadırlar. Bu antijenler O antikoru ile aglutine olmazlar ve virulans ile ilgili olabilirler. H antijenleri flagellada bulunurlar ve ısı veya alkol ile denatüre olurlar. Bu antijenler IgG ile aglutine olurlar.

Gastrointestinal sistemin doğal bir üyesidir. Alt gastrointestinal sistem florasının %99'unu anaerobik bakteriler (başta *Bacteroides fragilis* grubu) oluşturur. Aerobik florada ise *Escherichia coli*, potansiyel bir patojen olarak ilk sırada yer alır. *Escherichia coli*'nin farklı lokalizasyonlarda hastalık yapan kökenlerinin virülans faktörleri arasında bazı farklılıklar vardır:

- Gastrointestinal hastalık yapan kökenler: Gastrointestinal hastalıklar, insan barsağındaki flora kökenlerinde bulunmayan özelliklere bağlı olarak gelişir. *E.coli*'nin toksinleri ve invazyon yeteneği rol oynar.
- Ekstraintestinal hastalık yapan kökenler:
 - Patojen olsun, olmasın tüm kökenlerde ortak Mannoza Sensitif (MS) Tip I fimbriyalar bulunur. Bunlar kolona tutunmadan sorumludur.

- Üriner infeksiyona neden olan kökenlerde hemolizin, Tip II (mannoza dirençli) fimbrialar, özgül K antijenleri ve kolisin-V gibi virülans faktörleri bulunur. Tip II fimbriaların en iyi bilinenleri P ve S fimbrialarıdır.

Piyelonefrite yol açan *Escherichia coli* kökenlerinin sistite yol açanlara göre epitele daha sıkı yapıştıkları gözlenmiştir. Bu kökenlerde, eritrositlerdeki P kan grubu antijenlerine ve üroepitelyal hücrelerdeki P antijenlerine yapışabilmesi nedeniyle P fimbriaları bulunur . Sistite neden olanlarda ise S fimbriaları bulunur . S fimbriaları ayrıca endotele ve beyin ventriküllerine yapışmadan da sorumludur bu nedenle yenidoğan sepsis ve menenjitleri etkenidir.

Siyalik asit yapısındaki K1 antijeni, bulunduğu *Escherichia coli* kökenlerini fagositozdan korur. Gebelik, bu kökenlerin maternal, intestinal dolayısıyla da vajinal kolonizasyonunu artırır. K1 antijeni içeren kökenler, yenidoğanın bakteriyel menenjitlerinin en sık iki etkeninden birisidir. Diğeri ise, yine kapsülü siyalik asit yapısında olan *Streptococcus agalactiae*'dir.

İmmünite normal ise, gastrointestinal sistem ve üriner sistem infeksiyonları sadece virülen kökenlerce oluşturulur. Ancak, immünitesi defektif kişilerde gelişen respiratuvar sistem infeksiyonları, fırsatçı niteliktedir. Bu tablodan sorumlu kökenlerin herhangi özel bir virülans faktörü yoktur, non-patojenlerdir. Nozokomiyal pnömonilere yol açarlar.

II.1.2 Klinik Özellikler

II.1.2.1 İntestinal hastalık tabloları

Escherichia coli, alt gastrointestinal florada bulunmasına karşın, enterotoksin üretebilen ya da invazyon yeteneği bulunan kökenleri ile intestinal hastalık tablolarına yol açar. Gastrointestinal sistem infeksiyonları açısından, sıradan kökenlerden farklı virülans faktörleri ile ön plana çıkmış en azından beş kökeni vardır:

- **Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC):** Plazmid kontrolünde iki tür enterotoksin üretirler. İnce barsak epitel hücrelerine tip-I fimbriaları ile sıkıca yapışırlar ve bu iki toksin etkinliği ile sulu ishal gelişimine neden olurlar. Enterotoksinlerinden birisi, A-5B yapısındaki termolabil toksin (LT)'dir; barsak epitel hücrelerinde adenilat siklaz aktivasyonu ile cAMP artışına yol açar. Sonuçta aşırı su ve elektrolit salınımı gerçekleşir. Diğer enterotoksini olan stabil

toksin (ST) ise guanilat siklaz aktivasyonu ile cGMP artışına neden olur.(2,3,4) Bu gelişim ise sodyum geri emiliminin inhibisyonu ile sonuçlanır. ETEC, turist ishallerinin en sık etkenidir (>%50).

- **Enteroinvazif *Escherichia coli* (EIEC):** Laktoz pozitifliği dışında *Shigella* türlerine çok benzeyen bir kökendir. H antijeni bulunmaz. Sigelloz gibi kanlı, mukuslu, yüksek atesle seyreden (dizanteriform) kolitlere yol açar.(2,3,4) Diğer *Escherichia coli* kökenlerinden ayrımı için **Sereny testi** (kobayda keratit oluşturma) kullanılır.
- **Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC):** *Escherichia coli* O157:H7 kökenidir. Bakteri, ortak fimbriaları ile enterositlere yapışır. Bir bakteriyofaj tarafından kodlanan, *Shiga* ekzotoksine benzer, Shiga-like toksini (verotoksin 1 ve 2) vardır.(2,3,4) Bu nedenle Verotoksijenik *Escherichia coli* (VTEC) adı da verilir. Genellikle hamburger gibi kıymadan hazırlanan et ürünlerinin yenmesi ile özellikle küçük çocukları etkileyen hemorajik kolit salgılarına neden olur. Kolitlerin %10'unda, trombotik mikroanjyopati ile özel bir tablo olan hemolitik üremik sendrom (HÜS) gelişir. HÜS tablosundan, kana karışan verotoksin sorumludur. Bir bakteriyel invazyon söz konusu değildir. İnsan böbrek korteks ve medullasındaki glomerül ve arteriol endotelinde, tubuler epitel hücrelerinde bol miktarda verotoksin reseptörü (Gb3) bulunur. Toksin hücreye Gb3 ile tutunarak içine girer. Golgi cihazında tersil gidişle GER'e ulaşır. GER'de ribozomların 60S alt biriminin 28S'ini oluşturan RNA zincirinden bir adenin nükleobazını söküp alır. Böylece, insan uzama faktörü (eUF-1 ve eUF-2) irreversibl olarak engellenmiş olur.(2,3,4) Hücrede protein sentezi durur, hücre ölür. Mikrovasküler endotelde meydana gelen hasar sonucunda lümeninde trombosit ve fibrin birikir. Küçük damarlarda ortaya çıkan bu parsiyel tıkanma sonucunda eritositlerde mekanik fragmentasyon ve böylece mikroanjyopatik hemolitik anemi ortaya çıkar; hemoglobin 5 g/dl'nin altına düşebilir, trombositopeni gelişir. Glomerüler kapillerlerdeki mikrotrombüsler nedeniyle gelişen mikrosirkülasyon bozukluğuna bağlı olarak da böbrek yetmezliği gelişir. Olgular çoğunlukla sekelsizce birkaç haftada iyileşirse de bazı olgular ölüm veya son dönem böbrek yetmezliği ile sonuçlanabilir. EHEC, HÜS'ün diğer etkeni olan *Shigella dysenteriae*'dan farklı olarak laktozu parçalar. Toksinler arasında da önemli bir fark vardır; verotoksin,

Shiga toksininin aksine bir nörotoksin değildir; merkez sinir sistemi patolojilerine yol açmaz. *Shiga* toksini reseptörleri ise barsak epitel, glomerül ve arteriol endoteli, tubuler epitel hücreleri ve beyin hücrelerinde bulunur. . Kolit, böbrek yetmezliği ve ensefalopati (konvülsif ishal) etkenidir.

- **Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC):** Özellikle bakıcı ya da hemşire kaynaklı süt çocuğu ishallerinden sorumludur. Bakteri, aderans faktörü ve intimin proteini etkinliği ile enterositlere sıkıca bağlanır. İntiminin konak hücreye bağlanacağı özgün reseptörleri (translocated intimin reseptörü, Tir) özel bir enjeksiyon sistemi ile enterositlerin sitoplazmik membranına atar. Tir ile intestinal hücrelerin iskeletini oluşturan aktinler arasında bir etkileşim olur. İntestinal hücrelerde uygunsuz F-aktin birikimi gelişir.(2,3,4) Bu durum, mikrovilluslarda pedestal adı verilen uzantılar gelişmesine, şekil bozukluğuna ve dejenerasyona yol açar. Sonuçta barsak epitel hücresinde yapış-boz-dök mekanizması sonucu mikrovillus destrüksiyonu gelişir. *Rotavirüs* ve diğer bazı virüsler gibi ozmotik ishallerine neden olur.
- **Enteroagregatif (Enteroadherent) *Escherichia coli* (EAEC):** ETEC gibi sulu ishale neden olur. Turist ishallerinin diğer bir etkenidir.

II.1.2.2 Ekstraintestinal hastalık tabloları

Escherichia coli'nin, barsak dışındaki bölgelerde oluşturduğu hastalıklarda söz konusu olan virülans faktörleri; kapsülü, endotoksini ve fimbriyalardır. . Özellikle jinekoloji ve gastrointestinal cerrahi kliniklerinde sıklıkla hastane infeksiyonlarına, sepsislere ve yara infeksiyonlarına yol açar. *Escherichia coli*, hastane içi ya da dışında edinilmiş üriner sistem infeksiyonlarının en sık nedenidir. Hastane dışında edinilmiş üriner infeksiyonların %80'inden, hastanede gelişen üriner infeksiyonların ise %40-50'sinden sorumludur. Üriner kateter takılması önemli bir risk faktörüdür.

Eriskinlerdeki spontan bakteriyel peritonitlerin en sık etkenidir.(4,5,6) *Escherichia coli*, akut taşlı kolesistitlere yol açan en sık etkendir. Bunu *Klebsiella pneumoniae* ve *enterokoklar* izler. Akalkülöz (taşsız) kolesistitlerde ise en sık etkenler *Campylobacter jejuni* ve *Salmonella* türleridir. Yenidoğan menenjitlerinin %40'ından sorumludur. Bunların da %75'i K1 antijenli suşlardır.

Sepsislerde, geliştiği klinik ve hasta özelliklerine göre değişebilmekle birlikte, etiyolojik ajanların basında %60 gram negatif bakteriler gelir. Enterik bakteriler; tüm sepsislerin 1/3'ünden, *Escherichia coli* ise bunların %40'ından sorumludur. Sepsise yol açan en sık enterik bakteridir; en sık kaynak ise üriner sistemdir.

II.1.2.3 Üropatojenik *E.coli* (UPEC)

Üriner sistem infeksiyonu etkeni olarak izole edilen *E.coli* suşları extraintestinal sistem patojeni *E.coli* (EXPEC) grubu kapsamında yer alan ve üropatojen *E.coli* (UPEC) olarak tanımlanan suşlardır.(64) UPEC suşları kromozomlarında yer alan tanımlanmış patojenite adaları (PAI) ve bu DNA bölgelerinde yer alan ve bazı virulans faktörlerini kodlayan genler açısından belirli gen profilleri göstermeleri ve suşların çoğunun filogenetik grup B-2 içinde yer almalarıyla, gastrointestinal patojen *E.coli* suşları ve kommensal *E.coli* suşlarından ayırtedilirler.

UPEC suşlarının sahip oldukları virulans faktörlerinin başlıcaları arasında fimbriyal ve afimbriyal adezinler , hemolizin, sitotoksik nekrotize edici faktör ,aerobaktin, dış membran proteini T ve demir ile regüle edilen gen A homologu adhezin yer alır.

UPEC suşları adhezinler (P, M, S, F1C, Dr ve tip 1 fimbriya) aracılığıyla üriner sistem epitelyum hücrelerine tutunur ve kolonizasyonu gerçekleştirirler. Tip 1 fimbriya mesane hücrelerine adheransta ve mesane epitelinin invazyonunda rol oynar. P fimbriya özellikle pyelonefrite neden olan suşlarda önem taşır ve P fimbriya'nın varlığı ile infeksiyonun (özellikle pyelonefrit) şiddeti arasında güçlü bir bağ olduğu bildirilmiştir.

Kapsül ve endotoksik lipopolisakkarit (LPS) molekülleri bakteriyi fagositozdan ve serumun bakterisidal etkisinden korur.(190,191) LPS sitokin sentezini indükleyerek inflamatuvar yanıtı güçlendirir ve somatik antijene karşı gelişen spesifik antikörlerin sentezini teşvik eder.

Virulans faktörleri kapsamında yer alan toksinler arasında alfa hemolizin, sitotoksik nekrotize eden toksin-1 (CNF-1) ve birçok mesane ve böbrek hücre soylarına sitopatik etkisi olduğu gösterilen salgısal ototransportör toksin (Sat) yer almaktadır.(195,196) Alfa hemolizinin pyelonefritte görülen böbrek hasarının oluşmasında rol oynayabileceği belirtilmiştir. CNF-1 konak hücrelerin invazyonunda rol oynadığı belirtilmiştir.

UPEC suşlarında aerobaktin, enterobaktin ve yersiniabaktin gibi sideroforlar ile dış membran proteinleri bakteri hücresi içine demir taşınmasını sağlamakla virulans faktörü olarak rol oynarlar. UPEC suşları ayrıca spesifik reseptör moleküllerle hemin gibi konağın demir içeren bileşenlerinden demir elde edilebilmektedir.

Üropatojen spesifik protein (usp), son zamanlarda yapılan çalışmalarda üropatojen *E.coli* suşlarının virulansında önemi vurgulanan patojenite adalarında bulunan genlerde kodlanan bir virulans faktörü olarak tanımlanmıştır. Usp'nin endonükleaz gibi işlev gören bir bakteriosin olduğu düşünülmektedir.(198,200,201,202)

UPEC suşları, virulans faktörlerine ilişkin profilleri açısından hem kommensal suşlardan ve gastroenterit etkeni suşlardan farklıdır hem de klinik tablolara göre kendi aralarında farklılık gösterebilmektedirler.

II.2 İDRAR YOLU ENFEKSİYONU

II.2.1 Üriner Sistem Enfeksiyonlarının Fizyopatogenezi

Her iki böbrek, periton boşluğunun dışında karın arka duvarında yer alır. Yetişkin insanda her birinin ağırlığı 150 gramdır. Her böbreğin medial kısmında idrarın böbrekten boşaltıncaya kadar beklediği yer olan mesaneye taşıyan üreterlerin girip çıktığı çukur bölge bulunur. İnsanda her böbrek, idrar oluşturma yeteneğine sahip bir milyon kadar nefrondan oluşur. Böbrekler nefronları yenileyemezler. Bu nedenle, böbrek hasarı, hastalık veya normal yaşlanma ile böbreklerdeki nefron sayısı giderek azalır. Her nefronun iki ana bölümü vardır; kandan büyük miktarda sıvının filtre olduğu yere glomerül, filtre edilen sıvının idrara dönüştüğü yere ise tübül denir.

Glomerül, bowman kapsülü ile sarılmıştır. Glomerüller kapillerlerden filtre olan sıvı önce bowman kapsülü içerisine sonra böbrek korteksinde yer alan proksimal tübül içine akar. Proksimal tübül; distal tübül ve medüller toplayıcı kanal ile devam edip papillanın tepesi aracılığı ile böbrek pelvisine boşalır. Renal kaliksler ve üreterler ile idrar kesesine geçerken idrarın yapısında belirgin bir değişiklik olmaz.

Üreterler mesaneye trigon bölgesinden geçerek girerler. Detrüsor kasının normal tonusu üreterleri sıkıştırır ve miksiyon esnasında idrarın geriye kaçışını engeller. Bazı insanlarda mesane duvarında üreterin ilerlediği mesafe normalden azdır. Bunun sonucunda miksiyon sırasında bir miktar idrarın geriye kaçışı engellenemez. Bu duruma vezikoüreteral reflü denir.

Ağrı sinir lifleri açısından zengin olan üreterde taşa veya başka sebebe bağlı tıkanma olması durumunda böbreklerden idrar çıkışı da azalır. Buna reterorenal refleks denir.

Mesane detrüsör kasının kontraksiyonu idrar kesesinin boşaltılmasının ilk adımıdır. Mesane boynunda bulunan çok miktarda detrüsör kas internal sfinkter olarak adlandırılır. İnternal sfinkter kese boynuna ve posterior üretraya idrar geçişini engeller. Eksternal sfinkter sinir sisteminin istemli kontrolü altındadır. İstemli olarak, idrar çıkarılmasını önler.

Üriner sistem böbrekten anterior üretraya kadar olan bölgede sterildir. Anterior üretra florasında bulunabilecek mikroorganizmalar řu şekilde sayılabilir: Koagülaz (-) stafilokoklar (*S.saprophyticus* hariç), *viridans* ve *nonhemolitik streptokok*, *laktobasiller*, *difteroid*, patojen olmayan *neisseria* türü bakteriler, *propionobacterium* türleri, anaerobik gram negatif basil ve anaerop koklar, kommensal *mikobakterium* ve *mikoplazma* türleri, nadiren de mayalardır.(19,20) Flora elemanı olan bu mikroorganizmalar miksiyon esnasında idrara karışabilirler. Kendisi normalde steril olan idrar, infeksiyon geleişimine bağlı sterilitesini kaybettiği zaman kimyasal, mikroskobik ve mikrobiyolojik değişimler gösterir. Bu değişimler Tablo1'de özetlenmiştir. Yine üretrada flora elemanı olarak bulunan mikroorganizmalar miksiyon esnasında idrara karışabilirler. Bakteri üremesi için iyi bir ortam olan idrar rneği, oda ısısında bekletilmesi durumunda üretradan ve havadan bulaşan mikroorganizmaların üremesi için uygunluk gösterir.

Semptomatik riner sistem enfeksiyonları (SE) hekime en sık başvurulan bakteriyel hastalıklar arasındadır. ABD'de her yıl 2 milyondan çoğu sistit olan 7 milyonun üzerinde hastanın doktora başvurma nedenidir. Akut pyelonefrit nedeni ile 100.000 üzerinde hastaneye yatış tahmin edilmektedir. ABD'de toplumda yazılan reçetelerin %15'i SE'ları nedeniyledir. Tahmini maliyet 1 milyar doların üzerindedir.

Tablo 1: ÜSE’lu (Üriner Sistem Enfeksiyonu) hastalar ile sağlıklı bireylere ait idrar parametrelerinin karşılaştırılması

	İDRAR		
	Normal	Anormal	
		Sistit	Pyelonefrit
Parametre			
Biyokimya			
Spesifik dansite	1001- 1035		
Hacim(ortalama/24s)			
Çocuk (1 – 14 ya_)	500 – 1400 ml		
Yetişkin (<60 ya_)	600 – 1800 ml		
Yetişkin (>60 ya_)	250 – 2400 ml		
pH aralığı	4,7 – 8,0		
Protein	Negatif – eser	Negatif – eser	Artmış
Lökosit esteraz	Negatif	Pozitif	Pozitif
Nitrit	Negatif	Pozitif	Pozitif
Mikroskopi			
Beyaz küre			
Erkek	0 – 3 / hpf	Değişken	Yüksek/Çok yüksek
Kadın/çocuk	0 – 5 / hpf	Değişken	Yüksek/Çok yüksek
Alyuvar	0 – 2 / hpf	Değişken	Yüksek/Çok yüksek
Kristal	Değişken	Negatif	Negatif
Mukus	Değişken	Negatif	Negatif
Silendirler			
Hyalin	0 – 2 / lpf		
Granüler	0 – 1 / lpf		
Beyaz küre	Negatif	Pozitif	Pozitif
Mikroorganizmalar			
Bakteri	< 1 hpf	Değişken	Pozitif
Mantar	Negatif	Değişken	Değişken
Trichomonas sp	Negatif	Değişken	Değişken

hpf: büyük büyütme (× 1000), lpf: küçük büyütme (× 40)

Üriner sistem enfeksiyonlarında tanı ve tedavinin seçimi hastanın risk faktörlerine, önceki enfeksiyonlarına, önceki üreyen mikroorganizmalara, altta yatan hastalıklarına göre değişir. Gebelik, konjenital anomaliler, vezikoüreteral reflü, prostat hipertrofisi ya da böbrek taşı gibi obstrüksiyon yapan nedenler ve malignite enfeksiyon gelişmesini kolaylaştırır.

ÜSE'lerinin en sık insidansı 20- 40 yaşları arasında cinsel aktif kadınlarda saptanmıştır. Yeni doğan döneminde %1- 2 oranında görülen enfeksiyon erkek çocukların sünnet olmaması nedeni ile bu dönemde erkeklerde daha sıktır. Yaşamın sonraki yıllarında kızlarda daha sıktır. Yaşlılık döneminde kadınların yaklaşık %10'u, erkeklerin ise %20 kadarında bakteriüri saptanır. Bunun nedeni olarak erkeklerde prostat hipertrofisi, kadınlarda ise mesane prolapsusu ile uterus prolapsusu belirtilmiştir. Hastalarda bakteriüri prevalansı Tablo 2' de gösterilmiştir.

ÜSE' larının %95 kadarından tek bir bakteri sorumludur. En sık izole edilen bakteri üropatojen *E. Coli*'dir.(%70 -90) *Enterococcus*, *Klebsiella* türleri ile *Proteus* en sık diğer etkenlerdir. *S. saprophyticus* genç cinsel aktif kadınlarda etken olabilmektedir. Çocuklarda *Adenovirus tip-11* hemorajik sistite neden olmaktadır. *Laktobasiller*, *difteroidler*, anaerob bakteriler, *S. epidermidis* gibi distal üretra ve perine florasında yer alan bakterilerin üremesi kontaminasyon olarak değerlendirilir. Bununla birlikte immunsupresif hastalarda *S. epidermidis* de etken olabilir. Komplike ÜSE'nda gram negatif bakteriler, gram pozitifler ve dirençli mikroorganizmalar etkindir.

Hastane enfeksiyonlarında da *E. coli* en sık etken olmakla birlikte birden fazla etken neden olabilmektedir. Komplike enfeksiyonlarda ve hastane enfeksiyonlarında ayrıca *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* türleri, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, enterokoklar etken olabilir.(19,20)

Tablo 2: Hastalarda Bakteriüri Prevalansı

		Prevalans (%)
Kadın	Okul çağı	1
	Seksüel aktif kadın	2-4
	60 yaş üzeri	6-8
	80 yaş üzeri	20
	Bakım evinde kalan	30-50
Erkek	Küçük yaş	<1
	60 yaş üzeri	1-3
	80 yaş üzeri	>10
	Bakımevinde kalan	20-30

II.2.2 ÜSE’de Kullanılan Mikrobiyolojik Tanımlamalar

Kontaminasyon

Örneğin alındığı sırada idrara bakterinin bulaşması, bekletilen örnekte ve besiyerinde bu bakterilerin çoğalması olarak kabul edilir. İki veya daha fazla bakterinin bulaşması sözkonusudur. Uygun temizliğin örnek alınmadan önce yapılmadığı hastalarda özellikle kadınlarda laktobasil ve difteroidlerin kontaminasyonuna sıklıkla rastlanır. Yeni örnekle çalışılmasını gerektirir.

Kolonizasyon

Konağa zarar verici etkisi bulunmaksızın mikroorganizmanın konak dokuya tutunması, bu şekilde yaşayabilmesi veya çoğalabilmesidir.

İnfeksiyon

Çoğalan mikroorganizmanın konak dokuya zarar verir hale gelmesi ve hastalık oluşturmasıdır.

II.2.3 Epidemiyoloji

ÜSE 'lerinin prevalansı; infeksiyonun semptomatik veya asemptomatik olmasına, tanı yöntemlerine, uygulanan tanı kriterlerine, değerlendirilen hastaların yaş ve cinsiyetlerine, araştırılan toplumun özelliğine göre değişir. ÜSE' nin % 95' inden fazlasında etken tek bir bakteri türüdür. Tekrarlayıcı ÜSE ile tekrarlayıcı olmayan infeksiyonu olan hastalar arasında idrar florası açısından büyük farklılıklar bulunmaktadır. Akut infeksiyonun en sık etkeni *E.coli* bakterisidir. Rekürren infeksiyonlarda, özellikle üriner sistemde yapısal bozukluk bulunması halinde, rölatif olarak *proteus*, *pseudomonas*, *klebsiella*, *enterobakter* türleri ile *enterokok* ve *stafilokok* sıklığı artmıştır.(65) Yapısal anomali varlığında, idrardan çoklu organizma izolasyonu sıklığı da yüksektir. Bu hastalarda instrumentasyon oranının yüksek olması ve tekrarlayıcı antibiyotik kürlerine sık ihtiyaç duyulması, antibiyotiklere dirençli bakterilerin etken olarak görülme ihtimalini artırmıştır. *Proteus*, *pseudomonas*, *klebsiella*, *enterobakter* türleri ile *enterokok* ve *stafilokok* türleri hastanede yatan hastalardan daha sık izole edilirler.(65,66) *Corynebacterium urealyticum* önemli nazokomial patojen olarak tanımlanmıştır. Bu gram pozitif basil; üreyi parçalar, özellikle immünsuprese hastalar ve renal transplantasyon yapılmış bireylerde mesane duvarında mukozal infeksiyona ve üriner toplayıcı sistemde infeksiyona neden olur. *Corynebacterium urealyticum* antimikrobiyal ajan direncinin yüksek olmasıyla beraber sıklıkla vankomisine hassastır.

Anaerobik organizmalar idrar yolunda nadir infeksiyon etkenidirler. Spesifik klinik merkezlerde bu tip bakterilere idrarda rastlanabilmektedir. Mantarlar (özellikle *candida* türleri); kateterli, antibiyotik tedavisi alan hastalarda etken olarak gözlenmektedir. Bazı raporlara göre *koagülaz negatif stafilokok* türleri üriner sistem infeksiyonlarının sık karşılaşılan sebeplerindendir. Amerikada cinsel aktif kadınlarda gelişen akut sistitin yaklaşık %5 ila %15 inde *S. saprophyticus* infeksiyon sebebi olarak bulunmuştur. *Koagülaz pozitif stafilokok*, sıklıkla hemotojen yolu kullanarak böbreğe yerleşme eğilimindedir ve intrarenal veya perinefritik apseler oluşturur. Sıklıkla hücre duvarına etkili antibiyotiklerle tedavi görmüş pyelonefriti olan hastaların idrarlarında hücre duvarını kaybetmiş bakteriler gösterilmiştir, *Ureoplasma urealyticum* ve *Mycoplasma hominis* muhtemel ajanlardır. *Adenovirüs (tip 11)* erkek çocuklarda ve allojenik kemik iliği transplantı yapılan kişilerde hemorajik sistit etkeni olarak dikkat çekmektedir. Semptomlu veya semptomsuz kadın hasta idrarlarından *Gardnerella vaginalis* sıklıkla izole edilmektedir. Fakat bu patojenin rolü net açıklanamamıştır.(65,66,67)

ÜSE sıklığı, infantlarda %1 ila %2 kadardır. Hayatın ilk üç ayında erkek çocuklarda yaygın olup daha sonra sıklık kız cinsiyetinde artmaktadır. Erkek yeni doğanlarda ÜSE ile ilişkili bakteriüri sıklığıdır. Okul öncesi dönemde ÜSE kızlarda erkeklerden daha fazladır. Bu dönemde erkek çocuklarda ÜSE sıklıkla ciddi konjenital anomali ile ilişkilidir. Semptomatik ÜSE ile ilişkili renal hasarın büyük kısmının bu dönemde ortaya çıktığına inanılmaktadır.

Okul dönemi kız çocuklarında asemptomatik bakteriüri sıklığıdır. Yetişkin döneme ulaşıldığında, asemptomatik bakteriüri prevalansı kadın popülasyonunda artar. Genç, doğurmamış kadınlarda bakteriüri prevalansı %1-3 arasında değişmektedir. Sık cinsel ilişki, diyafram kullanımı, cinsel ilişki sonrası idrara çıkmama ve hikayesinde tekrarlayıcı infeksiyonların varlığı kadınlarda üriner infeksiyon için risk faktörleridir. İleri yaş kadınlarda bakteriüri; prolapsus sebebiyle mesanenin tam boşalamaması, fekal materyalin inkontinansla perineuma bulaşma olasılığında artışa bağlıdır.

Erkeklerde bakteriüri sıklığında artış prostat hastalıkları ve instrumentasyon ile ilişkilidir. Bakteriüri erkeklerde üriner sistem anatomik bozuklukları sıklığıdır. Her iki cins için nöromuskuler hastalık, artmış instrumentasyon ve mesane kateteri kullanımının üriner infeksiyon için sıklığı artırıcı faktörler arasında sayılması mümkündür. Bu grup hastalarda asemptomatik bakteriüri semptomatik üriner infeksiyona göre daha sıklığıdır .

Hospitalize hastalarda bakteriüri prevalansı ayaktan hastalara göre daha yüksektir. Çeşitli nedenlerle hastaneye kabul edilen hastaların yaklaşık %15 - 25'ine anatomik veya fizyolojik retansiyona bağlı akut veya kronik obstrüksiyonlar, idrar inkontinansı olan yatağa bağımlı hastaların bakımı, transüretal cerrahi öncesi üriner drenaj, postoperatif drenaj, paralizisi ve spinal kord yaralanmaları, mesane irrigasyonu, idrar miktarının ölçümü ve ürodinami, sitotoksik tedaviden dolayı kateter uygulanması bakteriüri insidansını artırmaktadır. Kateterin aseptik şartlarda takılmaması, uygulamanın travmatik yapılması, büyük çaplı kateterlerin takılması, meatal bakımın iyi yapılmaması, kapalı drenaj sisteminin olmaması, idrar torbası ve kateterin mesanenin üzerinde tutulması, refakatçilerin idrar torbasını boşaltması, kateter uygulamasından önce ellerin yıkanmaması, üriner sistemde taş veya tümör olması, böbreklerdeki fonksiyon bozukluğu katetere bağlı ÜSE gelişimini arttıran faktörlerdir .

Altta yatan çeşitli hastalıklar da üriner sistem infeksiyon sıklığının artışı ile ilişkilidir. Sistit ve pyelonefriti olan erkek hastalarda, çocuklarda, kronik kateterize hastalarda, rekürren infeksiyonu olan kadınlarda, ürolojik anormallik veya başka sistemik hastalığı olan kişilerde ÜSE'nin komplike olduğu düşünülür. Kronik potasyum yetersizliği, gut ve hipertansiyon; ÜSE ile ilişkilendirilmektedir.. Renal transplant hastalarının en az %50 sinde erken

postoperatif dönemde yaklaşık %40 bakteremi insidansı ile beraber, ÜSE gelişimi söz konusudur.

II.2.4 Etiyoloji

E.coli; toplumdan kazanılmış ve komplike olmamış ÜSE' unun en sık sebebidir. *Klebsiella* ve *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer üyeleri, *Staphylococcus saprophyticus* ve enterokoklar da sıklıkla toplum kökenli infeksiyonda rol alırlar. Komplike ÜSE' nda, özellikle rekürren infeksiyonlarda göreceli olarak *proteus*, *pseudomonas*, *klebsiella*, *enterobakter* türlerinin sıklığı artmıştır. Hastane kökenli infeksiyonlarda da *E.coli*, *klebsiella* ve *proteus* türleri, *stafilokok*, *Enterobacteriaceae* ailesine üye diğer bakteriler, *Pseudomonas aeruginosa*, *enterokoklar* ve *candida* türleri etken olarak karşımıza çıkar. Yabancı cismin üriner sisteme girişi, özellikle foley sondanın uzun süre sistemde kalması, infeksiyon için büyük risk taşır.(67,68)

ÜSE' nun daha az görülen etkenleri arasında *acinetobacter*, *alcaligenes* ve *citrobacter* türleri, *Gardnerella vaginalis*, *Aerococcus urinea*, β hemolitik streptokoklar sayılabilir. *Mikobakteri*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureoplasma urealyticum*, *Camphylobacter spp*, *Hemophilus influenzae*, *leptospira*, *Corynebacterium renale* gibi organizmalar nadiren idrardan izole edilirler. Tifoidal ateşin erken döneminde idrardan *Salmonella spp*. üretilmektedir.

II.2.5 Patogenez

Bakteriler, ÜSE' na asendan, hematojen ve lenfatik yol olmak üzere muhtemel üç yolu kullanarak neden olmaktadır. ÜSE 'lerin %99' u asendan yolla meydana gelmektedir. Pek çok üropatojen üriner yolla girer ve üretra yolu ile mesaneye ulaşır. Asendan yolda fekal kolonizasyon önemlidir. Gastrointestinal sistemden orijin alan mikroorganizmalar; gram negatif enterik basiller ve diğerleri, vaginal boşluk ve/veya periüretal alana yerleşirler. Mesaneye ulaşanlar, çoğalıp üreter ve böbreğe geçerler. Kadın üretrasının kısa ve anüsün hemen proksimaline yerleşmiş olmasından dolayı kadınlarda erkeklere oranla üriner sistem infeksiyonu daha sıktır. Cinsel aktivite kadın üretrasının bakterilerle kontaminasyon riskini artırır.

Hospitalizasyon sonrası hastaların derilerinde, gastrointestinal sisteminde, anterior üretranın da içinde bulunduğu müköz membranlarında gram negatif aerobik ve fakültatif anaerob basil kolonizasyonu ve kateterizasyon ile bakterilerin üretradan mesaneye geçişi

görülür. ÜSE patogeneğinde hematojen yolun payı %5'in altındadır. Genellikle bakteremi sonucu ortaya çıkar. Hematojen yol yenidoğan döneminde daha sık gözlenmektedir. Daha büyük çocuklarda hematojen yayılıma bağlı ÜSE ; *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Serratia spp* ve *M.tuberculosis* gibi virulan mikroorganizmalara bağlı sepsislerden sonra gelişir. *Candida* fungemisine bağlı olarak böbrekler infekte olabilir.(66,67,68)

ÜSE, en sık bakteremi sebeplerinden olmasına rağmen, gram negatif bakteriler ile gelişen bakteremiler böbreğin hematojen infeksiyonlarından nadiren sorumludurlar. *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis* veya *salmonella* ve *listeria* türlerinin üretildiği idrar, hematojen yolla kazanılan pyelonefriti işaret eder. ÜSE' nun yayılmasında nadiren lenfatik yolun aracı olduğu düşünülmektedir .

Konak-Mikroorganizma İlişkisi:

Başta kadınlar olmak üzere hastalarda vajinal ve/veya periüretal alanda gastrointestinal sisteme ait mikroorganizmalar kolonize olmuş durumdadır. Fakat her hastada ÜSE gelişmez. Kolonizasyon sonrası infeksiyonun gelişmesi konak ile mikroorganizma arasındaki dengeye bağlıdır. ÜSE 'nin gelişimini etkileyen faktörleri iki ana başlık altında sınıflandırılabilir.

Konağa ait faktörler:

i. Konak savunma mekanizmaları

Organizmayı elimine eden konak savunma mekanizmaları vardır. Üretral mukoza haricinde normal üriner yol bakteri kolonizasyonuna dirençlidir ve mesaneye ulaşmadan birçok mikroorganizma hızlıca temizlenir. Mesanenin hızlı ve etkin bir şekilde boşaltılması önemli bir savunma mekanizmasıdır. Etkeni içeren idrarın taze idrarla dilüe edilmesi ÜSE'nin sınırlandırılmasında önemlidir. İnfekte olan idrarın boşaltılması, bakterilerin reseptörlere bağlanma olasılığını da azaltmaktadır. Miksiyon sonrası mesanede kalan az miktardaki idrar, kolonizasyon için yeterli olmakla birlikte mesane mukozasının antibakteriyel özellikleri bu durumu engeller. İnfeksiyon eradike edilmezse nadir de olsa mukozadan derin tabakalara geçişi gösterebilir.

İdrar pH'sının düşüklüğü, ozmolalitenin düşük veya yüksek oluşu, yüksek üre konsantrasyonu, yüksek konsantrasyonda organik asitleri içermesi mikroorganizma çoğalmasını baskılar. Üroepitelyal hücre ile bakterinin teması çeşitli yollarla immün cevabı başlatır. Bakteriyel lipopolisakkarit konak hücrelerini aktive eder. TNF ve gama interferon gibi

sitokinlerin salınımı, kompleman sistemi aktivasyonu ve opsonin üretimi gerçekleşir. *E.coli*'nin sebep olduğu piyelonefrit olgularında antijenlere karşılık spesifik IgG ve IgM yapısında antikorlar gösterilmiştir. Antikorların asıl koruyucu etkileri parankimal bakteriyel infeksiyonlar üzerinedir.

Akut piyelonefritte jeneralize iltihabi cevap vardır. Akut piyelonefritte üropatojenik bakteri etkisiyle intrasellüler sitokinler IL-6 ve IL-8 artmıştır. Bunlardan IL-6 akut faz yanıtını başlatmakta, IL-8 ise lökosit kemotaksisine sebep olmaktadır. Böbreğin spesifik anatomik bölgesinde bulunan epitelyal hücrelerin sentezlediği bir çeşit glikoprotein olan Tamm-Horsfall protein; diğer ismiyle üromukoid, *E.coli*'nin Tip 1 fimbriyasına bağlanarak adheransı önleyici görev yapar. Küçük bir antimikrobiyal peptid grubu olan defensin; makrofaj, nötrofil ve üriner sistem hücreleri gibi konağa ait çeşitli hücreler tarafından üretilir ve bakteri hücrelerine tutunarak onun ölümüne neden olur. Prostatik salgılar, çinko içermektedir ve idrarda bakteri üremesini baskılar.

ii. Konağa ait predispozan faktörler

Birçok konak faktörü üriner sistem infeksiyonu gelişimine hassasiyeti arttırabilmektedir. Miksiyonu engelleyeci mekanik tıkanmalar (taş ve yapısal bozukluklar gibi) infeksiyon gelişiminde en önemli faktördür. Valfler, stenoz, bantlar, taş; çeşitli nedenlerden kaynaklanan ekstresek üretral kompresyon ve benign prostat hipertrofisi, ureter veya uretranın konjenital anomalileri obstrüksiyon sebebidir. Nefrokalsinoz, ürik asit nefropatisi, analjezik nefropatisi, polikistik böbrek hastalığı, hipokalemik nefropati, orak hücre hastalığına bağlı gelişen renal lezyonlar gibi durumlar intrarenal obstrüksiyona neden olabilmektedir.

Üreter ve mesane arasında idrarın geri kaçışını (reflü) önleyen kapak benzeri mekanizma vardır. Obstrüksiyon ve konjenital anomalilerle bu fonksiyon baskılanmaktadır. Konjenital anomaliye bağlı reflü, mesane distansiyonu veya sebebi bilinmeyen nedenler asenden yol vasıtasıyla üst ÜSE gelişme ihtimaline katkıda bulunmaktadır. Reflü, işeme sonrası mesanede infekte rezidüel idrarın varlığı aracılığıyla infeksiyona zemin hazırlar. Özellikle çocuklarda reflü; üst üriner sistem infeksiyonu ve akabinde gelişen kalıcı hasar oluşumunda önemli rol almaktadır.

Mekanik sebeplerden (mesane boynu obstrüksiyonu, üretral valvler, üretral daralmalar, prostatik hipertrofi veya nörolojik fonksiyon bozukluklarından (poliomyelit, tabes dorsalis, diabetik nöropati, spinal kord yaralanmaları) kaynaklanan sebeplerle mesanesini tam boşaltamayan hastalar sıkça üriner sistem infeksiyonuna yakalanmaktadır. Bu hastalarda lokal defans mekanizmaları, mesanenin aşırı distansiyonu ile baskılanır, instrumental girişimi

gerektirir. Yine, hamilelikteki hormonal etkiler ve reflü, üst üriner sistem infeksiyonu gelişimi riskini artırır.

iii. Mikroorganizmaya ait faktörler

Herhangi bir mikroorganizma ÜSE'na sebep olabilmekte ise de, infeksiyonların çoğundan *E.coli* sorumludur. *E.coli*'nin üropatojenik suşları, vajinal ve periüretal hücrelere kolonizasyonu güçlendiren, üroepitelyal hücrelere tutunmayı sağlayan, doku invazyonu yapabilen virülans faktörlerini bulundurma durumlarına göre fekal floradan ayrılırlar. Bu faktörler; adhezin, serum bakterisidal aktivite ve fagositoza karşı direnç, hemolizin üretimi ve yüksek miktarda K antijen varlığını içerir. Bunlar içinde adhezyon üropatojenik *E.coli*'nin en önemli özelliğidir.

Üropatojenik *E.coli* adhezyonlarının ana tipi fimbriyadır. P fimbriya ve Tip 1 fimbriya en önemli iki fimbriya tipidir. P fimbriya sıklıkla akut pyelonefrit gelişimi ile ilişkilidir. Bu fimbriya böbrekteki glikolipid reseptörlere bağlanır ve bu bağlanma mannoz tarafından inhibe edilemez. Tip1 fimbriya bulduran *E.coli* üriner yoldaki mannoz bulduran reseptörlere bağlanabilmektedir ve pyelonefritten ziyade sistite neden olmaktadır. Bu şuşların bağlanması mannoz varlığında inhibe olmaktadır. Tip 1 fimbriya bulduran *E. coli* suşlarının fagositlerce yakalanma ihtimali yüksek iken, P fimbriya bulduran *E.coli* suşları PNL'lerin P fimbriyaya spesifik reseptörleri olmaması nedeniyle fagositlerden kaçabilmektedirler.(197,198)

II.2.6 Üriner Sistem Enfeksiyon Semptomları

ÜSE, çocuklarda yaşa bağlı olarak farklı semptomlar oluşturma eğilimindedir. Neonatal dönemde ve 2 yaş altındaki çocuklarda semptomlar nonspesifiktir. Kusma ve ateş major klinik belirtilerdir. 5 yaşın üzerindeki çocukluk döneminden itibaren ÜSE semptomları lokalize semptomlar halini alır. Yetişkinlik döneminde ÜSE daha kolay tanınır. Alt ÜSE semptomları bakterinin üretra ve mesane mukozasında oluşturduğu irritasyona bağlı olarak sık ve ağrılı miksiyon, bulanık idrar yapma şeklindedir. Suprapubik hassasiyet ve ağrı zaman zaman şikayet oluşturur. İdrar büyük miktarlarda kan içerebilir veya miksiyon sonunda gelebilir. Alt üriner sistemde sınırlı kalmış infeksiyonda ateş oluşturma eğilimi yoktur.

Üst ÜSE'lerinde, alt üriner sisteme ait semptomlarla beraber ateş ve yan ağrısı da görülür. Çocuklarda olduğu gibi yetişkinlerde de pyelonefrit, farklı klinik görünüm sergileyebilir. Flank hassasiyeti yetişkinlerde sıkça karşılaşılan semptomdur ve obstrüktif hastalıklarda bu

semptomlar daha yoğun hissedilir. Böbrekten kaynaklanan ağrılar epigastriuma yakın alanlarda hissedilebilir, alt kadrana yayılabilir. Yaşlı hastalarda ÜSE asemptomatik seyredebilir. Semptomların olması sıklıkla tanısız değildir. Çünkü infeksiyonu olmayan yaşlı hastalarda da sık idrar yapma, ağrılı idrar, inkontinans gibi sorunlar sıkça yaşanır. Üst ÜSE semptomları yaşlılarda sıklıkla atipiktir, mental durum değişiklikleri ve abdominal ağrı duruma eşlik edebilir. Bazı araştırmacıların sonuçları yaşlı hastalarda pyelonefrite bağlı bakteremi sıklığının, genç hastalara oranla daha fazla olduğunu göstermektedir. Katetere bağlı gelişen ÜSE’de alt üriner sistem infeksiyon semptomları (dizüri, pollaküri) bulunmaz, fakat ateş ve flank ağrısı görülebilir. Kateter varlığında üriner sistem infeksiyonuna bağlı bakteremi, üriner semptomlar olmaksızın ortaya çıkabilir.

II.2.7 Klinik

İdrar yolu enfeksiyonlarının sınıflamasında üst ve alt üriner sistem enfeksiyonları, semptomatik ve asemptomatik üriner enfeksiyonlar gibi çeşitli tanımlar yer almıştır. Klinikte asemptomatik bakteriüriden, semptomatik komplike ve ya komplike olmayan pyelonefrite, tekrarlayan enfeksiyonlara kadar değişen birçok tablo şeklinde görülebilirler.

Semptomatik idrar yolu enfeksiyonları: Komplike olmayan sistit, kadınlarda komplike olmayan pyelonefrit, kadın ve erkeklerde komplike idrar yolu enfeksiyonları bu gruba girer.

Komplike olmayan sistit: En sık rastlanan formunu oluşturur, hastada dizüri, pollaküri, idrara sıkışma hissi gibi semptomlar bulunur. Fizik muayenede suprapubik hassasiyet saptanır. Ateş saptanmaz, ancak hastaların %30 kadarında böbrek tutulumu da olabilir. Yaşlılarda üriner sistem enfeksiyonu asemptomatik seyredebilir.

Komplike olmayan pyelonefrite titreme ile yükselen ateş, bel ağrısı, bögür ağrısı, bulantı, kusma şikayetlerine dizüri, pollaküri de eklenebilir ya da son iki bulgunun saptanması koşul değildir. Fizik muayenede kostovertebral açı hassasiyeti bulunur. Hastada lökositöz, sedimentasyon ve CRP yüksekliği saptanır.

Komplike idrar yolu enfeksiyonu: Altta yatan ve enfeksiyonu kolaylaştıran ya da tekrarlamasına neden olan yapısal, fonksiyonel ya da anatomik bozukluklar; stentler, taşlar, üriner sisteme uygulanan girişimler, tümörler, nörolojik bozukluklar nedenleri ile gelişir.

Komplike eden durumlar böbrek fonksiyon bozuklukları, pre, intra ve post renal nefropatiler, (akut ve kronik böbrek yetmezlikleri, kalp yetmezliği gibi) immunitiyi etkileyen

eşlik eden diabetes mellitus, kanser, AIDS, karaciğer yetersizliği gibi hastalıklar olarak gösterilmiştir. Erkeklerde bir kez bile pyelonefrit geçirilse komplike olarak düşünölmeli ve kolaylaştırıcı faktörler araştırılmalıdır.

Asemptomatik bakteriüri : Şikayeti olmayan hastada birbirini takip eden ve en az 24 saat ara ile alınan 2 idrar kültüründe 10^5 koloni/mL aynı bakterinin üremesidir. Kadınlarda genç yaşlarda oran %3 (68,69) , erkeklerde % 0.1 gibi düşük iken; 65 yaş üzerinde hastalarda %10 ve üzerindeki oranlara çıkar. Komplike olmayan bakteriüride asemptomatik enfeksiyonların tedavi edilmesi yerini daha virölan bakterilere bırakabileceğinden risk grubu dışında tedavi önerilmez.

Asemptomatik bakteriüri gebelerde, ürolojik girişim yapılacak hastada, böbrek transplant hastalarında tedavi edilmelidir. Diabeti olan hastalarda asemptomatik bakteriürinin tedavisinde netlik olmamakla birlikte tedavi etme yönünde eğilim mevcuttur.

Asemptomatik kandidüride risk faktörleri düzeltilmelidir. Antibiyotik kullanımı var ise antibiyotiğın kesilmesi, hasta diabetik ise diabetin kontrol altına alınması, kateter mevcutsa çıkarılması önerilir. Hasta nötropenikse, invazif girişim yapılacaksa flukonazol kullanımı önerilir.

Tablo 3: Alt üriner sistem enfeksiyonlu hastaya ilişkin risk faktörleri

Erişkin kadın hasta	Erişkin erkek hasta
<ul style="list-style-type: none">• Geçirilmiş üriner sistem enfeksiyonu• Doğum sayısı• İnvazif uygulamalar• Diabet• Cinsel davranış• Diyafram-spermisid kullanımı	<ul style="list-style-type: none">• AIDS• Homoseksüellik• Sünet olmama
Yaşlı kadın hasta	Yaşlı erkek hasta
<ul style="list-style-type: none">• Mesanenin boşalmaması• Östrojenin azalması• Üriner sistem anomalisi• Mesane divertikülü• Rektosel• Üreterosel• Parkinson, Alzheimer	<ul style="list-style-type: none">• Darlık• İnvazif girişim• Prostat hipertrofisi• Taş• Parkinson• SVO

Tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları

Relaps ve reenfeksiyon olarak ayrılabilir. Relaps idrar yolu enfeksiyonu geçiren kişide ilk 2 hafta içerisinde aynı bakterinin aynı suşu ile enfeksiyon gelişmesidir. Re-enfeksiyon ise ilk 6 ay içerisinde farklı bir bakteri ile ya da aynı bakterinin farklı bir suşu ile enfeksiyon görülmesidir.

Tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonlarında risk faktörleri son 1 ay içerisinde cinsel temas sıklığı ya da yeni bir partner, spermisidlerin son bir yıl içinde kullanımı, ilk ÜSE geçirme yaşının 15 yaş altında olması, annede ÜSE hikayesinin olması olarak bildirilmiştir. Menapoz sonrası dönemde kadınlarda östrojen eksikliği, laktobasillerin vajen florasından kaybına neden olmakta *E. coli* kolonizasyonu kolaylaşmaktadır. Tekrarlayan sistitlerde idrar kültürü önerilir.(66)

II.2.8 Tanı

Üriner sistem enfeksiyonu tanısında idrar incelemesi önemlidir. Normalde idrar sterildir. İdrarda bakteri bulunması bakteriüri, lökosit varlığı piyüri olarak adlandırılır. İdrar örneğinin uygun bir şekilde alınmasına dikkat edilmelidir. Özellikle kadınlarda su ile temizlik yapılmalı, silinme önden arkaya doğru yapılmalıdır. İlk idrar dışarı atıldıktan sonra orta akım idrarı örneği alınır. İdrar santrifüj edilerek ya da edilmeden incelenebilir.

İdrar yolu enfeksiyonu bulguları olan hastada santrifüj edilmemiş idrarın mikroskopun 40'lık büyütmesinde lam lamel arası incelemede her sahada 1 ve üzerinde lökosit görülmesi ya da kamara ile sayımda milimetreküpte 10 lökosit saptanması idrar yolu enfeksiyonu lehine değerlendirilir. 2000 devirde 5 dakika süre ile santrifüj edilen idrarın 40'lık büyütme ile incelemesinde her sahada 5-10 lökosit saptanması da bir diğer tanı yöntemidir. Lökosit esteraz pozitifliği de tanıda yardımcıdır.

Santrifüj edilmemiş idrarın gram boyalı preparatında tek bir bakteri görülmesi kültürde 10^5 koloni mikroorganizma üreyeceğine işaret eder. Sistitten sorumlu olan mikroorganizmaların spektrumu sınırlı olduğundan kadınlarda akut basit sistitte idrar kültürü yapmaya gerek yoktur.

Üst üriner sistem enfeksiyonunun kesin tanısı idrar kültüründe etken mikroorganizmanın üremesi ile olur. İdrar örneği orta akım idrarı, suprapubik aspirasyon ya da üriner kateter ile alınır. Örnek alırken sabah ilk idrarının alınmasına dikkat edilmelidir çünkü:

- bakteri sayısı en yüksektir.
- fazla sıvı almak bakteri sayısını azaltabilir.
- çok fazla idrara çıkmak özellikle çok küçük çocuklarda bakteri sayısını azaltabilir.

Miksiyondan sonra mümkünse 4 saat beklemiş idrar örneği almaya dikkat edilmelidir. Örnek vermeden önce dilüe olmaya neden olacağı için bol sıvı içilmemelidir. Kadında önce vajina girişi su ve ya SF emdirilmiş gazlı bez ile temizlenir; antiseptikler düşük bakteri sayısının elde edilmesine yol açabilir.

Temiz idrar örneği alınamayan durumlarda küçük suprapubik idrar alınabilir; uretral kateterizasyon yapılabilir. Suprapubik aspirasyon altın standarttır, çünkü kontaminasyon

yoktur, ancak rutin tanıda yeri yoktur, invaziv bir işlemdir, ultrason eşliğinde yapılması gerekir.

Kültürde iki ve daha fazla mikroorganizmanın üremesi kontaminasyon lehine yorumlanabilir. Enfeksiyon bulguları olan bir hastanın idrar kültüründe saf koloni olarak 10^4 koloni ve üzerinde üreme olması ÜSE lehine yorumlanır. Semptomu olan ve piyürisi saptanan hastada daha az sayıda (1000 koloni altında) bakteri üremesi ya da hiç üreme olmaması steril pyüri olarak adlandırılır. Bu durumda idrar yolu tüberkülozu, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* üretritleri ve herpes vaginitleri gibi diğer bazı etkenler düşünülmelidir.

Akut pyelonefrit gelişen ve hastaneye yatan hastalarda kan kültürü de alınmalıdır. Pyelonefriti olan hastalarda lökositoz, sedimantasyon ve CRP yüksekliği ile idrarda lökosit silendiri saptanmaktadır.

Görüntüleme yöntemleri komplike ÜSE düşünülen, yapısal anomaliden şüphe edilen durumlarda ve tekrarlayan enfeksiyonlarda önerilir. Direkt grafide üriner sistem taşları gösterilebilir. Apse ve diğer patolojilerin saptanması için USG veya batın CT çekilebilir.

II.2.9 Tedavi

ÜSE'lerinde tedavinin amaçları; tedaviye etkin ve hızlı yanıt oluşması, tedavi edilen hastalarda nüksün önlenmesi ile mikroorganizmalarda antimikrobiallere karşı hızla artan direncin önlenmesidir. Tedavi seçiminde üriner sistem enfeksiyonunun tipinin belirlenmesi önemlidir. Tedavi seçimi başlangıçta empiriktir. Hastada komplike eden faktörlerin varlığı, antimikrobiyal direnç paterni de göz önüne alınarak tedavi planlanmalıdır. Seçilecek antibiyotiğin idrarda aktif olması, renal parankim, mesanede yeterli idrar konsantrasyonuna ulaşması ve konsantrasyonun uzun sürmesi, olası etken mikroorganizmalara etkili olması, üropatojenlerde direncin prevalansı, bakterisid etkili olma, hasta uyumu, antibiyotiğin dışkı ve vajen florasına etkileri, olası yan etkileri ve maliyet göz önüne alınmalıdır. Antibiyotikler barsak ve perine florasını bozmamalıdır. ÜSE tedavisinde bir diğer önemli nokta yaşlılarda bakteriyel eradikasyon oranının gençlerden daha düşük bulunmasıdır.

İdrar yolu enfeksiyonlarında en çok kullanılan ilaçlar TM-SMZ ile kinolonlardır. Üçüncü kuşak sefalosporinlerden seftriakson, sefotaksim, ayrıca aminoglikozidlerden gentamisin parenteral yolla, sefiksim de oral yolla tedavide önerilir. Ancak betalaktamların dışkı ve vajinal flora da yan etkileri olması kullanımlarını sınırlandırabilir. Tedavi verilirken antimikrobiallere karşı ülke, bölge direncinin bilinmesi önemlidir. Ülkemizde 1999 yılında

yapılan çok merkezli çalışmada *E.coli* suşlarında direnç TM-SMZ'a %22 oranında, siprofloksasine %7 oranlarında belirlenmiştir. Diğer çalışmalarda TM-SMZ direncini %40-50 oranlarında bulan çalışmalar da vardır.(70,71)

Akut komplike olmayan bakteriyel sistit

Akut sistitli kadınlarda idrar kültürü yapılmadan kısa süreli ampirik antibiyotik tedavisi verilir. TM-SMZ ile 3 günlük tedavi akut sistit olgularında standart tedavi olarak bildirilmiştir. TM-SMZ, ofloksasin, tek başına trimetoprim etkileri benzer bulunmuştur. Norfloksasin, siprofloksasin, gibi diğer kinolonlar muhtemelen benzer etkiye sahiptir. Nitrofurantoin benzer etkiyi göstermekle birlikte eradikasyonda diğer antimikrobiallere oranla düşük etkiye sahiptir. 3 günlük tedavide eradikasyonda etkisi TM-SMZ den düşük bulunmuştur. Bir çalışmada nitrofurantoinin 7 güne kadar devam edilmesi önerilmiştir. İdrar konsantrasyonu yüksektir, ancak yüksek serum konsantrasyonuna ulaşmadığından pyelonefrit tedavisinde önerilmez.

Fosfomisin de akut komplike olmayan sistit tedavisinde onaylanmıştır. Ancak tek doz fosfomisinle yan etki oranı yüksek bulunmuştur. Ayrıca tek doz 3 g tedavi bakteriyi eradike etmede ofloksasinden daha az etkili bulunmuştur.

Toplumda TMP-SMZ direncinin %20 üzerinde olduğu durumlarda bu antibiyotığın ampirik tedavide seçilmemesi önerilir. Ayrıca 3 günlük tedavide beta laktamlar diğer tedavilerden daha az etkili bildirilmiştir.(70,71)

Menapoz öncesi dönemde cinsel aktif kadında sistit varlığında tedavi süresi 3 gündür. Gebe ve yaşlı hastada, diyabetik hastada, diyafram kullanıyor ise, ÜSE için yakın zamanda antibiyotik kullanımında, genitoüriner sistemde fonksiyonel ya da anatomik anomali durumunda, ürolojik girişim yapılması durumunda komplike sistit olarak kabul edilmelidir. Bu durumda antibiyoterapinin 7 gün sürmesi planlanmalıdır. Gebelerde diğer ilaçların yan etkileri nedeni ile betalaktam grubu antibiyotik seçilmelidir. Tablo 4'te komplike olmayan sistitli hastada tedavi önerileri yer almıştır.

Akut pyelonefrit

Genç, sağlıklı, gebe olmayan kadın hastada akut pyelonefrit tablosunda 14 gün antimikrobiyal tedavi uygundur, hafif veya orta şiddetli olguda güçlü anti-mikrobiyaller ile 7 güne kadar tedavi yeterli olabilir. Hafif şiddetli olguda oral kinolonla veya duyarlı olduğu biliniyor ise TM-SMZ ile tedavi uygulanabilir Eğer gram pozitifler etyolojide düşünülüyor ise amoksisilin ya da amoksisilin/klavulanat tek başına kullanılabilir. Beta laktamlar ve nitrofurantoinle yapılan tedavide daha sıklıkla 7 gün süre önerilir.

Şiddetli enfeksiyonu olan vakalar hastaneye yatırılmalı ve şiddetli veya komplike pyelonefriti olanlarda parenteral tedavi başlanmalıdır. Hastanın semptomlarının düzelmesi, ateşin düşmesi durumunda 48- 72 saat sonra oral tedaviye geçilir. Tedavi komplike olmayanlarda 10- 14 gün, komplike olanlarda 14 gün önerilir

Tablo 4: Alt üriner sistem enfeksiyonu üç günlük tedavide önerilen oral antimikrobiyaller	
Antibiyotik	Önerilen doz /gün
Trimetoprim-sülfametaksazol	2x 160/800mg (2x 1 fort tablet)
Trimetoprim	300mg
Nitrofurantoin	3 x50mg
Nalidiksik asid	3x500mg
Norfoksasin	2x400mg
Siprofloksasin	2x250mg
Sefalekssin	3x250mg
Sefradin	3x250mg
Amoksisilin	3x250mg
Amoksisilin/klavulanat	2x 500/125mg
Fosfomisin (tek doz)	400mg

Tedavide parenteral kinolon,veya aminoglikozid ampisilinle birlikte ya da değil, veya 3. kuşak sefalosporin önerilir. Eğer ön planda gram pozitif koklar düşünülür ise ampisilin/sulbaktam tek başına ya da aminoglikozidle kombine önerilir .

Pyelonefriti olan hastada ampirik başlanan tedavide idrar kültür sonuçlarına göre uygun düzenleme yapılabilir. Tedavi seçiminde üropatojenlerin toplumdaki antibiyotik duyarlılığı hakkında bilgi sahibi olunmalıdır. ÜSE’nda özellikle beta laktam ve trimetoprim-sulfametaksazole karşı bilinen direncin yanısıra kinolonlara da giderek artan direnç gözlenmektedir. Kinolonlar tedavide ilk seçenek olmakla birlikte kinolon direnci yönünden hastalar yakından izlenmelidir. Arslan ve ark.’nın çok merkezli ÜSE çalışmasında komplike olmayan olgularda kinolon direnci %17 olarak bildirilmiştir. ÜSE tedavisinde kullanılan kinolonlar en sık siprofloksasin, diğerleri ofloksasin, norfloksasin (oral yolla ve komplike olmayan ÜSE tedavisinde), enoksasin, levofloksasindir. Ayrıca ampisilinle karşılaştırmada ampisilin direnci daha yüksek ve nüks oranları ampisilinle daha fazladır. Bunun bir nedeni beta laktamlar hızla atılır ve idrarda önemli konsantrasyonda oldukları süre kısadır. İlave olarak vajen ve perianal kolonik floradan gram negatif çomakları temizlemede relatif olarak etkin değildir ve bu nedenle relaps sıktır. ÜSE tedavisinde bir diğer önemli nokta yaşlılarda bakteriyel eradikasyon oranı gençlerden düşük bulunmuştur.

Tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu

Tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde yılda 3 ve üzerinde enfeksiyonu olan hastalarda sürekli her gün ya da haftada 3 kez en az 6 ay süre düşük doz antibiyotik profilaksisi ile önerilir. Bu amaçla TM-SMZ, trimetoprim, nitrofurantoin, norfloksasin kullanımı önerilmektedir. Günde tek doz 50-100mg nitrofurantoin veya TM-SMZ 150-200mg yatmadan önce önerilebilir.(66) Düşük doz profilaksi sık tekrarlayan, tanımlanmış, tedavi komplikasyonu olmayan hastalarda yapılır. Kadın hastalarda şikayetlerinin cinsel temasla ilgisi sorgulanmalı, ilişkisi var ise tek doz postkoital profilaksi önerilmelidir. Yılda 2 kez ve altında enfeksiyonu olan hastalarda yukarıda bahsedilen antibiyotiklerin birisini 3 gün süre ile kullanması önerilir. Akut pyelonefrit ve gebelikte pyelonefritle ilişkili tedavi önerileri Tablo 5’te yer almıştır.

Tablo 5: Akut Pyelonefritte Ampirik Tedavi Önerileri

KLİNİK	TEDAVİ	ANTİBİYOTİK	DOZ
Komplike olmayan Pyelonefit, hafif Şiddetli, kusma yok	Hastane dışında 14 gün oral tedavi	TM-SMZ Kinolonlar Siprofloksasin Norfloksasin Ofloksasin Sefiksim	2X160/800 mg/gün 2X160/800 mg/gün 2x500 mg/gün 2x400 mg/gün 2x200-300 mg/gün 400 mg/gün
Komplike olmayan pyelonefrit, şiddetli hastalık veya ürosepsis şüphesi	Hastanede izlenir 14 gün süreli başlangıçta parenteral, hasta klinik iyileşme gösterirse oral	PE TM-SMZ PE Kinolon Siprofloksasin 3. K. Sefalosporin Seftriakson Gentamisin	2X160/800 mg/gün 2X160/800 mg/gün 2x200 mg/gün 2x200 mg/gün 1-2 g/gün İV 5 mg/kg/gün
Komplike pyelonefrit Hafif hastalık, bulan-tı kusma yok	Hastane dışında 14 gün oral tedavi	Kinolon Siprofloksasin	2x500 mg/gün 2x500 mg/gün
Komplike pyelonefrit Şiddetli hastalık ya da ürosepsis	Hastanede izlenir başlangıçta tedavi parenteral, 14 gün	Kinolon 3.K.Sefalosporin Gentamisin Piperasilin-TZP Aztreonam	2x200 mg/gün İV 1-2 g/gün İV 5 mg/kg/gün 6 saatte bir 3.75 mg 8-12 saatte bir 1g. İV
Gebe hasta, hafif Şiddetli hastalık	Hastane dışında 14 gün oral tedavi	Sefiksim	400 mg/gün
Gebe hasta, orta Şiddetli hastalık	Hastanede 14 gün tedavi	Seftriakson	1-2 g/gün İV

PE: Parenteral, 3.K. Sefalosporin: 3. Kuşak Sefalosporin

II.2.10 Özel grupta üriner sistem enfeksiyonları

Gebelerde üriner sistem enfeksiyonları

Gebelik döneminde üriner sistem enfeksiyonların tanısı ve tedavisi önemlidir. Düşük doğum ağırlıklı bebek ve erken doğuma yol açabilmektedir. Gebelerde hormonal etkiler dolayısı ile büyüyen uterusun mesaneye basısından dolayı ÜSE gelişme riskini artırır. Üreterlerin peristaltizmi azalır, mesane kapasitesi değişir, bakteriyel kolonizasyon kolaylaşır. Asemptomatik enfeksiyonu olan gebelerin yaklaşık %25'inde semptomatik ÜSE ortaya çıkar. Doğum sayısının fazlalığı, diabet mellitus, ileri yaşta gebelik, önceki ÜSE'ları, anatomik ve fonksiyonel bozukluklar riski arttırır. Etken mikroorganizmalar normal konaktaki enfeksiyonla benzerdir. E. coli en sık etkendir, diğer gram negatif bakteriler ve enterokoklar da etkenler arasındadır. Gebelerde önemli bir bakteri grubu B grubu streptokoklardır.

Gebelik döneminde asemptomatik bakteriürinin saptanması ve tedavisi önemlidir. İdrar kültürü gebelerde ilk başvuru sırasında mutlaka yapılmalı, daha sonraki takiplerinde ve üçüncü trimestirde tekrarlanmalıdır. Gebelerde tedavide ilaç seçimi bebeğin de etkilenmesi nedeni ile önemlidir. Amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asid, sefalosporinler güvenle kullanılabilir iken; aminoglikozidler işitme siniri üzerine etkisi, kinolonlar kıkırdak gelişimine etkileri nedenleri ile tüm gebelik süresince, TM-SMZ ise nöral tüp gelişimini engelleyebileceği için ilk trimestirde ve kern ikterus riski nedenleri ile üçüncü trimestirde kullanılmamalıdır. Nitrofurantoin yeni doğanlarda hemoliz ve G6P-dehidrogenaz eksikliğine neden olur.

Tedavi süresi sistitte ve asemptomatik bakteriüride 7 gün iken, akut pyelonefritte 10-14 gün kadardır. Bakteremi varlığında tedavi parenteral önerilir, hafif şiddetli enfeksiyonda oral tedavi önerilecektir. Tedavi sonrası eradikasyonu göstermek için 1-2 hafta içerisinde idrar kültürü alınmalıdır.

Nötropenik hastalarda üriner sistem enfeksiyonları

Nötropenik hastalarda ÜSE insidansı kateter uygulaması gibi invazif girişimler nedeni ile artar. Üstelik bu hastalarda dizüri gibi tipik semptomlar ve piyüri görülmeyebilir. Nötropenik hastada asemptomatik ve semptomatik tüm ÜSE'ları tedavi edilmelidir.

Renal transplant alıcılarında üriner sistem enfeksiyonları

Transplant hastalarında ortaya çıkan bakteremilerin önemli bölümünü ÜSE'leri oluşturur. Hastalarda ÜSE belirti ve bulgularına rastlanır. Enfeksiyonun ortaya çıkış zamanı önemlidir. Erken dönemde kolaylaştırıcı faktörler kateter uygulaması, kateterin kalış süresi ve immunsupresif tedavidir. İlk 3 ayda ortaya çıkan ÜSE'nde tedavi süresi; bakteremi ile seyretmesi, pyelonefrit gelişmesi, relaps oranının yüksekliği gibi nedenlerden dolayı 6 haftaya kadar uzatılmalıdır. Sonraki enfeksiyonlarda ise 2 hafta tedavi süresi yeterlidir. Relapsa neden olan durumlar mesane işlev bozukluğu, taş, striktür ve anastomoz yerinde gelişen sorunlar olabilir.

Renal transplant hastalarında önemli bir etken de mantarlardır. *Candida* enfeksiyonları genellikle veziköüretal alanda gelişir. Kandidüriler asemptomatik olsa bile tedavi edilmelidir. Ancak diğer bakteriyel etkenlerin neden olduğu asemptomatik enfeksiyonlarda invazif girişimin yapılmadığı durumlarda tedavi önerilmemiştir.

Transplantasyon sonrası 1 yıl süreli TM-SMZ kullanımının maliyet etkin olduğu bildirilmiştir. Sık ÜSE geçiren, yüksek doz kortikosteroid, siklofosfamid tedavisi alan, ya da diyabetik hasta gibi yüksek riskli hastalarda süresiz profilaksi uygulanması önerilmiştir.

II.2.11 Üriner Sistem Enfeksiyonlarından Korunma

- Asemptomatik bakteriüride belirlenmiş risk grubu dışında tedavi yapılmaması,
- Komplike olmayan ÜSE'nde uygun antibiyotikle kısa süreli tedavi,
- Komplike olmayan tekrarlayan ÜSE'nde düşük doz profilaksi ve yeni aşların geliştirilmesi.

Bağışıklama için 2 farklı ajan vardır. Uro-Vaxom® oral yolla ve Strovac® i.m olarak mevcuttur. Her 2 ajan da komplike olmayan tekrarlayan ÜSE'leri için kullanılır. Uro-Vaxom® üropatojenik *E. coli* suşu için koruyuculuk sağlar. Plasebo ile karşılaştırmada üstünlüğü saptanmakla birlikte antibiyotiklerle karşılaştırmalı çalışma yoktur.

Strovac® üropatojenik *E.coli*, *P.mirabilis*, *M.morganii*, *K.pneumoniae* ve *E.faecalis*' den elde edilen tam hücre bakteriyel ekstrattır. Plasebo ile karşılaştırmada etkili bulunmakla birlikte daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Sonuç olarak, ÜSE'lerinin kısa sürede tanımlanması, uygun antimikrobiklerle yeterli süre ve dozda tedavi başlanması, üropatojenlere karşı direncin sürekli izlenmesi önemlidir.

Risk gruplarındaki hastanın yakından izlenmesi, hastaneye yatış kriterlerinin belirlenmesi, nükslerin önlenmesi esastır.

II.3 ESBL

Gram negatif bakterilerde B-laktam antibiyotiklere dirence yol açan en önemli mekanizma B-laktamaz enzimleridir. 1980'lerden itibaren bir çok yeni B-laktam antibiyotiğin kullanıma girmesi ile eş zamanlı olarak B-laktamazların sayı ve çeşidinde ani bir artış gözlenmiştir. Sefalosporinlere direnç önce *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da induklenebilen kromozomal AmpC (grup C veya grup I olarak da tanımlanmaktadır) B-laktamazların aşırı sentezi ile ortaya çıkmış, daha sonra induklenebilen AmpC içermeyen *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* ve *Proteus mirabilis* gibi mikroorganizmalarda genişlemiş spektrumlu B-laktamazlar (ESBL) tanımlanmıştır. B-laktamaz inhibitörlü kombinasyonların klinik kullanıma girmesinden sonra plazmid kontrolünde AmpC B-laktamazları sentezleyen mikroorganizmalar gözlenmeye başlanmıştır.

ESBL'ler

ESBL'ler sefuroksim, sefotaksim, seftriakson, seftizoksim, seftazidim, sefpirom ve sefepim gibi oksimino sefalosporinleri hidroliz edebilen, aktif bölgelerinde serin bulunan ve genellikle klavulanik asit, sulbaktam veya tazobaktam gibi B-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olan B-laktamazlardır. Karbapenemler ve sefamisinler bunlara dayanıklıdır. Bu enzimler 1-2 amino asit değişikliği ile dar spektrumlu B-laktamazlardan köken almıştır. ESBL'lerin substrat özgüllükleri farklı olabilmektedir. Örneğin TEM-3, TEM-4, SHV-4 ve SHV-5 gibi bazı enzimler sefotaksim ve seftazidimi aynı hızda hidroliz etmekte, bazı B-laktamazlar ise seftazidimi diğer sefalosporinlere oranla daha hızlı hidroliz etmektedir.

ESBL üreten bakteriler her zaman aminopenisilinlere (ampisilin veya amoksisilin), karboksipenisilinlere (karbenisilin veya tikarsilin), ve üreidopenisilinlere (piperasilin, mezlosillin) dirençlidir. TEM-52 ve TEM-88 gibi bir iki enzim dışında ESBL'ler sefamisinlere (sefoksitin ve sefotetan) karşı aktivite göstermemektedir. ESBL üreten mikroorganizmalar çoğu kez aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi diğer gruptaki antibiyotiklere de dirençlidir.(48,50)

ESBL Tipleri

Klasik olarak tanımlanan ESBL'lerin büyük çoğunluğu TEM, SHV veya OXA enzimlerinden köken almıştır. Günümüzde TEM türü B-laktamazların sayısı 140'ı, SHV türü B-laktamazlarınki 70'i geçmiştir. Bu üç enzimin türevleri dışında son yıllarda bunlardan köken almayan (CTXM, PER, VEB vs) genişlemiş spektrumlu enzimlerde de büyük bir artış olmuştur.

TEM Türevleri

TEM grubu B-laktamazlar *E.coli* ve *K.pneumoniae* başta olmak üzere *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, ve *Salmonella spp.* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde sık bulunmaktadır. *P.aeruginosa*'da da bildirilmiştir, ancak daha nadirdir, bunun nedenlerinden biri, *P.aeruginosa*'da geniş spektrumlu B-laktamazlara direnç oluşturan başka direnç mekanizmalarının bulunması olabilir.(101,108,121,122)

İnhibitörlere Dirençli β -Laktamazlar

B-laktamaz inhibitör kombinasyonları klinikte kullanılmaya başlandıktan sonra bu antibiyotiklere karşı dirençli *E.coli*'ler bildirilmeye başlanmıştır. Bu enzimlerin TEM B-laktamazlarından köken alan B-laktamaz inhibitörlerine dirençli varyantların (IRT) olduğu belirlenmiştir. TEM-50 ve TEM-68 gibi nadir örnekler dışında IRT'ler üçüncü kuşak sefalosporinleri hidroliz etmemektedir, buna karşın TEM veya SHV türü enzimlerden köken aldıkları için ESBL'ler ile birlikte ele alınmaktadırlar. Bu enzimler önceleri IRT (inhibitör resistant TEM) olarak isimlendirilmiş, ancak daha sonra köken aldıkları TEM yada SHV 'de sıralamaya girmişlerdir. Örneğin IRT-1, TEM-31, IRT-2, TEM-44, IRT-3, TEM-32, IRT-14, TEM-45 olarak yeniden numaralanmıştır.(101,108) Günümüzde inhibitörlere dirençli enzimlerin sayısı 22 civarındadır. IRT'ler en sık olarak *E.coli*'de bulunmakla birlikte *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *P.mirabilis* ve *Citrobacter freundii*'de de bildirilmektedir. İnhibitörlere dirençli TEM türevleri klavulanik asit ve sulbaktam ve bunların klinik kullanımda olan kombinasyonlarına dirençli, tazobaktam ve piperasilin/tazobaktam kombinasyonuna duyarlıdırlar.

SHV Türevleri

SHV grubu enzimlerin köken aldığı SHV-1 enzimi en sık *K.pneumoniae*'de bulunmaktadır ve sıklıkla kromozomal bir enzimdir. Ampisilin, tikarsilin ve piperasiline direnç oluşturmaktadır; oksiiiminocefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur. SHV türü enzimlerin geniş spektrumlu ilk türevi 1983 yılında bulunmuş ve SHV-2 olarak tanımlanmıştır. SHV grubu enzimler *K.pneumoniae*'den başka *Citrobacter diversus*, *E.coli* ve *P.aeruginosa*'da bildirilmiştir. Bazı SHV türlerinin bazı ülkelerde daha yaygın olduğu bildirilmektedir; örneğin SHV-5 Yunanistan'da yaygındır. Ülkemizde *K.pneumoniae* izolatlarında SHV-5 ve SHV-12 bildirilmiştir, ancak bu enzimlerin sıklığı ile ilgili yeterli veri yoktur.(98,99)

OXA Türevleri

OXA grubu enzimler Ambler grup D'de yer alan ve daha çok *P.aeruginosa*'da bulunan ESBL'lerdir. Bu enzimlerin OXA1'den OXA-10'a kadar olanları dar spektrumlu enzimlerdir ve tercih ettikleri substrat oksasilin ve kloksasilindir. TEM ve SHV türevlerinde olduğu gibi amino asit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiiiminocefalosporinleri hidroliz edebilen geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir. Geniş spektrumlu OXA enzimlerinden ilki OXA-11 enzimidir ve Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nden bildirilmiştir. Daha sonra dünyada ilk kez bildirilen geniş spektrumlu OXA enzimleri; OXA-14, OXA-15, OXA-16 ve OXA-17, yine aynı hastaneden bildirilmiştir. OXA-11,14,15 ve 16 seftazidim direncine yol açarken OXA-17 seftoksime direnç oluşturmaktadır. Bu enzim genlerinin çoğu plazmid, transpozon veya integron kontrolündedir. OXA-31 B-laktamazı ise seftapime direnç oluşturmaktadır, buna karşın seftazidime duyarlıdır. OXA enzimlerinin geniş spektrumlu türlerinin Türkiye ve Fransa'da sık bulunmalarının nedeninin bu enzimleri içeren suşların bulunmasından mı yoksa bu enzimler üzerinde çalışan araştırmacıların bu ülkelerde bulunmasından mı kaynaklandığı bilinmemektedir. OXA enzimleri içinde OXA-OXA-23, OXA-24 gibi yeni tanımlanan bazı enzimler ise karbapenemaz aktivitesi göstermektedir; bunlar ESBL değildir.(112,134)

CTX-M

Son yıllarda ESBL'lerin arasına yeni bir grup katılmıştır. CTX-M olarak tanımlanan bu grup B-laktamazlar substrat olarak seftoksime tercih etmektedir. Seftazidimi bir miktar hidroliz etmekle birlikte klinikte dirence yol açacak miktarda değildir. Bu enzimlerin önemli bir özelliği bunlara karşı tazobaktamın inhibitör etkisinin klavulanik aside ve sulbaktama göre fazla olmasıdır. İlk CTX-M B-laktamaz 1989 yılında Almanya'dan *E.coli*'de bildirilmiş, o

tarihten bugüne kadar *Salmonella spp.* başta olmak üzere bir çok *Enterobacteriaceae* türünde saptanmıştır. 1995 yılından itibaren büyük bir artış göstermiştir. Günümüzde CTX-M ailesinde 40 enzim bulunmaktadır ve bunlar amino asit dizilerindeki benzerliklere göre CTX-M-1, CTX-M-2, CTXM-8, CTX-M-9, ve CTX-M-25 olarak tanımlanan 5 gruba ayrılmıştır. Bunların içinde CTX-M-14, CTX-M-3 ve CTX-M2 en yaygın olan enzimlerdir. Bu enzimler hem insanlardan hem de sağlıklı hayvanlardan izole edilmişlerdir. Yayılmaları hem plazmidlere hem de ISEcp1 gibi hareketli genetik elementlere bağlıdır.

CTX-M enzimlerini üreten mikroorganizmaların çoğunlukla hastane enfeksiyonlarından izole edilmelerine karşın SHV ve TEM enzimlerinden farklı olarak *Vibrio cholerae*, tifo dışı *Salmonella* ve *Shigella spp.* gibi toplumdaki enfeksiyon etkenlerinde de bildirilmektedir. Sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımının CTX-M enzimlerinin ortaya çıkışında rol oynadığı düşünülmektedir.(85,100,127)

Diğer ESBL'ler

Son yıllarda genişlemiş spektrumlu enzimlerden olup TEM, SHV veya OXA B-laktamazlardan köken almamış bazı enzimler bildirilmeye başlanmıştır. Bu enzimlerden biri PER-1 enzimidir. Bu enzim ilk kez Fransa'da bir Türk hastadan izole edilen bir bakteride saptanmış, kromozomal bir enzim olarak tanımlanmıştır. Kısa bir süre sonra Hacettepe Üniversitesi'nde 14 *P.aeruginosa* suşunda bulunan ESBL'nin PER-1 olduğu belirlenmiş ve ilk kez plazmid kontrolünde bir enzim olduğu gösterilmiştir. Daha sonra İstanbul'da *Salmonella spp.*'lerde gösterilmiştir. PER-1 enzimi içeren *P.aeruginosa*'nın en belirgin özellikleri, izolatların seftazidim'e çok dirençli olmalarına karşın (MİK>256 µg/ml) piperasilin için daha düşük bir direnç göstermeleridir (MİK 8-16 µg/ml). Bu enzimler klavulanik asit ve tazobaktama duyarlıdır. Bunlardan başka BES-1, FEC-1, GES-1, CME-1, PER-2, SFO-1, TLA-1, VEB-1 gibi enzimler de ESBL grubunda yer almaktadır

ESBL'lerin Klinik Önemi

ESBL sentezleyen *E.coli* ve *Klebsiella* suşları çoğunlukla bir çok antibiyotiğe dirençli olduklarından bu mikroorganizmalar ile gelişen enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri kısıtlıdır. Buna karşın bu tip enfeksiyonlarda farklı antibiyotiklerin etkinliğini araştıran kontrollü, randomize klinik araştırmalar yoktur ve çeşitli nedenlerden ötürü yapılması da güçtür. ESBL üreten mikroorganizmalara bağlı bir çok epidemi bildirilmiş ve ESBL üretiminin klinik yanıtı olumsuz etkilediği ve ESBL üreten mikroroganizmalara bağlı bakteriyemilerde mortalitenin arttığı farklı araştırmalarda gösterilmiştir.(51,52) Bu araştırmalar çoğunlukla retrospektif

verilere dayanmaktadır. Yakın zamanda yayınlanan çok merkezli prospektif bir çalışmada ESBL üreten *K.pneumoniae* ile gelişen bakteriyemilerde antibiyotik seçiminin çok önemli olduğu ve ESBL üreten *K.pneumoniae*'ye etkili antibiyotik kullanılmadığında mortalitenin çok arttığı bakteriyeminin başlangıcından itibaren ilk 5 gün içinde uygulanan karbapenemin in-vitro olarak aktif görünen diğer antibiyotiklere kıyasla mortaliteyi önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Diğer retrospektif bir araştırmada ise ESBL üreten *E.coli* ve *K.pneumoniae*'ye bağlı bakteriyemilerde sefalosporin kullanıldığında tedavi başarısının düşük olduğu ve en etkili antibiyotiklerin siprofloksasin ve karbapenemler olduğu gözlenmiştir. Buna karşın ampirik tedaviye uygun antibiyotik ile başlanmasa bile duyarlılık test sonuçlarına göre uygun antibiyotiğe geçildiğinde mortalitede bir fark olmadığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, ESBL üreten mikroorganizmalara bağlı bakteriyemilerde uygun antibiyotik tedavisi mortaliteyi düşürmektedir.

ESBL'lerin Laboratuvar Tanısı

Son yıllarda mikrobiyologlar arasında çok sık tartışılan bir konu, ESBL'lerin rutin laboratuvarlarda tanımlanmalarının gerekli olup olmadığıdır. Yukarıda da değinildiği gibi, ESBL üreten bir mikroorganizma ile enfekte olan hastalarda geniş spektrumlu bir B-laktam ile tedavi risklidir, bu nedenle ESBL ürettiği belirlenen bir bakteri, antibiyotik duyarlılık test sonucu ne olursa olsun tüm geniş spektrumlu B-laktam antibiyotiklere dirençli olarak bildirilmelidir.(55,56)1 Bir *K.pneumoniae* veya *E.coli* antibiyotik duyarlılık testlerinde tüm geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli çıkarsa bu bakterideki enzimin araştırılması çok büyük bir önem taşımaz, çünkü tedavide zaten bu antibiyotikler tercih edilmeyecektir. Buna karşın, bazı bakteriler ESBL ürettiği halde minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) yükselmekle birlikte CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)/NCCLS standartlarına göre "dirençli" sınıra ulaşmayabilir ve ESBL araştırılmamış ise bu izolatlar geniş spektrumlu B-laktamlara "duyarlı" olarak bildirilir ve sonuçta, özellikle ciddi enfeksiyonlarda tedaviye yanıt alınamayabilir. Bunun nedenlerinden biri "inokulum etkisi"ne bağlı olabilir.

ESBL üreten bazı mikroorganizmalar rutin duyarlılık testlerinde kullanılan 10^5 cfu/ml bakteri yoğunluğunda duyarlı görünmelerine karşın inokulum 10^7 cfu/ml veya 10^8 cfu/ml'a çıktığında, ki bir çok enfeksiyonda bakteri yoğunluğu bu düzeye çıkabilmektedir, dirençli görünebilir. Bu nedenle, rutin laboratuvarlarda ESBL üretimi özel yöntemler ile araştırılmalı ve klinisyene bildirilmelidir. ESBL'lerin laboratuvarında tanımlanmaları için bir çok yöntem

bulunmaktadır. Bunlardan "çift-disk-sinerji yöntemi" ülkemizde de çok sık kullanılan bir tarama yöntemi olmuştur, ancak bu yöntemde duyarlılık uygulanan diskler arasındaki mesafe ile değişebilmektedir. ESBL tanımlamada kullanılabilen fenotipik ve moleküler testler Tablo 6'da gösterilmiştir. Bu testlerden biri ESBL saptamada kullanılabilir, ancak hepsinin olumlu ve olumsuz özellikleri vardır. Günümüzde CLSI standartlarında önerilen tarama ve doğrulama testleri rutinde kolay uygulanabilen ve maliyeti yüksek olmayan güvenilir testlerdir. Moleküler yöntemlerin kullanımı ise şimdilik epidemiyolojik araştırmalar ile sınırlıdır.

AmpC β -Laktamazlar

AmpC B-laktamazlar bir çok bakteride kromozom kontrolünde olan enzimlerdir. Bu enzimlerin plazmidlerde kodlandığına ilişkin ilk kanıt MIR-1 enziminin bulunması ile sağlanmıştır. Kromozomal AmpC B-laktamazı ile aynı biyokimyasal özelliklere sahip olan bu enzimi CMY, FOX, MOX, LAT, MIR, BIL gibi enzimlerin bildirilmesi izlemiştir. Plazmid kontrolündeki AmpC enzimler çoğunlukla *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella*, *P. mirabilis* ve *E. coli*'de bildirilmiştir.(132) ESBL'ler gibi AmpC B-laktamazların da geniş bir substrat profili vardır. Penisilinler, sefalosporinler, ve monobaktamları inhibe etmektedirler. ESBL'lerden farklı olarak sefamisinleri de inhibe etmekte ancak ticari olarak mevcut olan B-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmemektedirler. Plazmid kontrolündeki AmpC B-laktamazlar rutin duyarlılık testlerinde yalancı duyarlı sonuçlara yol açabilmekte ve aynı ESBL'lerde olduğu gibi klinikte buna bağlı tedavi başarısızlıkları bildirilmektedir. Olgu sayısının az olması nedeniyle bu enzimlerin klinikteki önemi tam bilinmemekle birlikte klinik laboratuvarların plazmid kaynaklı AmpC B-laktamazları sentezleyen suşları doğru olarak tanımlamaları gerekmektedir.

Tablo 6 : ESBL'lerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler

Klinik Mikrobiyoloji	Test	Olumlu özellikleri	Olumsuz özellikleri
	Standart CLSİ kriterleri	Kullanımı kolay, her laboratuarda uygulanabilir	ESBL'ler her zaman dirençli olmayabilir
	CLSİ ESBL doğrulama testi	Kullanımı ve yorumu kolay	Duyarlılık seçilen oksiminosefalosporine göre değişir
	Çift disk sinerji testi	Kullanımı ve yorumu kolay	Uygulanan diskler arasındaki mesafe standart değil
	Üç boyutlu test	Duyarlı yorumu kolay	ESBL için özgün değil emek yoğun
	E-test ESBL şeritleri	Kullanımı kolay	Yorum her zaman kolay değil, ÇDS testi kadar duyarlı değil
	Vitek ESBL testi	Kullanımı ve yorumu kolay	Duyarlılığı düşük
Moleküler Yöntem	DNA probları	Gen ailesi için özgül (örn: TEM ve ya SHV)	Emek yoğun, genişlemiş spektrumlu olanları olmayanlardan ayıramaz, TEM veya SHV türevlerini ayırtedemez
	PCR	Kolay uygulanır, gen ailesi için özgüldür (örn: TEM veya SHV)	Genişlemiş spektrumlu olanları olmayanlardan ayıramaz, TEM veya SHV türevlerini ayırtedemez
	Oligotiplendirme	Özgül TEM türlerini saptar	Özgül oligonükleotid probları gerektirir, emek yoğundur, yeni türevleri saptayamaz
	PCR-RFLP	Kolay uygulanır, nükleotidlerdeki özgül değişiklikleri saptayabilir	Saptanabilmesi için nükleotid değişikliklerinin restriksiyon bölgesinde değişikliğe yol açması gerekir
	PCR-SSCP	Çeşitli SHV türevlerini ayırtedebilir	Özel elektroforez koşullarını gerektirir
	Nükleotid dizi analizi	Altın standarttır, tüm türevleri saptayabilir	Emek yoğun, teknik olarak zor olabilir, manuel yöntemleri yorumlamak güç olabilir

Plazmid Kaynaklı AmpC β -Laktamazların Laboratuvar Tanısı

Klinik laboratuvarlarda plazmid kaynaklı AmpC B-laktamazlar rutin olarak araştırılmamaktadır; bunun nedeni eldeki fenotipik testlerin uygun olmayışı, özgüllük yada duyarlılıklarının yetersiz oluşu, veya kolay bulunamayan ayıraçlara gereksinme göstermeleridir. CLSI'nın da AmpC B-laktamazların saptanması için bir önerisi bulunmamaktadır.

İnduklenebilen AmpC B-laktamazı olmayan bakteri türlerinde kromozomal B-laktamazın aşırı üretimi ile oluşan direnç paterninin görülmesi plazmid kaynaklı AmpC B-laktamazı düşündürmelidir. Ancak başka direnç mekanizmaları da benzer bir fenotipe yol açabilir. Şüphelenilen izolatlarda "üç boyutlu test (M3D)" veya "Masuda bioassay" ile ileri araştırma yapılabilir. Sefoksitin agar besiyeri (CAM) testi bu amaçla geliştirilmiş bir diğer testtir. Tek bir plakta bir kaç izolat test edilebilmektedir ve 4 mg/L sefoksitin içeren CAM yönteminin M3D yöntemine duyarlılık ve özgüllük yönünden eşdeğer olduğu belirtilmektedir. Yeni önerilen, EDTA emdirilmiş kağıt disklerin kullanıldığı disk testinin kromozomal B-laktamazı olmayan türlerde yüksek bir duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilmektedir. Plazmid kaynaklı AmpC B-laktamazları saptamak için multiplex PCR araştırma amaçlı olarak kullanılabilir ancak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin kullanım için mevcut değildir.

Plazmid kaynaklı AmpC B-laktamazları üreten izolatlar hastane epidemilerine yol açmakta ve gün geçtikçe sıklıkları artmaktadır. Buna karşın bu enzimleri saptayabilen, uygulanması kolay testler henüz geliştirilme aşamasındadır.

II.4 PULSED FIELD JEL ELEKTROFOREZİ YÖNTEMİ

PFGE moleküler tiplendirme yöntemlerinin altın standardı olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde sıvı veya katı besiyerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısıyla agarozla karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir. Agaroz içine karıştırılan bakteri hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak (in situ-lysis) DNA izolasyonu yapılmaktadır. PFGE'de bozulmamış DNA gerekli olduğundan, DNA'da kırılmalara neden olabilen geleneksel DNA izolasyonu bu yöntem için uygun değildir. Lizis işlemini takiben agaroz kalıpları iyice yıkanarak veya diyaliz edilerek protein veya karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanır. Büyük olan kromozomal DNA agaroz jel içinde tutulu kalır. Agaroz içindeki bakteriyel DNA, nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi (RE) ile kesime uğratılmaktadır (in situ-digestion). Daha sonra içinde kesime

uğratılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, elektroforez uygulanacak jel üzerindeki uygun çukurlara yerleştirilmekte ve belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulmaktadır. Bu tip bir elektrik akımı, 10-800 kilobazlık DNA segmentlerinin net olarak ayırılmasına olanak sağlamaktadır. Elektroforez sonucunda jel etidyum bromürle boyanarak, her bir izolata ait bant profili görünür hale getirilmektedir. Bu bant profilleri bilgisayar programları yardımıyla değerlendirilerek suşların birbiriyle olan ilişkileri ortaya konulmaktadır. Bilgisayara dayalı analizlerde, incelenen mikroorganizmalara ait PFGE profillerinin saklanması ile veri bankası oluşturulabilir. Böylece çalışılan suşların profillerinin daha önce var olan verilerle karşılaştırılma olasılığı oluşmaktadır.

PFGE’de yüksek kalitede DNA’nın elde edilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle soğuk tampondaki hücrelerin hızlıca işlenmesi, erimiş agarozda eklenmeden önce bakterilerin buzda tutulması ve agaroz kalıpların soğukta tutulması gerekmektedir.

RE seçerken göz önünde tutulması gereken birçok faktör vardır. Birincisi bakteriyel DNA’nın G+C içeriğidir. Düşük G+C içerikli DNA’lar (örneğin *Staphylococcus aureus*), tanıma bölgesi G+C bakımından zengin olan RE (örneğin SmaI) ile muamele edildiğinde yeteri kadar kesilememektedir.(30) İkincisi ise tanıma bölgesi uzun olan enzimler, kısa olanlara kıyasla daha az sayıda kesim parçaları oluştururlar.

PFGE yönteminin değişik tipleri bulunmaktadır. En basit tipi ‘‘field-inversion gel electrophoresis’’dir. Bu sistemde elektrik akımı belirli sürelerde ileri ve geri olmak üzere iki yönde uygulanmaktadır. İleri yönde uygulanan akımın süresi daha uzundur. Yaygın kullanılan tipi ise ‘‘contour-clamped homogenous electric field’’ dir. Bu sistemde altıgen biçiminde 120 derecelik açılarda yerleştirilmiş olan elektrotlardan sabit hızda elektrik akımı gelmektedir.

Büyük DNA parçalarının agarozda ayrıştırılmasına etki eden çeşitli faktörler vardır. Bunlardan başlıcaları, agaroz konsantrasyonu, tampon konsantrasyonu, sıcaklık, pulse süresi, voltaj ve toplam elektroforez süresidir.(30,59,136,139)

Yöntemin ayırım gücü oldukça yüksektir. Ancak zaman alıcı ve kompleks bir sistemdir. Ayrıca laboratuvarlar arasında hala standardizasyon problemi vardır. Yöntemin uygulanmasında güvenlikle ilgili bazı hususlara dikkat edilmelidir. Bakterilerin işlenmesi aşamasında kontaminasyonu önlemek için azami dikkat gösterilmelidir. Jeli boyamada kullanılan etidyum bromürün mutajen olduğu dikkate alınarak, maske ve eldiven giyilmelidir.

Kontroller

Test izolatlarının yanında restriksiyon profilleri çok iyi bilinen bakteriler de kontrol amacıyla kullanılabilir. Böylece:

- Hücre parçalanması, yıkama ve endonükleaz basamaklarının uygunluğu,
- Jel ve elektroforez koşulları,
- Sonuçların tekrarlanabilirliği kontrol edilmiş olur.

Jeldeki en az bir çukurda (ideal olanı biri jelin baş tarafındaki, diğeri ortadaki çukurda olmak üzere iki çukurda) moleküler ağırlık standardı kullanılmalıdır. Bu standartlar, delesyon, insersiyon ya da mutasyonlar gibi tek bir genetik olaydan kaynaklanabilecek çok küçük değişikliklerin değerlendirilmesi için yararlı olmaktadır. ‘Lambda ladder’ en yaygın kullanılan moleküler ağırlık standardıdır.(60,61)

II.4.1 Restriksiyon profillerinin analizi ve izolatların yakınlık derecelerine göre sınıflandırılması

Öncelikle, ortak ya da salgın profili belirlenir. Ortak profil yoksa büyük olasılıkla izolatlar birbiriyle ilişkisizdir (Epidemiyolojik olarak ilişkili suşlar arasında ortak profil olmaması nadir bir durumdur). Salgın suşunun profili belirlendikten sonra, buradaki bantların sayı ve boyutları diğer izolatlarınkı ile karşılaştırılır. Her bir izolatın profili, salgın suşuyla olan ilişkisine göre sınıflandırılır.

PFGE ile elde edilen DNA profillerini yorumlamak ve bunları epidemiyolojik çalışmalarda kullanabilmek için, PFGE profillerinin nasıl karşılaştırılması gerektiğinin ve rastlantısal genetik olayların bu profilleri nasıl değiştirebileceğinin bilinmesi gereklidir. İdeal olarak salgın suşlarının PFGE profilleri birbiriyle aynı, epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşlarınkı ise farklı olması gerekir.(135,144) Böyle olduğu zaman salgın suşunun tespit edilmesi kolay olur. Ancak sık olarak nokta mutasyon, insersiyon ve delesyon gibi rastlantısal genetik olaylar, salgın süreci içinde PFGE profilini değiştirebilir. Bu durum sonuçların değerlendirilmesini zorlaştırır.

Tenover ve arkadaşları PFGE sonuçlarının yorumlanması için bir sistem önermişlerdir. Bu sistemde bant profillerine bakılarak, izolatların birbiriyle derecelendirilmesi yapılabilmektedir.

Aynı izolat: Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlar için kullanılır. Bu izolatlar genetik olarak farksız kabul edilir. Salgın suşu ile aynı profili gösteren izolatlar, epidemiyolojik olarak ilişkilidir. Epidemiyolojik verilerle desteklenen tek bant farklılığının da klonal ilişkiyi gösterdiği kabul edilmektedir.(57,74)

Yakın ilişkili izolat: Salgın suşu ile aralarında 2-3 bant farkı olan izolatlar için kullanılır. İzolat salgın suşuyla yakından ilişkili olarak değerlendirilir ve epidemiyolojik olarak, salgının bir parçası olma olasılığı yüksektir.(124) Bu farklılık, bir nokta mutasyon veya insersiyon ya da bir delesyon gibi tek bir genetik olayla ilişkilidir. Örneğin yeni bir restriksiyon bölgesi oluşturan spontan bir mutasyon, restriksiyon parçasını daha küçük iki parçaya ayırır. Orijinal büyük parçanın eksikliği bir bant farkına, yeni oluşan daha küçük iki parça da ek olarak iki bant farkına neden olur. Başka bir ifade ile test izolatıyla salgın suşu arasında üç bantlık bir fark oluşur.

Bazı türlere ait suşların zaman içinde tekrar tekrar kültürleri yapıldığında ya da aynı hastadan arka arkaya izole edildiğinde iki-üç bantlık bir değişiklik gösterdiği de kaydedilmiştir.

Muhtemelen ilişkili izolat: Salgın suşları ile aralarında 4-6 bant farkı olan izolatlar için kullanılır. Bu değişim, iki bağımsız genetik değişikliğin (insersiyon/delesyon ya da restriksiyon bölgelerinin kazanımı veya kaybı) sonucu olarak ortaya çıkmaktadır.(149,150) Bu tarz bir değişiklik, uzun bir zaman sürecinde (6 ay) veya çok sayıda hastanın olduğu büyük salgınlarda toplanan izolatlar arasında gözlenmiştir. Epidemiyolojik yönden, bu izolat, salgın suşuyla olası ilişkili olarak değerlendirilir. Bu izolatlar salgın suşuyla aynı genetik soydan olabilirler, ancak genetik olarak yakın ilişkili değildirler. Epidemiyolojik olarak ilişkili olma ihtimalleri daha azdır.

Genetik olarak muhtemelen ilişkili olan ancak salgın suşuyla epidemiyolojik bağlantısı olmayan izolatlar, plazmit fingerprinting gibi diğer tiplendirme yöntemleriyle farklılık gösterme eğilimindedirler.

İlişkisiz izolatlar: Bu izolatların DNA'sında, üç ya da daha fazla genetik olay sonucu oluşan değişikliklere bağlı olarak, salgın suşundan yedi ya da daha fazla bant farkı gözlenmektedir. Epidemiyolojik olarak, salgın suşuyla ilişkisiz oldukları kabul edilir.

Bu kriterler kullanılırken dikkate alınması gereken belirli hususlar vardır. PFGE ile en az 10 ayrı bant oluşmussa bu kriterler güvenle kullanılabilir. Daha az sayıda bant tespit edildiğinde kriterlerin güvenilirliği ve ayırt etmedeki yeterliliği bilinmemektedir.

Kriterler, genetik değişimin sınırlı olduğu düşünülen küçük ve lokal çalışmalar için belirlenmiştir. Hastanelerde ya da toplumdaki potansiyel salgınlarla ilgili epidemiyolojik çalışmalar sırasında kısa bir zaman sürecinde (1-3 ay) alınmış izolatlar için kullanılabilir. Bir yıl ya da daha uzun sürede toplanan, geniş mikroorganizma popülasyonlarıyla yapılan çalışmalar için uygun değildir.

Bu öneriler, tiplendirme çalışmaları için sınırlı zamanı ve kaynağı olan ve suşları tek bir restriksiyon endonükleaz kullanarak analiz edecek laboratuvarlar için düzenlenmiştir. Uzun zaman sürecinde toplanmış izolatlar arasındaki potansiyel ilişkiyi araştıran referans laboratuvarları, çok sayıda enzim ve analiz yöntemi kullananlar bu kriterleri modifiye etmelidirler.

II.4.2 Genetik olayların PFGE profilleri üzerindeki etkisi:

Yeni bir restriksiyon bölgesinin oluşmasıyla sonuçlanan nokta mutasyon: Yeni profilde, salgın profilinde bulunan bir bant olmayacak ve salgın profilinde olmayan iki yeni ve daha küçük bant olacak, iki küçük bandın boyutlarının toplamı, yaklaşık olarak büyük bandın boyutları kadar olacaktır.

Bir restriksiyon bölgesinin kaybıyla sonuçlanan nokta mutasyon: Yeni profil, salgın suşunda olmayan, daha büyük bir bant kazanırken iki küçük bandı kaybetmiş olacak. Bu değişim de üç bandı farklı profil olarak gözlenecektir.(30,148,158)

Restriksiyon parçası içine restriksiyon bölgesi bulunmayan yeni bir DNA insersiyonu: Yeni profil, salgın profiliyle aynı sayıda banta sahip olacak. Ancak, büyüklüğü farklı (daha büyük) yeni bir bant bulunacaktır.

Bir banttın içinde restriksiyon bölgesi bulunmayan parçanın delesyonu: Yeni profil, büyük bir parçası eksik buna karşılık, yeni, küçük boyutta bir banta sahip olacak. Bu değişim iki bandı farklı profil olarak görülecektir.

II.4.3 Sonuç olarak;

PFGE; *Salmonella*, *Neisseria gonorrhoeae*, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* gibi birçok gram–pozitif ve gram-negatif bakterinin tiplendirilmesinde güvenle kullanılmıştır. Vankomisine dirençli *enterokoklar*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Acinetobacter* türleri ve *Pseudomonas aureginosa* suşlarının tiplendirilmesinde, bu yöntemin ayırım gücünün, diğerlerinden daha üstün olduğu belirtilmiştir.(30,59,136,139)

III. MATERYAL VE METOD

III.1 Çalışmada kullanılan izolatlar

Bu çalışmada 2006-2008 yılları arasında Ankara Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvar'ına ÜSE ön tanısı ile gönderilmiş olan idrar örneklerinden üretilmiş olan 30 adet *E.coli* suşu çalışmaya dahil edilmiştir.

İdrar örneğinde *E.coli* üremiş olan 30 hastaya ait bilgiler ve tıbbi durumları geriye dönük olarak incelenmiştir. Bu doğrultuda hastalara ait cinsiyet, yaş dağılımı, başvurduğu klinik, yatan/ayaktan hasta olması, predispozan faktörler açısından kayıt edilmiştir.

III.2 Suşların canlandırılması ve saflaştırılması

-80°C' de saklanmış olan *E.coli* izolatları EMB ve Nutrient agar besiyerine tek koloni ekim yöntemiyle ekilerek 37°C'de bir gece inkube edildikten sonra laktoz pozitif yeşil refle veren koloniler kontaminasyonlardan arındırılarak saf olarak tekrar ekildi, seri pasajlarla çoğaltıldı.

III.3 Suşların identifikasyon ve doğrulanması

Suşlar önce identifikasyon amacıyla klasik biyokimyasal yöntemlerden IMVIC yöntemi kullanılarak sitrat, lizin, ornitin, üre, indol, kligler iron agar besiyerlerine ekildi. *E.coli* olduğu düşünülen suşlar doğrulama amacıyla gram negatif kristal identifikasyon kiti ile test edilerek doğrulandı.

III.4. BD BBL Crystal TM Identification System Enteric/Nonfermenter ID Kit:

BBL Crystal, mikrobiyal substrat kullanımını ve substurat tüketimini çeşitli indikatör sistemler aracılığı ile saptayan bir sistemdir. Oksidasyon reaksiyonları, test substratı içindeki pH indikatörünün kullanımı ile saptanır. Kromojenik substuratların hidrolizi gözle saptanabilir renk değişimleri oluşturur.

Kit prosedürüne uygun olarak hazırlanmış, inkübasyonu tamamlanan paneller; panel okuma lambası aracılığı ile okundu. Renk reaksiyon tablosu referans alınarak reaksiyon sonuçları kaydedildi. Kit dışı indol ve oksidaz test sonuçları da hesaplanan profil numarasına

eqlenerek bilgisayaraya yüklendi, BBL Crystal ID System Electronic Codebook programından bakteri cins ve tür adı elde edildi.

III.5 Antimikrobiyal duyarlılık testi

Antimikrobiyal duyarlılık testi Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI) standartlarına göre disk difzyonyntemi ile çalışıldı. Antibiyotik olarak Beckett Dickinson tarafından üretilmiş BBL markalı sefoksitin (30 µg), sefotaksim (30 µg), sefepim (30 µg), seftazidim (30 µg), sefazolin (30 µg), sefalotin (30 µg), sefuroksim (5 µg), ampisilin (10 µg), ampisilin-sulbaktam (10 µg), amoksisilin-klavulonat (30 µg), imipenem (10 µg), piperasilin (100 µg), trimetoprim-sulfometoksazol (23.75µg/1.25µg), oflosasin (5 µg), amikasin (30 µg), gentamisin (10 µg), sulfisaksazol (0,25 µg), nitrofurantoin (100 µg), piperasilin-tazobaktam (110 µg), tikarsilin-klavulonat (85 µg), karbenisilin (100 µg) kullanıldı. Kalite kontrolü E.coli ATCC 25922 suşu ile yapıldı. İzolatlar duyarlılık farklarına göre gruplandırıldı.

III.6 Disk Difüzyon Test (DD)

MAC besiyerinden, birbirine benzer morfolojideki dört veya beş koloni seçilerek 0,5 McFarland bulanıklığında ayarlanmış inokulum, Müeller-Hinton besiyerine yayıldı. Antimikrobiyal emdirilmiş kağıt diskler agar yüzeyine yerleştirildi. 35°C etüvde 18 saat inkübasyon sonrası, petrilerin arka yüzünden cetvel yardımı ile her disk etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçüldü. Karışık üremeyi veya mutant varyantı temsil edebilecek kolonilere inhibisyon zonları içinde rastlanmadı. CLSI Disk Difüzyon standart tablolarındaki değerler temel alınarak duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençli olarak değerlendirildi.

III.7 PFGE

III.7.1. Kullanılan malzemeler

III.7.1.1. Ekipman

1. BIO-RAD

1.1. Cooling Module

1.2. CHEF-DR II Drive module

1.3. CHEF DR II Control module

1.4. Electrophoresis Cell

2. alkalamalı su banyosu (Nüve ST 402)
3. Etüv (Nüve N 50)
4. Gel Logic 2200 İmaging System (1708x1280 pixel,Kodak company)
5. Gel-Compare II yazılım sistemi (version 3.0 ; Applied Maths, Sint-Martens- Latem, Belgium)
6. " Plug-mold", "sample CHEF disposable plug mold" (BIORAD 1703706)
7. 10,100,1000 mikrolitre kapasiteli otomatik pipetler
8. Isı blok inkübatör (WiseTherm Wisd HB-48P)
9. Vorteks (Vortex V1 plus BOECO-Germany)

III.7.1.2. Kimyasallar

1. Low Melt Preparative Grade Agaroz (Ultra pure DNA grade agarose, Prona ,İspanya)
2. Pulse field certified agarose (Prona, İspanya)
3. Proteinaz K (Applichem, Almanya)
4. Lizozim (Applichem, Almanya)
5. 0.5 x TBE tampon çözeltisi (Fermentas, Litvanya)
6. FastDigest *XbaI* (Fermentas, Litvanya)

III.7.2. Test prosedürü

III.7.2.1. İzolatların hazırlanması

1. Biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış bakterilerden her çalışma öncesinde Nutrient agar ve EMB agara tek koloni paralel ekimler yapıldı.
2. Bir gecelik inkubasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edildi.
3. Buradaki tek kolonilerden tekrar Nutrient agara tek koloni ekimine uygun olacak şekilde , pasaj yapılarak bir gece inkubasyona bırakıldı.
4. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, 1 ml hücre suspansiyon tamponu (HST) (100 Mm Tris-HCl, 100 Mm EDTA, ph: 8.0) içinde suspanse edildi.
5. Hücre suspansiyonu , 2500 x g' de , 4 C' de 15 dakika (alternatif olarak 13000 x g' de 2 dakika) santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstteki HST atıldı.

6. Pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vortex yapıldı.

7. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre (UV/Vis. Spektrofotometer, Boeco, Germany) yardımıyla 590nm'de 1 absorbans (yaklaşık Mc Farland 4 bulanıklığı) olacak şekilde ayarlandı. Bakteri suspansiyonu agaroz gömülme üzere oda ısısında bekletildi.

III.7.2.2 İzolatların agaroz gömülmesi

1.HST içerisinde %2'lik düşük erime ısılı agaroz (LMA) hazırlandı.

- 0.200 gr agaroz , 100 ml'lik balona konuldu.
- Üzerine 9 ml HST eklenip yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı.
- Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında eritildi.
- Agaroz iyice çözüldükten sonra balon 45-50 °C lik su banyosuna oturtuldu.
- 50 °C de % 10' luk sodyum dodezil sülfattan (SDS) 1 ml eklenerek iyice karıştırıldı.
- Agaroz-SDS karışımından 200'er µl ependorf tüplere dağıtıldı ve 45-50 °C'deki su banyosunda bekletildi.

2. Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenip buz kabına oturtuldu.

3. HST içinde hazırlanmış bakteri suspansiyonundan 200'er µl alınarak 50°C' de tutulan ve içerisinde 200 µl LMA–SDS bulunan tüpe eklendi. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlandı.

4. Hücre-agaroz-SDS karışımından agaroz kalıbının godelerine (10 mm by 5 mm by 1.5 mm, Bio Rad Laboratories) 100'er µl dağıtıldı.

5. Kalıplar, kaliteli DNA hazırlama amacıyla agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de, 10 dakika bekletildi böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, agarozun homojen katılaşması sağlandı.

III.7.2.3. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

1. 1.5 ml'lik steril kapaklı tüplere 0.5 ml Hücre Liziz Solüsyonu-1 (HLS-1) (50 Mm Tris-HCl Ph:8.0 , 50 Mm EDTA , 2.5 mg/ml lizozim, 1.5 mg/ml proteinaz K) konuldu.

2. İçerisinde bakteri bulunan agarozlar , kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirdi.

3. HLS-1 içerisindeki kalıplar 37°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.
4. HLS-1 dökülerek yerine 0.5 ml hücre lizis solüsyonu-2 (HLS-2) (0.5 M EDTA , %1 sarkozil , 400 µg/ml proteinaz K) solüsyonu tüplere eklendi.
5. 55 C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

III.7.2.4. Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

1. Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletildi.
2. HLS-2 solüsyonu tüplerden dikkatlice uzaklaştırıldı.
3. İçinde agaroz kalıp bulunan tüplere, 50°C'ye ısıtılmış olan steril ultra saf sudan (Reagent Grade Type 1) 4'er ml eklenerek, 50°C çalkalamalı su banyosunda 15 dakika bekletildi.
4. Tüplerdeki sular tamamen aspire edildikten sonra üçüncü maddede belirtilen su ile yıkama işlemi iki defa daha tekrarlandı. Tüplerdeki sular tamamen aspire edildi.
5. Daha sonra agaroz kalıpları her biri 50 °C 15 dakika olmak üzere üç kez 4 ml TE (10 mM Tris-HCL, 0.1 mM EDTA, pH 7.6) tamponuyla yıkandı.
6. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz kalıplar, restriksiyon enzimleriyle (RE) kesime hazır hale getirilmiş oldu.

III.7.2.5. Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla ¼ oranında kesildi. Parçalardan biri 100 µl 1x FastDigest tampon konularak çalkalamalı su banyosunda 37 °C' de 10 dakika bekletildi. (Diğer parçalar TE tamponu içinde saklandı.)

2. **Tablo 7:** FastDigest *XbaI* Restriksiyon enzim karışımı

Enzim	5 µl FastDigest <i>XbaI</i> enzim
Tampon	10 µl 10 x FastDigest <i>XbaI</i> tampon
H2O	85 µl steril ultra saf su (Reagent Grade Type 1)
Total volum	100 µl

3. Tüplerdeki enzim tamponları uzaklaştırılıp 2 numarada hazırlanmış olan karışımdan her bir tüpe 100'er µl eklendi. 37 °C' de 2 saat inkübasyon yapıldı.

4. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildikten sonra kalıplar elektroforez için hazır hale getirildi.

III.7.2.6. Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi

1. 0.5x TBE (44.5 Mm Trisma base, 44.5 Mm Borik asit, 1 Mm EDTA , Ph: 8.0) içinde 100 ml olacak şekilde % 1'lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-rad Laboratories) hazırlandı.

i. 1 g "pulsed- field certified agarose" 200 ml'lik balona konularak üzerine 100 ml 0.5x TBE eklendi, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı.

ii. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında iyice çözülmesi sağlandı.

iii. Agaroz iyice çözüldükten sonra balon 45-50 °C' lik su banyosunda bekletildi.

2. Agaroz dökülecek kaset hazırlandı.

3. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısımlarına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirildi. Tarağın baş ve sondaki dişleri boş bırakıldı. Kalan dişlerin ilk orta ve son kısımlarına kontrol suşları (*E.coli* ATCC 25922) yerleştirildi.

4. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C (çok önemli) olan agaroz kaset içine döküldü, donduktan sonra tarak ve kaset çerçevesi çıkarılarak, tablo üzerindeki katılmış olan agaroz, içerisinde 1900-2000 ml 0.5x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

III.7.2.7. Elektroforez

Elektroforez CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) uygulandı. Elektroforez koşulları aşağıdaki gibi uygulandı.

Tablo 8: PFGE koşulları

Restriksiyon enzimi	Başlangıç vuru süresi	Bitiş vuruş süresi	Vuruş açısı	Alana düşen akım	Sıcaklık	Süre
FastDigest <i>XbaI</i>	5 sn	30 sn	120 ⁰	6 V/cm ²	14 ⁰ C	20 sa
FastDigest <i>NotI</i>	5 sn	33 sn	120 ⁰	6 V/cm ²	14 ⁰ C	22 sa

III.7.2.8. Sonucun gözlenmesi ve analizi

1. Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alındı. Yirmi dakika boyanmaya bırakıldı.

2. Boyanan jel Gel Logic 2200 imaging system (ayrım gücü 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi, resimler TIFF formatında kayıt edildi.

3. Gel Compar II yazılım sistemi (version 3.0, Applied Maths, Sint–Martens-Latern, Belçika) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart suş (1, 7, 15, kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. "Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)" kullanılarak PFGE profillerinin , dendogramı ve kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı "Dice" benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, % 1-1.5 olarak alındı.

4. Tenover ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş kriterler kullanılarak izolatlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirildi.

Tenover Kriterleri:

- Aynı izolatlar: Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlar için kullanılır. Bu izolatlar, genetik olarak farksız kabul edilir. Epidemiyolojik olarak ilişkilidir.
- Yakın ilişkili izolatlar: Salgın suşu ile aralarında 2-3 bant farkı vardır. Büyük olasılıkla salgınla ilişkili suşlardır.
- Muhtemel ilişkili izolatlar: Salgın suşları ile aralarında 4-6 bant farkı vardır. Muhtemelen salgınla ilişkilidirler.
- İlişkisiz izolatlar: Aralarında ≥ 7 bant farkı vardır. Salgınla ilişkileri bulunmayan suşlardır.

IV. BULGULAR

Laboratuvarımızda 2006-2008 yılları arasında stoklanmış olan 30 adet *E.coli* suşu önce identifikasyon amacıyla klasik biyokimyasal yöntemlerle identifiye edildi. *E.coli* olduğu düşünülen suşlar doğrulama amacıyla gram negatif kristal identifikasyon kiti ile test edilerek doğrulandı. İdentifikasyonu tamamlanan *E.coli* izolatları antimikrobiyal duyarlılık ve PFGE yöntemiyle tiplendirildi.

Çalışmada incelenen 2006-2008 yıllarına ait 30 adet *E.coli* suşunun disk difüzyon yöntemiyle yapılan antibiyogram duyarlılık testleri sonucunda 4 adet direnç paterni elde edildi. Bütün *E.coli* suşları ESBL pozitif olmasından dolayı sefalosporinlere dirençli oldukları için sefalosporinler direnç gruplandırılmasında yer almamaktadır. Birinci grupta (R1) SXT, OFX ve AMP direnci mevcut olup tüm gruplar içinde % 42'lik bir orana sahipti. Betalaktam-betalaktam inhibitör kombinasyonları % 27 ile ikinci grupta (R2) sınıflandırıldı. Üçüncü grupta (R3) aminoglikozidlerin önde gelenleri ele alındı, % 22'lik paya sahipti. Diğer antibiyotikler de 4. grupta (% 9) sınıflandırıldı. (Tablo 9)

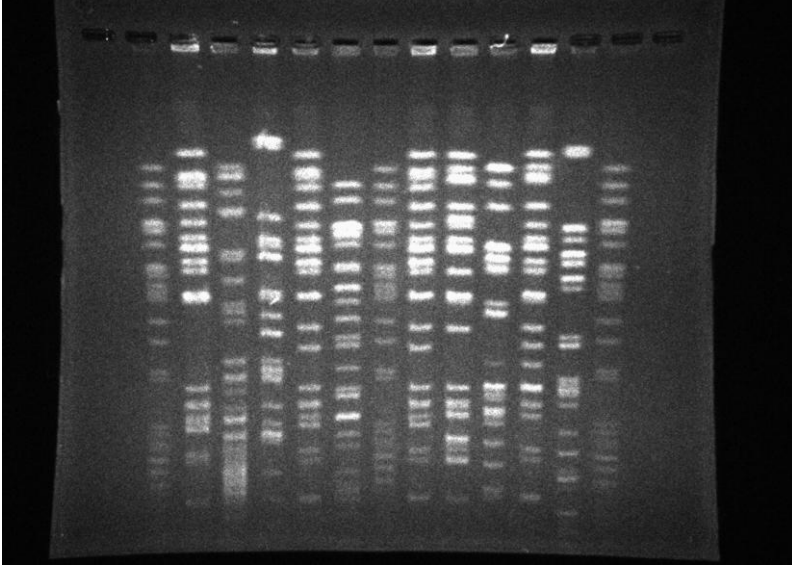
Tablo 9: *E.coli* suşlarının direnç profili

Direnç fenotipi	Direnç paterni	İzolat No.	%
RI	SXT,OFX,AMP	1,2,5,6,7,8,9,13,17,20,21,25,26	42
RII	AMC,TZP,TIM	3,10,14,15,18,19,22,28	27
RIII	GM,AN,CB,PIP	4,12,16,23,27,29	22
RIV	FM,G25,IMP	11,24,30	9

SXT:Trimetoprim sulfometoksazol, OFX:ofloksasin, AMP:Ampisilin, AMC:Amoksisilin-klavulonat, TZP:tazobaktampiperasilin, TIM:tikarsilinklavulonat, GM:Gentamisin, AN:Amikasin, CB:karbenisilin, PIP:Piperasilin, FM:Nitrofurantoin, G25:Sulfisaksazol, IMP:İmipenem

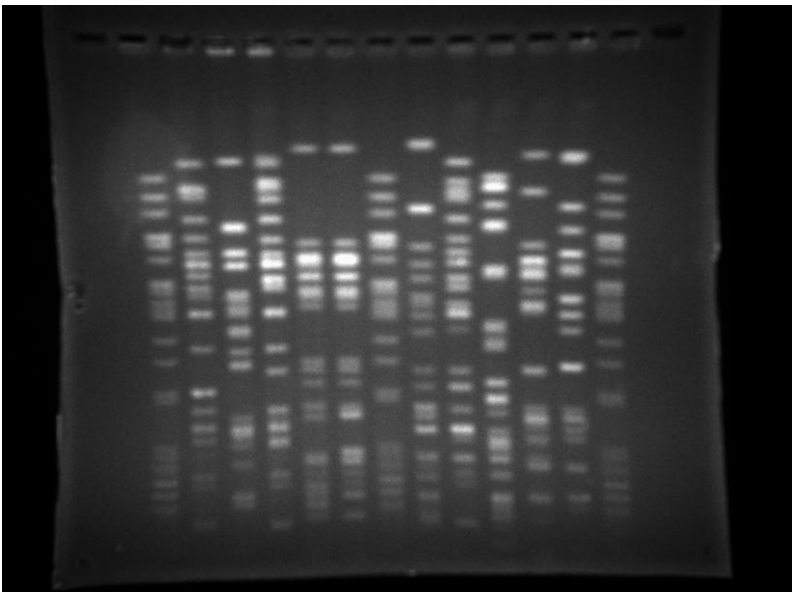
E.coli izolatlarının antibiyogram tiplendirilmesi yapıldıktan sonra genotipik tiplendirilmesi amacıyla yapılan PFGE çalışmasında *E.coli* DNA'ları restriksiyon endonükleaz aktiviteli FastDigest XbaI enzimiyle kasıldıktan sonra çeşitli bant paternlerinin görüldüğü PFGE jel görüntüleri ortaya çıktı. (Şekil 1,2,3)

S 1 2 3 4 5 S 6 7 8 9 10 S



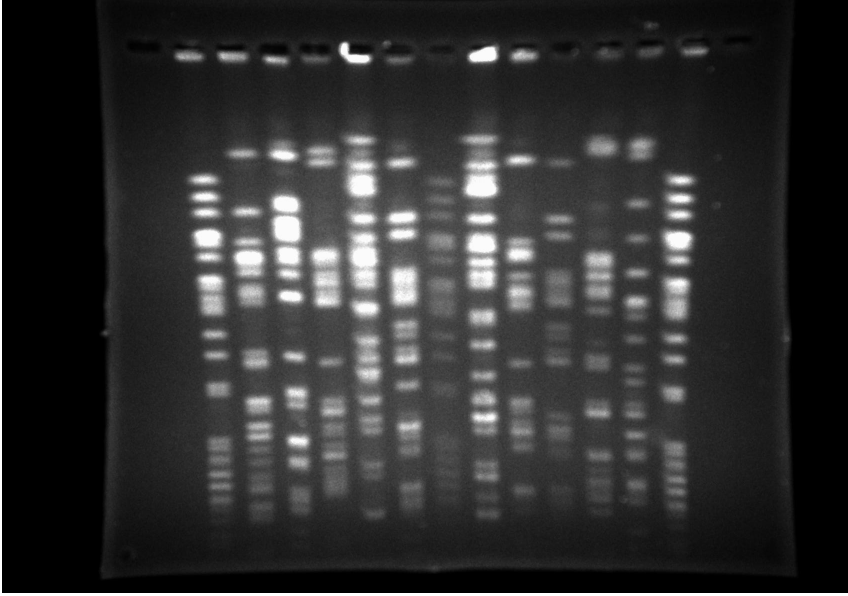
Şekil 1: FastDigest XbaI PFGE görüntüsü, 2006-1.grup [1-10] S:Standart suş

S 1 2 3 4 5 S 6 7 8 9 10 S



Şekil 2: FastDigest XbaI PFGE görüntüsü, 2007-2.grup [11-21] S:Standart suş

S 1 2 3 4 5 S 6 7 8 9 10 S

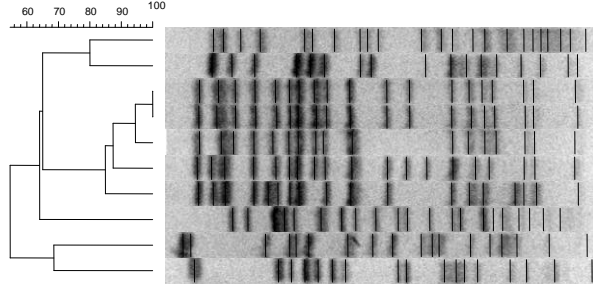


Şekil 3: FastDigest XbaI PFGE görüntüsü, 2008-3.grup [21-30] S:Standart suş

PFGE bant profillerinin sergilendiği *E.coli* suşlarının jel görüntülerinden bir sonraki aşamada dendogram analizi yapıldı. Gel-Compare-II kullanılarak yapılan bant profil analizinden sonra PFGE profil dendogramları oluşturularak Dice benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişkiler belirlendi.

2006 yılına ait 10 adet *E.coli* suşunun dendogramı yapıldığında 4 major PFGE profili elde edildi. Birinci grupta 2 ayrı suşa ait bant paterni izlenmektedir. İkinci grupta 2 identik suş içeren bir küme ve bu suşlarla yakın ilişkili bir suş ve ayrıca farklı profile sahip 2 suş içermektedir. Üçüncü gruba ait tek bir suş bulunmaktadır, dördüncü profilde 2 ayrı suşa ait bant paterni izlenmektedir (Şekil 4).

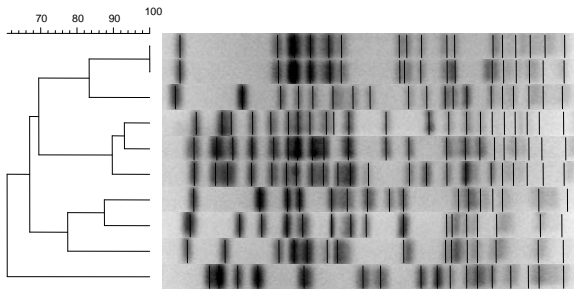
█



Şekil 4: *E. coli* FastDigest XbaI PFGE profili, 2006 [1-10]

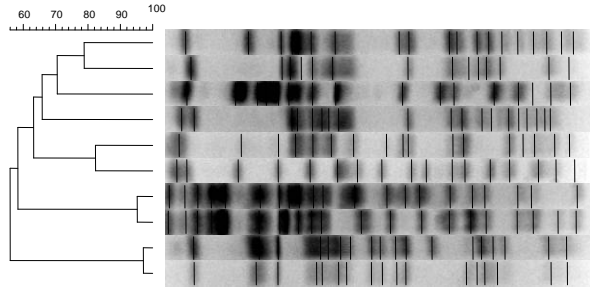
2007 yılına ait 10 adet *E. coli* suşunun dendogramı yapıldığında 4 major PFGE profili elde edildi. Birinci grupta 2 identik suş içeren bir küme ve bu suşlardan farklı bir suş içermektedir. İkinci profilede yakın ilişkili 2 suş ve bunlardan farklı bir suş bulunmaktadır. Üçüncü profilede yakın ilişkili 2 suş ve bu suşlardan farklı bir suş bulunmaktadır, dördüncü profilede ise tek bir suş bulunmaktadır (Şekil 5).

█



Şekil 5: *E. coli* FastDigest XbaI PFGE profili, 2007 [11-20]

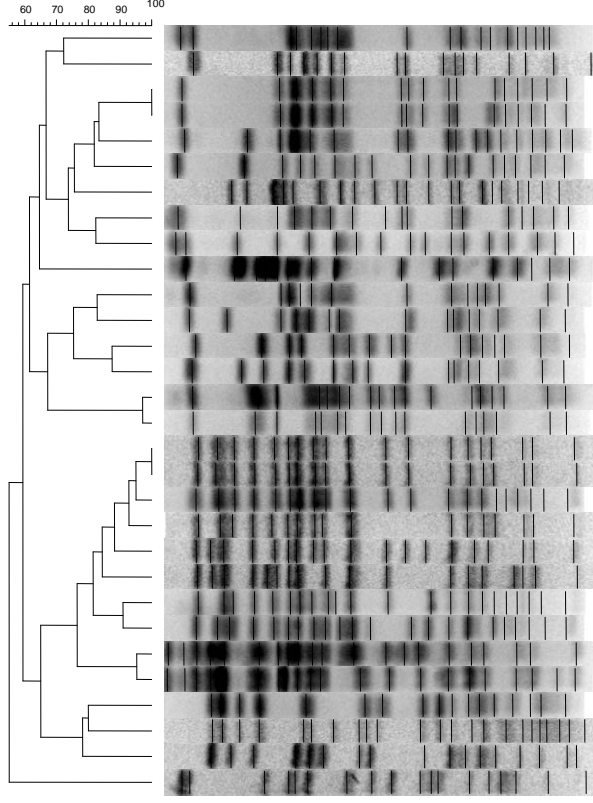
2008 yılına ait 10 adet *E.coli* suşunun dendogramı yapıldığında 4 major PFGE profili elde edildi. Birinci profilde muhtemel ilişkili olabilecek 2 suş ve bunlardan farklı 2 ayrı suş bulunmaktadır. İkinci profilde yine muhtemel ilişkili olabilecek 2 suş görülmektedir. Üçüncü ve dördüncü profilde yakın ilişkili ikişer suş dendogram görüntüsü üzerinde izlenmektedir (Şekil 6).



Şekil 6: *E.coli* FastDigest XbaI PFGE profili, 2008 [21-30]

2006, 2007 ve 2008 yıllarına ait 30 adet *E.coli* suşunun toplu dendogramı incelendiğinde 5 major PFGE profili elde edildi. Birinci profilde 2 ayrı suşa ait bant paterni izlenmiştir. İkinci profilde 2 identik suş içeren bir küme ve bunlardan tamamen farklı 5 suş görülmüştür. Üçüncü profilde 2 adet yakın ilişkili suş ve bunlardan farklı 4 ayrı suşa ait bant paterni izlenmiştir. Dördüncü profilde 2 identik suş içeren bir küme, 2 ayrı yakın ilişkili ikişer suş ve bunun haricinde 4 ayrı suş görülmüştür. Beşinci profilde 3 ayrı suşa ait bant profiline rastlanmıştır. Bu 5 grubun haricinde profilleri daha farklı olan 2 suş daha bulunmaktadır (Şekil 7).

E. coli



Şekil 7: *E.coli* FastDigest XbaI PFGE profili, 2006-2008 [1-30]

Yapılan tüm çalışmalardan sonra bütün verileri biraraya getirme aşamasında anlamlı sonuçlarla bağdaştırabilmek için hastaların klinik dosyalarından epidemiyolojik verilerine ulaşıldı. Farklı zamanlarda hastanemize başvuran hastaların tümü Ankara’da istikamet etmekteydi. Çalışmamızda incelenen 2006, 2007 ve 2008 yıllarına ait 30 izolatin epidemiyolojik bilgileri, antimikrobiyal duyarlılık paternleri ve PFGE tipleri ile ilgili bilgilerin ortak paydada bulunduğu bir veri tablosu elde edildi.(Tablo 10)

Tablo 10: *E.coli* suşlarının PFGE ve antibiyotik direnç profillerinin karşılaştırılması

İzolasyon Tarihi	Yeri	İzolot No	ADP	PFGE Tipi
Ank., Ekim, 2006		1	RI	III
Ank., Ekim, 2006		2	RI	I
Ank., Kasım, 2006		3	RII	II
Ank., Aralık, 2006		4	RIII	II
Ank., Şubat, 2006		5	RI	*
Ank., Mart, 2006		6	RI	I
Ank., Mayıs, 2006		7	RI	V
Ank., Haziran, 2006		8	RI	II
Ank., Temmuz,2006		9	RI	IV
Ank., Temmuz,2006		10	RII	IV
Ank., Eylül, 2007		11	RIV	III
Ank., Eylül, 2007		12	RIII	II
Ank., Ekim, 2007		13	RI	II
Ank., Aralık, 2007		14	RII	III
Ank., Aralık, 2007		15	RII	IV
Ank., Ocak, 2007		16	RIII	IV
Ank., Ocak, 2007		17	RI	IV
Ank., Ocak, 2007		18	RII	V
Ank., Nisan, 2007		19	RII	V
Ank., Ağustos, 2007		20	RI	IV
Ank., Ekim, 2008		21	RI	IV
Ank., Ekim, 2008		22	RII	II
Ank., Kasım, 2008		23	RIII	III
Ank., Aralık, 2008		24	RIV	II
Ank., Mart, 2008		25	RI	III
Ank., Mart, 2008		26	RI	III
Ank., Mayıs, 2008		27	RIII	IV
Ank., Haziran, 2008		28	RII	IV
Ank., Temmuz,2008		29	RIII	V
Ank., Temmuz 2008		30	RIV	*

* PFGE profili gruplandırmaya alınmayan suşlar

E.coli suşlarının genotipik araştırılmasında elde edilen 5 PFGE profil grubu içinde en sık görülenler grup 4 (10 suş) ve grup 2 (7 suş) idi. Grup I'de yer alan 2 suş RI direncine sahip olup SXT, OFX ve AMP direnci mevcuttu. Grup II'de yer alan küme oluşturan iki identik suş aynı ADP'ni (RI) göstermektedir ayrıca RII (beta laktam inhibitör) ve RIII (aminoglikozid) direncine sahip ikişer suş ile RIV direncine sahip bir suş bulunmaktadır. Grup III'de yer alan 3 suş aynı ADP'ni göstermektedir (RI). Ayrıca RII, RIII ve RIV direncine sahip birer suş bulunmaktadır. Grup IV'de yer alan 10 suştan 4'ü RI direncine sahip iken, yine aynı ADP'ne

sahip olan 3 adet RII direncine sahip suş ve 3 adet RIII direncine sahip suş bulunmaktadır. Grup V'de bulunan 3 suştan biri RI direncine sahip iken diğer 2 suş RII direncine sahiptir. Ortak PFGE paternlerine sahip 5 grup haricinde bulunan 2 ayrı suş ise RI ve RIV direncine sahiptir.

V. TARTIŞMA

ÜSE, hastane ve toplum kökenli infeksiyonlar içerisinde ilk sıralarda yer almaktadır. ÜSE'nin en sık etkeni *E. coli*'dir.(17,23) ÜSE tüm yaşlarda görülebilen, çocukluk döneminde takibinin yapılmadığında veya tedavinin yetersiz kaldığı zaman böbrek hasarı oluşturma ihtimali yüksek olan bir infeksiyondur. Okul öncesi çocuklarda ÜSE sıklıkla ciddi konjenital anomali ile ilişkilidir. Bu çalışmadaki *E.coli* suşlarının % 20'si 0-18 yaş grubu ÜSE olan hastalara aittir.

Hastanın cinsiyeti üriner sistem infeksiyonuna yatkınlığı etkileyebilir. Genel bilgi olarak üriner sistem infeksiyonu kadınlarda daha sık görülür.(29,32,36) Corinne K. ve ark.(23), her iki kadından birinin hayatlarının bir döneminde mutlaka idrar yolu enfeksiyonu geçirdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da 30 *E.coli* suşunun 18'i (% 60) kadın hastalara ait idrar örneğinden elde edilmiştir. ÜSE kadınların ortak bir klinik sendromu haline gelmiştir. Yaklaşık olarak her üç kadından biri ÜSE tedavisi almıştır ve her iki kadından biri mutlaka ömründe bir kez ÜSE geçirmiştir.(69,70) Bizim çalışmamızda idrar örneklerinden elde edilen *E.coli* izolatlarının % 60'ı kadınlara, % 40'ı erkeklere aittir. Bizim datamız dünyanın çeşitli yerlerindeki çalışmalarla uyumaktadır ki ÜSE'ler kadınlarda daha sık gelişmektedir. Kadınlarda anatomik ve fiziksel faktörlere bağlı olarak ÜSE daha sık gelişmesine rağmen erkek hastalarda antibiyotik direnci daha yüksek oranlarda gelişmektedir.(177,186)

ÜSE, hospitalize hastalar arasında da yaygın görülen enfeksiyonlardandır. (10,38) Uzun dönem hastanede bakımı yapılan hastaların bağışıklık sistemi baskılanmış, *E.coli* infeksiyonlarına açık hale gelmiştir. Bu çalışmada yer alan 30 *E.coli* suşunun 9'u (% 30) yatan hasta örneklerinden izole edilmiştir. Literatürle karşılaştırıldığında hastane ortamının *E.coli*'ye bağlı ÜSE gelişimine olan katkısının yakın oranlarda olduğu görülmüştür.(53,56,63) Hastane ortamında *E.coli*'ye bağlı ÜSE gelişme sebepleri arasında, hastanın predispozan faktörlere sahip olmasının yanısıra, hastanede kalış süresiyle, hastaya uygulanan kateterizasyon ve invaziv girişimlerle, infeksiyon kontrol programlarının başarı durumuyla ilişkilendirilebilir.(38,56,63)

İncelenen *E.coli* suşları; sırasıyla kadın hastalıkları ve doğum (%44), pediatri (%20), üroloji (%16), dahiliye (%13) ve genel cerrahi (%7) kliniklerine başvuran hastalardan izole edildi. Kadın doğum kliniğine başvuran hastalarda *E.coli*'nin sebep olduğu ÜSE'nun diğer

klonlara oranla daha yüksek oluğu, kadın üretrasının kısa ve anüsün hemen proksimaline yerleşmiş olması sebebiyle mikroorganizma (sıklıkla *E.coli*) kontaminasyonunun artmasından kaynaklanmaktadır.(29,32,36)

Bu çalışmada 2006-2008 yıllarında Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ulaşan idrar örneklerinden izole edilmiş olan *E.coli* suşlarının fenotipik olarak antibiyotik duyarlılık paternlerinin belirlenmesi ve genotipik olarak PFGE yöntemiyle tiplendirilmesi amaçlandı. Elde edilen sonuçlarla *E.coli* kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde en uygun antibiyotiği kullanmakta yön verebilecek *E.coli*'nin antibiyotik duyarlılık paternini elde etmek bunun yanında PFGE analizi ile izolatlar arasında muhtemel klonal ilişkiyi ortaya koyarak ortak bant profiline sahip suşların antibiyotik duyarlılıklarında da benzerlik olup olmadığı araştırıldı. Antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları hastanemiz laboratuvarında gerçekleştirilen araştırmanın moleküler kısmı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı'na bağlı olan Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Bu laboratuvar enfeksiyon endemik, epidemik, pandemik enfeksiyonların araştırılmasında gerek yurtiçi gerek uluslararası platformda epidemiyolojik veri tabanına önemli derecede katkı sağlamakta olan bir referans laboratuvarı konumundadır. Çalışmamızda 2006, 2007 ve 2008 yıllarına ait 10'ar adet olmak üzere toplam 30 adet *E.coli* suşu fenotipik ve genotipik olarak incelenerek birbiriyle kıyaslandırılması yapıldı. İzolatlar 21 farklı antibiyotiğe duyarlılıkları açısından değerlendirildi. İzolatların antibiyotik duyarlılık tablolarına göre dört farklı antimikrobiyal direnç paterni elde edildi. XbaI enzimiyle gerçekleştirilen restriksiyon işlemi sonunda yapılan PFGE analizi sonucunda 5 major PFGE profili elde edildi.

ÜSE tedavisinde amaçlanan; tedaviye hızlı, etkili cevap alabilmek ve tedavi edilen hastalarda rekürrensi önleyebilmenin yanısıra enfeksiyon etkeninin antibiyotiğe karşı geliştireceği direnci kontrol altında tutmaktır.(19,20,32) Antimikrobiyal direncinin ortaya çıkmasında birçok faktör rol alsada en önemli pay, antibiyotiklerin uygunsuz ve yaygın biçimde kullanılmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.(62,65) ÜSE tedavisinde kullanılacak antibakteriyel ajanın idrarda yüksek konsantrasyona ulaşabilmesi klinik başarı için gereklidir.(66,68,70) Sürveyans çalışmalarıyla elde edilen rezistans paternine dair bilgiler ışığında ciddi enfeksiyonların tedavisine dair empirik tedavi planı daha kolay geliştirilebilir. *E.coli*'ye bağlı ÜSE tedavisinde; aminoglikozidlerle birlikte veya tek başına B-laktam antibiyotikler ve kinolonlar invitro duyarlılık test sonuçları dikkate alınarak

kullanılır.(165,166,167,168) Bu çalışmada disk difüzyon yöntemiyle yapılan duyarlılık testi ile, *E.coli* suşlarının tamamının ESBL direnci mevcut olup doğal olarak sefalosporinlerin çoğuna direnç göstermekteydiler, bunun yanında en çok direnç gösterdiği antibiyotiklerin ofloksasin (% 78) ve trimetoprim-sulfometoksazol (% 67) olduğu saptanmıştır.

Antibiyotiklere direnç tüm dünyayı ilgilendiren bir problemdir. Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesindeki duraklama; elimizdeki seçenekleri en az, en etkili nasıl kullanmamız gerektiğine dair stratejilerimizi oluşturmayı zorunlu kılmaktadır. Predispozan faktörleri barındıran ve rekürren ÜSE olan hastalarda enfeksiyon atakları sırasında etkenin ortaya konması ve duyarlılığının belirlenmesi, hem tedavinin şekillenmesi açısından hem de aynı hasta grubunda yer alan hastalarda ÜSE tedavisine empirik yaklaşımın güncel tutulması açısından oldukça yararlıdır ancak ESBL'ye sahip *E.coli* suşları empirik tedavide kullanılan üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli oldukları için fluorokinolon veya aminoglikozid sınıfından bir antibiyotikle kombinasyonu düşünülebilir.(21,25,39) Hastane enfeksiyonlarından etkeni *E.coli* olarak belirlenen ÜSE'lu hastalarda üriner kateterizasyon oranlarının da yüksek bulunması, hem hastane personelinin hem de hasta ve hasta yakınlarının kateter bakımı ve kullanımı konusunda bilgilendirmesini gerekli kılmakta, hastanelerde enfeksiyon kontrol programlarının etkili biçimde uygulanmasını gerektirmektedir.(10,38,53)

Son 30 yıldır idrar yolu enfeksiyonunun empirik tedavisinde TMP-SXT ilk tercih edilen antibiyotiklerden biri olmuştur. *E.coli*'nin TMP-SXT direnci son yıllarda iyice artarak dünyanın bazı bölgelerinde % 65 gibi bir rakama ulaşmıştır. TMP-SXT direnci bazı gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde TMP-SXT'un unkomplike ÜSE'lerde sık kullanılmasına bağlıdır. Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Sosyetesini (IDSA) % 20'nin altında unkomplike sistit vakası görülen bölgelerde TMP-SXT'u empirik tedavide ilk ajan olarak belirlemiştir, diğer taraftan klinisyenler siprofloksasin, nitrofurantoin ve fosfomisin gibi kinolonlarla alternatif tedavi yapmaktadır. Nisel Yılmaz ve ark.'nın(216) yaptığı bir çalışmada İzmir'deki bir hastanede idrar yolu enfeksiyonuyla gelen hastalardan üretilen *E.coli* suşlarında % 49.7 oranında TMP-SXT direnci gelişmiştir, bizim çalışmamızda ise bu oran ortalama % 67.6'dır. *E.coli*'nin TMP-SXT direnci ülkemizdeki temel sorunlardan biridir. Bizim çalışmamızdaki TMP-SXT direnci oranı USA (% 22.6), Kanada (% 17.3) ve Avrupa (% 4.9–26.7)'daki oranlardan yüksek bulunmuştur, aksine Madagaskar (% 69.5), Hindistan(%76) ve Senegal(%67.8)'daki oranlardan daha düşüktür.(169,170,171,174,176) Sonuç olarak TMP-

SXT ÜSE'nin ampirik tedavisinde antibiyotik duyarlılık sonuçları dikkate alınmadan kullanılabilir ajanlardan biri değildir.

SXT direncinin artması terapötik hatalara ve aşırı kullanıma bağlıdır. Son yıllarda ÜSE tedavisinde kinolonlar daha sık tercih edilmektedir, bu da kinolona dirençli *E.coli* enfeksiyonlarının artmasına ve tedavinin zorlaşmasına yol açmıştır.(17,18) Karaca ve ark.(181) Türkiye'de son yıllarda ÜSYE tedavisinde, azalan TMP-SXT ve artan kinolon kullanımına bağlı olarak TMP-SXT direncinin azalıp kinolon direncinin arttığını bildirmişlerdir. Avrupa'nın bazı bölgelerinde İspanya ve Portekiz'de ve de Amerika'da *E.coli*'nin kinolon direncinde azalma bildirilmiştir. Bu oran İtalya'da % 19, Hindistan'da % 69, Brezilya'da % 89 civarındadır.(69,70) Sonuç olarak kinolon direnci dünya çapında artmaktadır. Bizim çalışmamızda da % 78,3 gibi yüksek bir oranla kinolon direnci saptanmıştır. Bazı otörler kinolon direncinin gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir, bunu da nalidiksik asit gibi zayıf etkili kinolonların kullanımına ve ya düşük dozda kinolon tedavisine bağlamaktadır ki bu da mutasyon gelişimine yol açmaktadır.(177,186) Arslan ve ark.(17) son yıllarda 50 yaşın üstünde yılda birden fazla CIP kullanımının CIP resistansına ve nüks eden komplike ÜSE gelişmesine yol açtığını bildirmişlerdir. Ülkemizde son yıllarda artan kinolon direnci, yüksek TMP-SXT direncinden dolayı tedavide aşırı kinolon kullanımına bağlı olabilir. Buna bağlı olarak kinolonların tedavide dikkatli kullanılması, diğer antibiyotiklerin duyarlılık testleri olumsuzsa alternatif olarak düşünülmesi gerekir.

Antibiyotik direnci Türkiye'de büyük bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Sık kullanılan antibiyotiklere karşı direnç her geçen gün artmaktadır. Bu sorun birçok faktörden kaynaklanmaktadır. Son on yılda antibiyotikler halk tarafından aşırı tüketilmiştir, bu da ilaç piyasasının dünya çapında gelişip her antibiyotiğe kolay, ucuz ve reçetesiz bir şekilde ulaşılabilmesine bağlıdır. Aşırı antibiyotik tüketimine bağlı antibiyotik direnci yeterince kanıtlanmış olmasının yanısıra yetersiz antibiyotik kullanımına bağlı direnç gelişimiyle ilgili yayınlar da bulunmaktadır. Kahlmeter ve ark.(73) antibiyotik direncinin bilindiği gibi sadece aşırı tüketime bağlı gelişmediğini yetersiz kullanımdan da kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Aminoglikozidler ÜSE'ye yol açan bakterilere karşı etkili olmalarına rağmen ayakta hastalarda nadiren tercih edilmektedirler. Türkiye'de üst idrar yolu enfeksiyonlarında

ampisilin ve aminoglikozid kombinasyonu hala kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda amikasin direnci % 23, gentamisin direnci % 36,3 oranında saptanmıştır.

Ülkemizde son yıllarda sefuroksim ve sefiksim gibi antibiyotikler ÜSE’de tercih edilen antibiyotikler durumundadır. Beta-laktam ajanlar bakteriüri eradikasyonunda zayıf etkili olup rekürrensine artmasına yol açmaktadırlar. Bizim çalışmamızda bütün *E.coli* suşlarında ESBL tespit edilmiş olup ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinlere karşı bütün suşlar dirençliydi. Toplumda son yıllarda ESBL sıklığı gittikçe artmaktadır ve risk faktörleri çoktan tanımlanmıştır: Hospitalizasyon, önceki bakteriyel enfeksiyon, üriner anomaliler, daha önce kullanılan antibiyotikler (özellikle kinolonlar, sefuroksim ve üçüncü kuşak sefalosporinler), tekrarlayan ÜSE’ler, yüksek seviyeli multidrug resistansı ve yaşlı erkek olmak sayılabilir. Nisel Yılmaz ve ark.’nın(216) İzmir’de yaptığı bir çalışmada idrar örneklerinden izole edilen *E.coli* suşlarında % 20,2 oranında ESBL tespit edilmiştir. Yine İzmir’de yapılan başka bir çalışmada % 21 oranında ESBL tespit edilmiştir. Arslan ve ark.(17) idrar örneklerinden elde edilen *E.coli* izolatlarında % 5 oranında ESBL tespit ettiklerini bildirmişlerdir ve siprofloksasin tedavisi alan grupta almayan gruba göre 2 kat fazla ESBL oranı tespit etmişlerdir.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de özellikle ESBL salgılayan enterobacteriaceae üyelerinin etken olduğu enfeksiyonlar artış göstermektedir. ESBL’ler hemen hemen tüm enterik bakterilerde tanımlanmış olmasına rağmen sıklıkla *E.coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde bulunmaktadır. Ülkemizden Akçam ve ark.’nın (81) yaptığı ESBL üretimini çift disk sinerji testi (ÇDST) yöntemi ile araştırdıkları çalışmalarında *E.coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında ESBL varlığı sırasıyla % 7.2 ve % 35 iken *Proteus spp.*’lerde ise ESBL tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Aktaş ve ark.’nın(217) ESBL üretimini ÇDST yöntemi ile araştırdıkları çalışmalarında, çalışmaya alınan 52 *E.coli* suşunda % 19.2 , 12 *Klebsiella pneumoniae* suşunda % 58.3 oranında ESBL pozitifliği olup, 6 *Proteus* kökeninde ise ESBL bulunmadığını bildirmişlerdir. Şahin ve ark.(218) ise aynı yöntem ile çalışmalarına aldıkları 108 *E.coli*, 44 *Klebsiella spp.* ve 22 *Proteus spp.*’de sırasıyla % 19.4, % 15.9, % 13.6 oranlarında ESBL pozitifliği saptamışlardır. Yurt dışında yapılan çeşitli çalışmalarda da ESBL sıklığı, *E.coli* kökenlerinde % 11.0 ile % 63.6 , *Klebsiella* kökenlerinde ise % 13.0 ile % 86.6 arasında rapor edilmiştir.(219,220,221) Gerek ülkemizde gerekse yurtdışındaki ESBL oranlarında görülen farklılıklar, bakterilerdeki enzim üretim sıklığının belli şartlarla değişiyor olması ile ilgilidir. Enzim üretimindeki artışın geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotik

kullanımıyla yakın ilişkili ve beta-laktam direncindeki artışla paralel olduğu bilinmektedir. Özkan ve ark.(222) *E.coli*'lerde seftriakson, seftazidim ve sefotaksim gibi 3. Kuşak sefalosporinlere % 80-85 oranında duyarlılık saptarken, *K.pneumoniae* suşlarında % 60-63 oranında duyarlılık saptamışlardır. Bizim çalışmamızdaki *E.coli* kökenlerinde görülen üçüncü kuşak direnci de bu bakterilerdeki ESBL üretimi ile orantılıdır.

PFGE-CHEF analiz yöntemi kedilerden, besinlerden, çevresel kaynaklardan, insan salgınlarından ve sporadik vakalardan elde edilen *E.coli* suşlarının epidemiyolojik araştırmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.(26,30,35) PFGE'de enzimsel DNA kesimi amacıyla kullanılan XbaI enzimi *E.coli* salgınlarının araştırılmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır ve *E.coli* salgınlarının araştırılmasında en sık kullanılan restriksiyon enzimlerinden biridir.(58,61,136) Bizim çalışmamızda da *E.coli* izolatlarının ayırımında başarıyla uygulanmıştır, elde edilen bant profilinde bazı ortak suşlar elde edilmekle beraber genel olarak suşların birbiriyle ilişkisiz olduğu belirlenmiştir. 2006-2007-2008 yıllarına ait 30 adet *E.coli* suşunun antibiyotik direnç profilleri benzer olmasına karşın PFGE bant profilleri oldukça farklıdır. PFGE-CHEF analizi epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatları da açıklayabilmektedir. Arbeit ve ark.(58) multilokus enzim elektroforezi ve rRNA operonlarıyla bağlantılı restriksiyon polimorfizm yöntemleriyle ayırt edilemeyen epidemiyolojik olarak ilişkisiz fakat evrimsel olarak ilişkili izolatların PFGE ile analiz edilebileceğini belirtmişlerdir. Smith ve ark.(223) bir grup *E.coli* suşunun PFGE ve Floresan Amplified Fragment Length Polimorfizm (FAFLP) yöntemiyle genotipik araştırmasını yapmışlar ve PFGE'nin FAFLP'ye göre daha fazla ayırım gücünün olduğunu belirtmişlerdir. Bu farklılık genomdaki mutasyonlarla ve rearanjmanlarla sonuçlanan " klonal turnover " olarak açıklanabilir, ve ya plasmidde değişiklikten ziyade plasmid kaybı ve ya kazanımı şeklinde açıklanabilir. Osawa ve ark.(224) *E.coli* O157-H7 suşlarının araştırılmasında PFGE analizini kullanarak, konak genomuyla birleşerek değişikliğe uğrayan faj genomunun Stx-2 dönüştürücü faj DNA'sında dikkate değer bir varyasyon olduğunu belirtmişlerdir, bununla beraber PFGE-CHEF analizinin bakteriyel genomdaki minör değişiklikleri bile saptayabilme şansının olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda PFGE-CHEF sistemi kullanılarak yapılan *E.coli* suşlarının analizinde Tenover ve ark.'nın(27,74,124,149) standart kriterleri esas alınmıştır. Tenover kriterlerine göre izolatların restriksiyon paternleri aynı bant sayısına sahipse ve karşılıklı bantlar aynı boyuttaysa bu izolatlar aynı suştur. Bizim çalışmamızdaki 30 suş içerisinde küme oluşturan 4

suş aynı bant profiline sahip olup epidemiyolojik olarak aynı suş olabilirler, bu suşların epidemiyolojik olarak incelendiğinde aynı bölgeden hastanemize başvurdukları tespit edilmiştir, bununla birlikte direnç profilleri karşılaştırıldığında bir benzerliğe rastlanmamıştır. XbaI kesim profillerine göre çalışmamızdaki 30 suş içerisinde 22 suşun epidemiyolojik olarak ilişkisiz olduğunu söylemek mümkündür.

Değişik ülkelerde ve merkezlerde yapılan çalışmalar beta-laktam antibiyotiklere direncin artmakta olduğunu ve bunun dünya çapında bir sorun olduğunu göstermektedir. Son on yılda plasmidle kodlanan ESBL'ler çok hızlı bir şekilde artmıştır.(21,25,39) Halen bu suşların çoğu betalaktamaz inhibitörlü kombinasyonlarla tedavi edilebilmektedir. Ancak bu kombinasyonlarla tedavi edilmeyen suşların sayısı da giderek artmaktadır.(52,53,54) Ayrıca ESBL üreten suşlar değişik mekanizmalarla diğer antibiyotik sınıflarına da gittikçe artan oranda direnç geliştirmekte olup, eğer önlem alınmazsa gelecekteki antibiyotik seçeneklerimizin son derece kısıtlanacağı öngörülmektedir. Hastanemizde özellikle *E.coli* kökenleri başta olmak üzere yüksek ESBL üretimi ve geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı azalan duyarlılık söz konusudur. Geniş bir endikasyona sahip olan bu grup antibiyotiklerle ampirik tedavi tercih edildiğinde tedavi başarısızlıkları görülebilir. Problem halen sadece *E.coli* ve *Klebsiella* ile oluşan enfeksiyonlar için görülmektedir. Ancak direnç özelliklerinin farklı tür bakteriler arasında da yayılabildiği bilinmekte olup önümüzdeki yıllarda hastanemizde farklı bakterilerde de dirençle karşılaşılabilir.

Sonuç olarak antibiyotik direnci artış hızını azaltabilmek adına, her zaman üzerinde durulan fakat her zaman yeterli derecede uygulanamayan rasyonel antibiyotik kullanımı için ısrarcı olunması gerekir. Ampirik antibiyotik tedavisi seçimi sırasında bakteriyel organizmanın lokal prevalansı ve antibiyotik duyarlılığı göz önünde bulundurulması gerekir. Hastanemize başvuran hastaların idrar örneklerinden izole edilen *E.coli* suşlarında yüksek ofloksasin, trimetoprim-sulfometoksazol ve ampisilin direncine rastlanmıştır. Bu antibiyotiklerin aşırı kullanımı bakteride direnç gelişimine sebep olmuş olabilir.

E.coli suşlarının antibiyotik direnç paterni hakkında daha ayrıntılı bilgi elde etmek adına günümüzde yapılan moleküler çalışmalardan biri de PFGE'dir. Bu çalışmada ESBL pozitif *E.coli* suşlarını genotipik olarak PFGE yöntemiyle inceleyerek antibiyotik dirençlerinin benzerlikleri hakkında bilgi edinmek amaçlandı, anlamlı verilere ulaşılamamakla birlikte önümüzdeki yıllarda bu gibi çalışmaları artırmayı hedeflemekteyiz.

Direnç artışı ÜSE tedavisinde birinci ve ikincil tedavi planlarının tekrar gözden geçirilmesinin gerekliliğini göstermektedir. Klinisyenlerin antibiyotik reçete ederken daha dikkatli ve titiz davranmaları tedaviyi kolaylaştıracaktır bu da tedaviye karar vermeden önce idrar örneklerinden elde edilen izolatların kültür ve antibiyotik duyarlılık çalışmalarının rutin olarak yapılmasını gerekli kılar.

VI. ÖZET

Antibiyotik direnci gerek toplum gerekse hastane kökenli infeksiyonların tedavisinde başarısızlığa yol açmakta ve giderek büyüyen bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Yeni antibakteriyel ilaçların klinik tedavide uygulanması bu ilaçlara karşı dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması ile sonlanmaktadır. Beta laktam antibiyotiklerin çok sık kullanılmaları tüm dünyada beta laktam antibiyotiklere karşı gelisen direncin giderek artmasına ve etkilerinin azalmasına neden olmuştur. Bakterilerin antimikrobiyal ilaçlara karşı geliştirdikleri direnç mekanizmalarından en sık görülenlerinden biri sentezledikleri enzimlerle ilacın inaktive edilmesidir. Beta laktam grubu antibiyotikleri hidroliz eden beta laktamaz enzimleri bu tip dirence en iyi örnektir.

Bu çalışmada 2006 - 2008 yıllarında Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ulaşan idrar örneklerinden izole edilmiş olan ESBL pozitif *E.coli* suşlarının fenotipik olarak antibiyotik duyarlılık paternlerinin belirlenmesi ve genotipik olarak PFGE yöntemiyle tiplendirilmesi amaçlandı. Elde edilen sonuçlarla *E.coli* kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde en uygun antibiyotiği kullanmakta yön verebilecek *E.coli*'nin antibiyotik duyarlılık paternini elde etmek bunun yanında PFGE analizi ile izolatlar arasında muhtemel klonal ilişkiyi ortaya koyarak ortak bant profiline sahip suşların antibiyotik duyarlılıklarında da benzerlik olup olmadığı araştırıldı. Antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları hastanemiz laboratuvarında gerçekleştirilen araştırmanın moleküler kısmı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı'na bağlı olan Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.

Çalışmamızda 2006, 2007 ve 2008 yıllarına ait 10'ar adet olmak üzere toplam 30 adet *E.coli* suşu fenotipik ve genotipik olarak incelenerek birbiriyle karşılaştırılması yapıldı. İzolatlar 21 farklı antibiyotiğe duyarlılıkları açısından değerlendirildi. İzolatların antibiyotik duyarlılık tablolarına göre dört farklı antimikrobiyal direnç paterni elde edildi. XbaI enzimiyle gerçekleştirilen restriksiyon işlemi sonunda yapılan PFGE analizi sonucunda 5 major PFGE profili elde edildi. Suşların antibiyotik direnç profillerinde benzerlikler olmasına karşın PFGE bant profilleri oldukça farklıydı.

Hastanemizde özellikle *E.coli* kökenleri başta olmak üzere yüksek ESBL üretimi ve geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı azalan duyarlılık söz konusudur. Geniş bir endikasyona sahip olan bu grup antibiyotiklerle ampirik tedavi tercih edildiğinde tedavi başarısızlıkları

görülebilmektedir. Problem halen sadece *E.coli* ve Klebsiella ile oluşan enfeksiyonlar için görülmektedir. Ancak direnç özelliklerinin farklı tür bakteriler arasında da yayılabildiği bilinmekte olup önümüzdeki yıllarda hastanemizde farklı bakterilerde de dirençle karşılaşılabilir.

Anahtar kelimeler: *E.coli*, antimikrobial direnç, moleküler subtipendirme, Pulse field jel elektroforezi (PFGE)

VII. SUMMARY

Antibiotic resistance in both hospital and community acquired infections lead to treatment failure and appears to be a growing problem. Implementation of new antibacterial drugs in clinical treatment ends with the emergence of resistant organisms against these drugs. Frequently used of beta-lactam antibiotics leads to an increase in resistance to them and decrease in the effects of betalaktam antibiotics. Bacteria have developed resistance mechanisms against antimicrobial drugs and one of the most common mechanism is inactivating drug with enzymes. Hydrolysis of beta-lactam antibiotics with beta-lactamase enzymes is the best example for this type.

In this study, *E. coli* strains isolated from urine samples reached to Fatih University Medical Faculty Hospital Microbiology Lab between the years 2006-2008 were studied as a phenotypic and genotypic determination of antibiotic susceptibility patterns and PFGE typing method was aimed. The results of antibiograms giving way to the most appropriate antibiotic use for the empirical treatment of *E. coli* caused urinary tract infections and PFGE analysis revealed probable clonal relationship of putting the common band profile with antibiotic susceptibility was investigated. Antimicrobial susceptibility studies performed in our hospital laboratory on the other hand part of the molecular research was carried out in Refik Saydam Hygiene Center under the Department of Molecular Microbiology Research Lab.

In our study 10 strains of the years 2006,2007 and 2008 were studied and totally 30 strains of *E. coli* were examined with each other as a comparison of phenotypic and genotypic structure. Isolates were evaluated for 21 different antibiotic susceptibilities. According to the table of antibiotic susceptibility of isolates there were obtained four different antimicrobial resistance pattern. At the end of the process of restriction enzyme XbaI PFGE analysis revealed that in five major PFGE profile was obtained. Despite similarities in PFGE band profiles of the strains, antibiotic resistance profiles were quite different.

In our hospital, especially the origins of *E. coli*, growing production of ESBL and reduced susceptibility to broad-spectrum cephalosporins were questioned. Treatment failures can be seen when empirical treatment with this group of antibiotics with a wide range of indication. The problem is still seen only for infections caused by *E. coli* and *Klebsiella*. However the spread of resistance among bacteria in different types of properties can lead to different resistance patterns occurring in our hospital in the coming years.

Keywords : *E.coli*, antimicrobial resistance, molecular subtyping, Pulse field gel electrophoresis(PFGE)

VIII. KAYNAKLAR

1. Guyton AC, Hall JE: Textbook Of Medical Physiology 2007, s: 315-329, 11. baskı. Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul
2. Bilgehan H: Klinik Mikrobiyolojik Tanı 2004, s: 375-384, 4. baskı.
3. Mahon RC, Lehman CD, Manuselis G: Textbook of Diagnostic Microbiology 2007, s:1010-1030, 3. baskı. Saunders Elsevier, UK
4. Forbes AB, Sahm FD, Weissfeld AS: Bailey& Scott's Diagnostic Microbiology, 2007 s: 842-855. 12.baskı, Mosby Elsevier, UK.
5. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 2006.s:82-86. 6. baskı, Lippincott Williams & Wilkins, UK
6. Mandell LG, Bennett JE, Dolin R: Principles and Practice of Infectious Diseases, 2005, cilt:1, s: 875-905, 6. baskı. Elsevier Churchill Livingstone, UK.
7. Topçu Wilke A, Söyletir G, Do_anay M: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi 2002, cilt 1, s: 1059-1064, 3. baskı. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul.
8. Pullukçu H, Işıkgöz Taşbakan M, Aydemir , Sipahi OR, Turhan A, Özinel MA, Ulusoy S: İdrar kültürlerinden soyutlanan bakteriler ve çeşitli antibiyotiklere invitro duyarlılıklarının değerlendirilmesi. ANKEM Dergisi. 2006; 20 (1): 26-30
9. Tanyel E, Taşdelen Figen N , Tülek N, Leblebicioğlu H: Yaşlı hastalardaki üriner sistem infeksiyonlarının değerlendirilmesi. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection). 2006; 20 (2): 87-91.
10. Wagenlehner FME, Weidner W, Naber KG: Emergence of antibiotic resistance amongst hospital-acquired urinary tract infections and pharmacokinetic/pharmacodynamic considerations Journal of Hospital Infection 2005; 60: 191-200.
11. Shigemura K, Tanaka K, Okada H, Nakano Y, Kinoshita S, Gotoh A, Arakawa S, Fujisawa M.: Pathogen occurrence and antimicrobial susceptibility of urinary tract infection cases during a 20-Year Period (1983-2002) at a Single Institution in Japan. Jpn. Journal of Infection Disease 2005; 58: 303-308
12. Isenberg HD: Clinical Microbiology Procedures Handbook 2005, cilt 1,2. 2. baskı. ASM Press Washington D.C.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2005 Document M100-S15.
14. Dağlar D, Demirbakan H, Yıldırım Ç, Öztürk F, Özcan A, Sipen N, Ögünç D, Çolak D: İdrar örneklerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2005; 35: 189-194
15. Gazi H, Sürücüoğlu S, Kurutepe S: İdrar kültürlerinden izole edilen gram negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç. ANKEM Dergisi 2007; 21(1): 19-22.
16. *E.coli*2008 August ; 85(1): 11–19. Travis J. Wiles, Richard R. Kulesus, and Matthew A. Mulvey, Division of Cell Biology and Immunology, Pathology Department, University of Utah, Salt Lake City,Utah 84112-0565, USA
17. Arslan H, Azap Ö, Ergönül Ö, Timurkaynak F, and Urinary Tract Infection Study Group Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community acquired urinary tract infections in Turkey. Antimicrobial J Chemother 2005 56(5):914-918.
18. Blondeau JM. Current issues in the management of urinary tract infections: extended-release ciprofloxacin as a novel treatment option. Drugs 2004; 64: 611-28.
19. Gupta K, Hooton T M. Duration of Therapy for Urinary Tract Infection: The Long and the Short of It. Clinical Infectious Diseases 2004; 39: 665–6.

20. Wagenlehner FME, Naber KG. Treatment of bacterial urinary tract infections: Presence and future. *Eur Urology* 2006;49: 235- 44.
21. Federico Perez, Andrea Endimiani, Kristine M. Hujer, and Robert A. Bonomo. The Continuing Challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol.* 2007 October ; 7(5): 459–469.
22. Samuel Kariuki, Gunturu Revathi, John Corkill, John Kiiru, Joyce Mwituria, Nazir Mirza, C. Anthony Hart. *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections resistant to fluoroquinolones and extended-spectrum beta-lactams. *J Infect Developing Countries* 2007; 1(3):257-262.
23. Corinne K. Garofalo, Thomas M. Hooton, Steven M. Martin, Walter E. Stamm, Joseph J. Palermo, Jeffrey I. Gordon, and Scott J. Hultgren. *Escherichia coli* from Urine of Female Patients with Urinary Tract Infections Is Competent for Intracellular Bacterial Community Formation. *Infection and Immunity*, Jan. 2007, p. 52–60
24. Angela Cornelius, Brent Gilpin, Carolyn Nicol. PFGE typing of human case and food isolates of *E. coli* O157:H7 in New Zealand final report. Institute of Environmental Science & Research Limited Christchurch Science Centre New Zealand November 2006
25. David L. Paterson and Robert A. Bonomo. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 2005, p. 657–686
26. Margaret A. Davis, Dale D. Hancock, Thomas E. Besser, and Douglas R. Call. Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a Tool for Determining the Degree of Genetic Relatedness between Strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Clinical Microbiology*, May 2003, p. 1843–1849 Vol. 41, No. 5
27. Esther-Maria Antão, Lothar H Wieler and Christa Ewers. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens* 2009, 1:22 doi:10.1186/1757-4749-1-22
28. Indira U. Mysorekar and Scott J. Hultgren. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. Washington University School of Medicine July 31, 2006
29. Jingping Xie, Betsy Foxman, Lixin Zhang, and Carl F. Marrs. Molecular Epidemiologic Identification of *Escherichia coli* Genes That Are Potentially Involved in Movement of the Organism from the Intestinal Tract to the Vagina and Bladder. *Journal of Clinical Microbiology*, July 2006, p. 2434–2441
30. Rıza Durmaz, Barış Otlu, Fatih Koksall, Salih Hosoglu, Recep Öztürk, Yasemin Ersoy, Elif Aktaş, Nafia Canan Gursoy and Ahmet Caliskan. The optimisation of a rapid pulsed field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 62, 372-377, 2009
31. Jean M. Bower, Danelle S. Eto and Matthew A. Mulvey. Covert Operations of Uropathogenic *Escherichia coli* within the Urinary Tract. Pathology Department, Division of Cell Biology and Immunology, University of Utah School of Medicine 2005
32. Susan a. Mehnert-Kay, M.D., Diagnosis and Management of Uncomplicated Urinary Tract Infections. *University of Oklahoma College of Medicine–Tulsa, Tulsa, Oklahoma.* 2005
33. Sheryl S. Justice, Chia Hung, Julie A. Theriot, Daniel A. Fletcher, Gregory G. Anderson, Matthew J. Footer, and Scott J. Hultgren. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. University of Connecticut Health Center, Farmington, CT, December 8, 2003
34. Walter e. Stamm, MD. Host-pathogen interactions in community acquired urinary tract infections. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, vol. 117, 2006
35. Karen Ejrnaes, Dorthe Sandvang, Bettina Lundgren, Sven Ferry, Stig Holm, Tor Monsen, Rolf Lundholm, and Niels Frimodt-Moller. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of *Escherichia coli* Strains from Samples Collected before and after Pivmecillinam or Placebo Treatment of Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection in Women. *Journal of Clinical Microbiology*, May 2006, p. 1776–1781
36. Eva Moreno, Antonia Andreu. Carles Pigrau, Michael A. Kuskowski, James R. Johnson, and Guillem Prats. Relationship between *Escherichia coli* Strains Causing Acute Cystitis in Women and the Fecal *E. coli* Population of the Host. *Journal of Clinical Microbiology*, Aug. 2008, p. 2529–2534

37. Travis J. Wiles, Richard R. Kulesus, and Matthew A. Mulvey. Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic *Escherichia Coli*. *Exp Mol Pathol*. 2008 August ; 85(1): 11–19.
38. S. M. Jacobsen, D. J. Stickler, H. L. T. Mobley, and M. E. Shirtliff,. Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 2008, p. 26–59
39. Ramphal R, Ambrose PG. Extended spektrum beta-lactamases and clinical outcomes: Current data. *Clin Inf Dis* 2006; 42: 164-72.
40. Kang C, Kim SH , Park WB, Lee KD, Kim C. Bloodstream infections due to extended spektrum beta-lactamases producing *E.coli* and *K.pneumoniae*: Risk factors for treatment outcome with special emphasis on antimicrobial. *Antimicrobial Agents Chemother* 2004; 48(12): 4574-81.
41. Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended spectrum betalactamases producing *E.coli* and *K.pneumoniae*. *Clin Inf Dis* 2001; 33: 1288-94.
42. Balkan İİ, Gençer S, Batirel A, Özer S. Florokinolonlara karşı direnç gelişimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörlerinin analizi. *Flora Derg* 2005; 10(2): 65-73.
43. Knothe E, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transfereble resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefomandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11: 315-7 .
44. Sirot D, Sirot J, Labia R, et al. Transfereble resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1,a novel beta lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20 :323-34.
45. Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, et al. Transfereble enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1987; 2: 302-6.
46. Quinn JP, Miyashiro D, Sahn D, Flamm R, Bush K. Novel plazmid-mediated betalactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1451-6.
47. Jacoby GA, Medeiros AA, O'Brien TF, Pinto ME, Jiang J. Broad-spectrum teansmisible beta-lactamases. *N Engl J Med* 1989; 33: 1451-6.
48. Lautenbach E, Patel BJ, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1162-71.
49. Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, et al. Risk factors for fluoroquinolone resistance in nosocomial *E.coli* and *K. pneumoniae* infections. *Arch Intern Med* 2002; 2469-77.
50. Tolun V, Küçükbasmacı Ö, Törümküney D, Çatal C, Anğ M. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended spectrum beta-lactamase-production in *E.coli* and *Klebsiella* strains. *Clin Microb Infect* 2004; 10(1): 72-5.
51. Peterson DL, Mülazımoğlu L, Casellas LM, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended spectrum beta-lactamase-production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing pneumoniae. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 473-8.
52. Zaoutis ET, Goyal M, Chu JH, et al. Risk factors for outcomes of bloodstream infection caused by extended spectrum beta-lactamase-producing *E.coli* and *Klebsiella* species in children. *Pediatrics* 2005; 115: 942-49.
53. Pena C, Gudiol C, Tubau F, et al. Risk factors for acquisition of extended spectrum beta-lactamase-producing *E.coli* among hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect* 2006;12: 279-84.
54. Kanafani ZA, Sibai AM, Araj GF, Kanan M, Kanj SS. Epidemiology and risk factors for extended spectrum beta-lactamase-producing organisms: A case control study at a tertiary care center in Lebanon. *Association for professionals in infection control and epidemiology* 2005: 326-32.
55. Kim KY, Pai H, Lee HJ, et al. Bloodstream infections by extended spectrum betalactamase-producing *E.coli* and *K.pneumoniae* in children: Epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2002: 1481-91.

56. Çetin BD, Gündüz A, Şensoy A, Korkmaz F, Seber E. Hastane infeksiyonu etkeni gram (-) çomaklarda GSBL üretimi ve antibiyotik duyarlılıkları. *İnfek Derg* 2002; 16(4):463-70.
57. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2233-9.
58. Arbeit RD, Arthur M, Dunn R, Kim C, Selander RK, Goldstein R. Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. *J Infect Dis* 1990;161(2):230-5.
59. Gardiner, K. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 63: 658-665, 1991.
60. Southern, E. M., Elder, J. K. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Edited by A. P. Monaco, Oxford, IRL Press, 1-119, 1995.
61. Levene, S. D. Methods in Molecular Biology, Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Eds. M. Burmeister and L. Ulanovsky, Totowa, NJ, The Humana Press, 345-365, 1992.
62. Bingen, E., M. Rangaraj, and C. Safran. 1994. Ribotyping differentiates relapse from reinfection in the treatment failures of *Escherichia coli* urinary tract infections in children. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 18:263–265.
63. Bouza, E., R. San Juan, P. Munoz, A. Voss, J. Kluytmans, et al. 2001. A European perspective on nosocomial urinary tract infections II. Report on incidence, clinical characteristics and outcome (ESGNI-004 study). *Clin. Microbiol. Infect.* 7:532–542.
64. Brauner, A., S. H. Jacobson, and I. Kuhn. 1992. Urinary *Escherichia coli* causing recurrent infections—a prospective follow-up of biochemical phenotypes. *Clin. Nephrol.* 38:318–323.
65. Edlund, C., and C. E. Nord. 2000. Effect on the human normal microflora of oral antibiotics for treatment of urinary tract infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 46(Suppl. 1):41–48.
66. Foxman, B. 1990. Recurring urinary tract infection: incidence and risk factors *Am. J. Public Health* 80:331–333.
67. Foxman, B., L. Zhang, P. Tallman, K. Palin, C. Rode, C. Bloch, B. Gillespie, and C. F. Marrs. 1995. Virulence characteristics of *Escherichia coli* causing first urinary tract infection predict risk of second infection. *J. Infect. Dis.* 172:1536–1541.
68. Hooton, T. M. 2001. Recurrent urinary tract infection in women. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17:259–268.
69. Hooton, T. M., D. Scholes, J. P. Hughes, C. Winter, P. L. Roberts, A. E. Stapleton, A. tract infection in young women. *N. Engl. J. Med.* 335:468–474.
70. Hooton, T. M., and W. E. Stamm. 1997. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 11:551–581
71. Hvidberg, H., C. Struve, K. A. Kroghfelt, N. Christensen, S. N. Rasmussen, and N. Frimodt-Moller. 2000. Development of a long-term ascending urinary tract infection mouse model for antibiotic treatment studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:156–163.
72. Justice, S. S., C. Hung, J. A. Theriot, D. A. Fletcher, G. G. Anderson, M. J. Footer, and S. J. Hultgren. 2004. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:1333–1338.
73. Kahlmeter, G. 2000. The ECO.SENS Project: a prospective, multinational, multicentre epidemiological survey of the prevalence and antimicrobial susceptibility of urinary tract pathogens report. *J. Antimicrob. Chemother.* 46(Suppl. 1):15–22.
74. Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233–2239.
75. Akova M., “Dikkat: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Var!”, *ANKEM Dergisi*, 18 (2):98-103 (2004).
76. Mumcuoğlu İ., Gündüz T., Baydur H., *Escherichia*, *Klebsiella* ve *Proteus* suşlarında genişlemiş 18(1):18-21 (2004).
77. Gülay Z., Yüce A., Yuluğ N., “*Klebsiella pneumoniae* ve *E.coli* suşlarında değişik beta laktamaz inhibitörleri kullanılarak genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin saptanması”, *ANKEM Dergisi*, 12:469 (1998).

78. Özkan C., Oldacay M., Erdem G., "Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olarak İzole Edilen *Escherichia coli* Ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Sıklığı", *ANKEM Dergisi*, 16(1): 65-68 (2002).
79. Hoşgör M., Özkan F., Yapar N., Tünger A., Özinel M.A., "Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Belirlenmesinde Çift Disk Sinerji Testi ile Üç Boyutlu Yöntemin Karşılaştırılması", *Klinik Dergisi*, 11(2): 59-60 (1998).
80. Geyik M.F., Kökoğlu Ö.F., Uçmak H., Çelen M.K., Hoşoğlu S., Ayaz C., "Hastane kaynaklı gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar", *İnfeksiyon Dergisi*, 16:175 (2002).
81. Akçam F. Z., Gönen İ., Kaya O., Yaylı G., "Hastane Enfeksiyonu Etkeni Çeşitli Gram-Negatif Bakterilerde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Yapımının iki Yöntemle Araştırılması", *Klinik*, 17 (1): 47-49 (2004).
82. Esen Ş., Eroğlu C., Sünbül M., Leblebicioğlu H., "*E.coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında TEM ve SHV türü beta-laktamaz sıklığı", *Mikrobiyol. Bült.*, 35:37-43 (2001).
83. Bermudes, H., C. Arpin, F. Jude, Z. El-Harrif, C. Be'be'ar, and C. Quentin. 1997. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteria in a French hospital. *Eur. J. Clin.Microbiol. Infect. Dis.* 16:523–529.
84. Blazquez, J., M.-I. Morosini, M.-C. Negri, and F. Baquero. 2000. Selection of naturally occurring extended-spectrum TEM B-lactamase variants by fluctuating B-lactam pressure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2182–2184 .
85. Bonnet, R., J. L. M. Sampaio, R. Labia, C. D. Champs, D. Sirot, C. Chanel, and J. Sirot. 2000. A novel CTX-M B-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.*44:1936–1942.
86. Bonomo, R. A., S. A. Rudin, and D. M. Shlaes. 1997. Tazobactam is a potent inactivator of selected inhibitor-resistant class A B-lactamases. *FEMS Microbiol.Lett.* 148:59–62.
87. Bradford, P. A., C. Urban, A. Jaiswal, N. Mariano, B. A. Rasmussen, S. J.Projan, J. J. Rahal, and K. Bush. 1995. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing B-lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:899–905.
88. Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for B-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211–1233.
89. Bush, K., and S. B. Singer. 1989. Biochemical characteristics of extended broad spectrum B-lactamases. *Infection* 17:429–433.
90. Casellas, J. M., and M. Goldberg. 1989. Incidence of strains producing extended-spectrum B-lactamase in Argentina. *Infection* 17:434–436.
91. Chaibi, E. B., D. Sirot, G. Paul, and R. Labia. 1999. Inhibitor-resistant TEM-B-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J.Antimicrob. Chemother.* 43:447–458.
92. Cormican, M. G., S. A. Marshall, and R. N. Jones. 1996. Detection of extended-spectrum B-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *J. Clin. Microbiol.* 34:1880–1884.
93. Coudron, P. E., E. S. Moland, and C. C. Sanders. 1997. Occurrence and detection of extended-spectrum B-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a Veterans Medical Center: seek and you may find. *J. Clin. Microbiol.* 35:2593–2597.
94. Courvalin, P. 1991. Genotypic approach to the study of bacterial resistance to antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1019–1023.
95. D'Agata, E., L. Venkataraman, P. DeGirolami, L. Weigel, M. Samore, and F. Tenover. 1998. The molecular and clinical epidemiology of enterobacteriaceae-producing extended-spectrum beta- lactamase in a tertiary care hospital.*J. Infect.* 36:279–285.
96. Datta, N., and P. Kontomichalou. 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R Factors in Enterobacteriaceae. *Nature* 208:239–244.
97. Emery, C. L., and L. A. Weymouth. 1997. Detection and clinical significance of extended-spectrum B-lactamases in a tertiary-care medical center.*J. Clin. Microbiol.* 35:2061–2067.

98. Fantin, B., B. Pangon, G. Potel, F. Caron, E. Valee, J.-M. Vallois, J. Mohler, A. Bure, A. Philippon, and C. Carbon. 1990. Activity of sulbactam in combination with ceftriaxone in vitro and in experimental endocarditis caused by *Escherichia coli* producing SHV-2-like B-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:581–586.
99. Gniadkowski, M., I. Schneider, R. Jungwirth, W. Hryniewicz, and A. Baurnefeind. 1998. Ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from three polish hospitals: identification of three novel TEM and SHV-5-type extended- spectrum B-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:514–520.
100. Gniadkowski, M., I. Schneider, A. Palucha, R. Jungwirth, B. Mikiewicz, and A. Bauernfeind. 1998. Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: Identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing B-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:827–832.
101. Henquell, C., C. Chanal, D. Sirot, R. Labia, and J. Sirot. 1995. Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor resistant TEM B-lactamases from clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:427–430.
102. Ho, P. L., K. H. Chow, K. Y. Yuen, W. S. Ng, and P. Y. Chau. 1998. Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum B-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 42:49–54.
103. Ho, P. L., D. N. C. Tsang, T. L. Que, M. Ho, and K. Y. Yuen. 2000. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum B-lactamases and their prevalence among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Hong Kong. *APMIS* 108:237–240.
104. Ishii, Y., A. Ohno, H. Taguchi, S. Imajo, M. Ishiguro, and H. Matsuzawa. 1995. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A B-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:2269–2275.
105. Jacoby, G. A., and P. Han. 1996. Detection of extended-spectrum B-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34:908–911.
106. Jacoby, G. A., and A. A. Medeiros. 1991. More extended-spectrum B-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1697–1704.
107. Katsanis, G. P., J. Spargo, M. J. Ferraro, L. Sutton, and G. A. Jacoby. 1994. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum B-lactamases. *J. Clin. Microbiol.* 32:691–696.
108. Lefon-Guibout, V., V. Speldooren, B. Heym, and M.-H. Nicolas-Chanoine. 2000. Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France: new genetic features of *bla*TEM genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2709–2714.
109. Liu, P. Y. F., D. Gur, L. M. C. Hall, and D. M. Livermore. 1992. Survey of the prevalence of B-lactamases amongst 1000 gram-negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 30:429–447.
110. Livermore, D. M. 1995. B-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:557–584.
111. Lucet, J.-C., D. Decré, A. Fichelle, M.-L. Joly-Guillou, M. Pernet, C. Deblangy, M.-J. Kosmann, and B. Re´gnier. 1999. Control of a prolonged outbreak of extended-spectrum B-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a university hospital. *Clin. Infect. Dis.* 20:1411–1418.
112. Mugnier, P., I. Casin, A. T. Bouthors, and E. Collatz. 1998. Novel OXA-10-derived extended-spectrum B-lactamases selected in vivo or in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:3113–3116.
113. Nordmann, P. 1998. Trends in B-lactam resistance among Enterobacteriaceae. *Clin. Infect. Dis.* 27:S100–S106.
114. Pai, H., S. Lyu, J. H. Lee, J. Kim, Y. Kwon, J.-W. Kim, and K. W. Choe. 1999. Survey of extended-spectrum B-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 37:1758–1763.
115. Paterson, D. L., and V. L. Yu. 1999. Extended-spectrum B-lactamases: a call for improved detection and control. *Clin. Infect. Dis.* 29:1419–1422.

116. Petrosino, J. G., and T. Palzkill. 1996. Systematic mutagenesis of the activesite omega loop of TEM-1 beta-lactamase. *J. Bacteriol.* 178:1821–1828.
117. Pitout, J. D. D., K. S. Thomson, N. D. Hanson, A. F. Ehrhardt, E. S. Moland, and C. C. Sanders. 1998. B-Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1350–1354.
118. Rasheed, J. K., C. Jay, B. Metchock, F. Berkowitz, L. Weigel, J. Crellin, C. Steward, B. Hill, A. A. Medeiros, and F. C. Tenover. 1997. Evolution of extended-spectrum B-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:647–653.
119. Rice, L. B. 1999. Successful interventions for gram-negative resistance to extended-spectrum B-lactam antibiotics. *Pharmacotherapy* 19:120S–128S.
120. Sanders, C. C., A. L. Barry, J. A. Washington, C. Shubert, E. S. Moland, M. M. Traczewski, C. Knapp, and R. Mulder. 1996. Detection of extended-spectrum B-lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* with the Vitek ESBL test. *J. Clin. Microbiol.* 34:2997–3001.
121. Sirot, D., C. Recule, E. B. Chaibi, L. Bret, J. Croize, C. Chanal-Claris, R. Labia, and J. Sirot. 1997. A complex mutant of TEM-1 B-lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1322–1325.
122. Stapleton, P., K. P. Shannon, and G. L. French. 1999. Construction and characterization of mutants of the TEM-1 B-lactamase containing amino acid substitutions associated with both extended-spectrum resistance and resistance to B-lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1881–1887.
123. Stobberingh, E. E., J. Arends, J. A. A. Hoogkamp-Korstanje, W. H. F. Goessens, M. R. Visser, A. G. M. Buiting, Y. J. Debets-Ossenkopp, R. J. v. Ketel, M. L. v. Ogtrop, L. J. M. Sabbe, G. P. Voorn, H. L. J. Winter, and J. H. van Zeijl. 1999. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Dutch hospitals. *Infection* 27:348–354.
124. Tenover, F. C., J. M. Mohammed, T. Gorton, and Z. F. Dembek. 1999. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum B-lactamases: survey of laboratories in Connecticut. *J. Clin. Microbiol.* 37:4065–4070.
125. Thomson, K. S., and C. C. Sanders. 1992. Detection of extended-spectrum B-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: Comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1877–1882.
126. Tzouveleki, L. S., and R. A. Bonomo. 1999. SHV-type B-lactamases. *Curr. Pharm. Des.* 5:847–864.
127. Tzouveleki, L. S., E. Tzelepi, P. T. Tassios, and N. J. Legakis. 2000. CTX-M-type B-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14:137–143.
128. Vahaboglu, H., R. Ozturk, H. Akbal, S. Saribas, O. Tansel, and F. Coskuncan. 1998. Practical approach for detection and identification of OXA-10-derived ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum B-lactamases. *J. Clin. Microbiol.* 36:827–829.
129. Vatopoulos, A. C., A. Philippon, L. S. Tzouveleki, Z. Komninou, and N. J. Legakis. 1990. Prevalence of a transferable SHV-5 type B-lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Greece. *J. Antimicrob. Chemother.* 26:635–648.
130. Wiener, J., J. P. Quinn, P. A. Bradford, R. V. Goering, C. Nathan, K. Bush, and R. A. Weinstein. 1999. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA* 281:517–523.
131. Yagi, T., H. Kruokawa, N. Shibata, K. Shibayama, and Y. Arakawa. 2000. A preliminary survey of extended-spectrum B-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* 184:53–56.
132. Yan, J.-J., S.-M. Wu, S.-H. Tsai, J.-J. Wu, and I.-J. Su. 2000. Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum B-lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in southern Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1438–1442.

133. Yang, Y., N. Bhachech, P. A. Bradford, B. D. Jett, D. F. Sahm, and K. Bush. 1998. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *E. coli* isolates producing TEM-10 and TEM-43 from St. Louis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1671–1676.
134. Zhou, X. Y., F. Bordon, D. Sirot, M.-D. Kitzis, and L. Gutman. 1994. Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1 B-lactamase conferring resistance to B-lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:1085–1089.
135. Barrett et al., 1994 T.J. Barrett, H. Lior, J.H. Green, R. Khakhria, J.G. Wells, B.P. Bell, K.D. Greene, J. Lewis and P.M. Griffin, Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing, *J. Clin. Microbiol.* 32 (1994), pp. 3013–3017.
136. Birren and Lai, 1993 B. Birren and E. Lai, *Pulsed Field Gel Electrophoresis a Practical Guide*, Academic Press, San Diego (1993).
137. Foley et al., 2009 S.L. Foley, A.M. Lynne and R. Nayak, Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens, *Infect. Genet. Evol.* 9 (2009), pp. 430–440.
138. Gerner-Smidt and Scheutz, 2006 P. Gerner-Smidt and F. Scheutz, Standardized pulsed-field gel electrophoresis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the PulseNet Europe Feasibility Study, *Foodborne. Pathog. Dis.* 3 (2006), pp. 74–80.
139. Goering, 2004 R.V. Goering, *Pulsed-field gel electrophoresis*. In: D.H. Persing, F.C. Tenover, J. Versalovic, Y. Tank, B. Unger, D.A. Relman and T.J. White, Editors, *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*, ASM Press, Washington, D.C. (2004), pp. 185–196.
140. Goering and Tenover, 1997 R.V. Goering and F.C. Tenover, Epidemiological interpretation of chromosomal macro-restriction fragment patterns analyzed by pulsed-field gel electrophoresis, *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997), p. 2432 .
141. Holt, 1994 J.G. Holt, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1994).
142. Hunter et al., 2005 S.B. Hunter, P. Vauterin, M.A. Lambert-Fair, M.S. Van Duyne, K. Kubota, L. Graves, D. Wrigley, T. Barrett and E. Ribot, Establishment of a universal size standard the strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: 1050.
143. McClelland et al., 1987 M. McClelland, R. Jones, Y. Patel and M. Nelson, Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987), pp. 5985–6005.
144. Ribot et al., 2006 E.M. Ribot, M.A. Fair, R. Gautom, D.N. Cameron, S.B. Hunter, B. Swaminathan and T.J. Barrett, Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet, *Foodborne Pathog. Dis.* 3 (2006), pp. 59–67.
145. Roberts et al., 2010 R.J. Roberts, T. Vincze, J. Posfai and D. Macelis, REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010), pp. D234–D236.
146. Singh et al., 2006 A. Singh, R.V. Goering, S. Simjee, S.L. Foley and M.J. Zervos, Application of molecular techniques to the study of hospital infection, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006), pp. 512–530.
147. Soll et al., 2007 D.R. Soll, C. Pujol and S.R. Lockhart, Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. epidemiological analysis of microorganisms. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry and M.A. Pfaller, Editors, *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington, D.C. (2007), pp. 129–151.
148. Struelens et al., 2001 M.J. Struelens, R. De Ryck and A. Deplano, Analysis of microbial genomic macrorestriction patterns by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing. In: L. Dijkshoorn, K.J. Towner and M. Struelens, Editors, *New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data*, Elsevier, Amsterdam (2001), pp. 159–176.

149. Tenover et al., 1997 F.C. Tenover, R.D. Arbeit and R.V. Goering, How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 18 (1997), pp. 426–439.
150. Tenover et al., 1995 F.C. Tenover, R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing and B. Swaminathan, Interpreting chromosomal DNA restriction patterns 33 produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing, *J. Clin. Microbiol.* (1995), pp. 2233–2239.
151. Turmel et al., 1991 C. Turmel, E. Brassard, R. Forsyth, K. Hood, G.W. Slater and J. Noolandi, High-resolution zero integrated field electrophoresis of DNA. In: E. Lai and B.W. Birren, Editors, *Electrophoresis of Large DNA Molecules: Theory and Applications*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1991), pp. 101–132.
152. Van Belkum et al., 2001 A. Van Belkum, M. Struelens, A. de Visser, H. Verbrugh and M. epidemiology, *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (2001), pp. 547–560.
153. Van Belkum et al., 2007 A. Van Belkum, P.T. Tassios, L. Dijkshoorn, S. Haeggman, B. Tibayrenc, Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial Cookson, N.K. Fry, V. Fussing, J. Green, E. Feil, P. Gerner-Smidt, S. Brisse and M. Struelens, Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology, *Clin. Microbiol. Infect.* 13 (Suppl. 3) (2007), pp. 1–46.
154. Van Ooyen, 2001 A. van Ooyen, Theoretical aspects of pattern analysis. In: L. Dijkshoorn, K.J. Towner and M. Struelens, Editors, *New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data*, Elsevier, Amsterdam (2001), pp. 31–45.
155. Grude N, Tveten Y, Kristiansen B-E: Urinary tract infection in Norway: bacterial etiology and susceptibility, a retrospective study of clinical isolates. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*.2001; 7: 543-547.
156. Vauterin and Vauterin, 2006 L. Vauterin and P. Vauterin, Integrated databasing and analysis. In: E. Stackebrandt, Editor, *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*, Springer, Berlin (2006), pp. 141–217.
157. Arbeit, R. D. 1995. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms, p. 190–208. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
158. Arbeit, R. D., M. Arthur, R. D. Dunn, C. Kim, R. K. Selander, and R. Goldstein. 1990. Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *J. Infect. Dis.* 161:230–235.
159. Barrett, T. J., H. Lior, J. H. Green, R. Khakhria, J. G. Wells, B. P. Bell, K. D. Greene, J. Lewis, and P. M. Griffin. 1995. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed field gel electrophoresis and phage typing. *J. Clin. Microbiol.* 32:3013–3017.
160. Finney, M. 1993. Pulsed-field gel electrophoresis, p. 2.5.9–2.5.17. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology*, vol. 1. Current Protocols, Greene-Wiley, New York.
161. Harsono, K. D., C. W. Kaspar, and J. B. Luchansky. 1993. Comparison and genomic sizing of 59:3141–3144.
162. Maslow, J. N., A. M. Slutsky, and R. D. Arbeit. 1993. Application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology, p. 563–572. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
163. Swaminathan, B., and G. M. Matar. 1993. Molecular typing methods: definition, applications, and advantages, p. 26–50. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
164. Erb A, Sturmer T, Marre R, Brenner H: Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2007; 26: 83–90

165. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H et al: Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol*, 2000; 10: 509–15
166. Stamm WE, Norrby RS: Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J Infect Dis*, 2001; 183(Suppl.1): S1–4
167. Foxman B: Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med*, 2002; 113(Suppl.): 5S–13S
168. Cambaz S, Peksen Y, Tevfik Sunter A et al: Antibiotic prescribing and urinary tract infection. *Int J Antimicrob Agents*, 2002; 20(6): 407–11
169. Dromigny JA, Nabeth P, Juergens-Behr A, Perrier-Gros-Claude JD: Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* urinary tract infections in Dakar, Senegal. *J Antimicrob Chemother*, 2005; 56: 236–39
170. Zhanel GG, Hisanaga TL, Laing NM et al: Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates: results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *Int J Antimicrob Agents*, 2006; 27: 468–75
171. Kahlmeter G: An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO. SENS Project. *J Antimicrob Chemother*, 2003; 51: 69–76
172. Andrade SS, Sader HS, Jones RN et al: Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines? *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2006; 101(7): 741–48
173. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth Informational Supplement M100-S17. Approved Standard. Wayne, PA, USA, 2007
174. Randrianirina F, Soares JL, Carod JF et al: Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community-acquired urinary tract infections in Antananarivo, Madagascar. *J Antimicrob Chemother*, 2007; 59: 309–12
175. Uzunkovic-Kamberovic S: Antibiotic resistance of coliform organisms from community-acquired urinary tract infections in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 58: 344–48
176. Arkam M, Shahid M, Khan AU: Etiology and antibiotic resistance pattern of community-acquired urinary tract infections in JNMC Hospital Aligarh, India. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2007; 6: 4
177. Warren JW, Abrutyn E, Hebel JR et al: Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Clin Infect Dis*, 1999; 29: 745–58
178. Arslan H, Azap Kurt O, Ergonul O, Timurkaynak F: Urinary Tract Infection Study Group. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *E. coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. *J Antimicrob Chemother*, 2005; 56: 914–18
179. Demirturk N, Demirgal T, Eldemir H et al: Antibiotic susceptibilities of bacteria isolated from urine specimens. *Turk Microbiol Cem Derg*, 2005; 35: 275–78
180. Sumer Z, Coskuncan F, Vahaboglu H, Bakir M: The resistance of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections. *Adv Ther*, 2005; 22(5): 419–23
181. Karaca Y, Coplu N, Gozalan A et al: Co-trimoxazol and quinolones resistance in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections over the last 10 years. *Int J Antimicrob Agents*, 2005; 26: 75–77
182. Francesco MA, Ravizzala G, Peroni Let al: Urinary tract infections in Brescia, Italy: Etiology of uropathogens and antimicrobial resistance of common uropathogens. *Med Sci Monit*, 2007; 13(6): BR136–44
183. Acar JF, Goldsein FW: Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*, 1997; 24(Suppl.1): S67–73
184. Hillier S, Roberts Z, Dunstan F et al: Prior antibiotics and risk of antibiotic-resistant community acquired urinary tract infection: case-control study. *J Antimicrob Chemother*, 2007; 60: 92–99

185. Kahlmeter G, Munday P, Cars O: Non-hospital antimicrobial usage and resistance in community-acquired *Escherichia coli* urinary tract infection. *J Antimicrob Chemother*, 2003; 52: 1005–10
186. Gobernado M, Valdes L, Alos JI et al: Spanish Surveillance Group for Urinary Pathogens. Antimicrobial susceptibility of clinical *Escherichia coli* isolates from uncomplicated cystitis in women over a 1-year period in Spain. *Rev Esp Quimioter*, 2007; 20(1): 68–76
187. Yumuk Z, Afacan G, Nicolas-Chanoine MH et al: Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*, 2008; 62(2): 284–88
188. Falagas ME, Polemis M, Alexiou VG et al: Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* urinary isolates from primary care patients in Greece. *Med Sci Monit*, 2008; 14(2): CR75–79
189. Bahrani-Mougeot FK, et al. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are prominent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol Microbiol* 2002;45:1079–1093
190. Brzuszkiewicz E, et al. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:12879–12884.
191. Chen SL, et al. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:5977–5982
192. Davis JM, et al. Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infect Immun* 2006;74:4401–4408.
193. Davis JM, et al. Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. *Infect Immun* 2005;73:5301–5310
194. Eto DS, et al. Integrin-Mediated Host Cell Invasion by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* 2007;3:e100.
195. Eto DS, et al. Actin-gated intracellular growth and resurgence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 2006;8:704–717.
196. Foxman B, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* are more likely than commensal *E. coli* to be shared between heterosexual sex partners. *Am J Epidemiol* 2002;156:1133–1140.
197. Guyer DM, et al. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect Immun* 2002;70:4539–4546.
198. Hancock V, et al. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol Lett* 2007;267:30–37.
199. Johnson JR, Delavari P. Concurrent fecal colonization with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a homosexual man with recurrent urinary tract infection and in his male sex partner. *Clin Infect Dis* 2002;35:E65–E68.
200. Kouokam JC, et al. Active cytotoxic necrotizing factor 1 associated with outer membrane vesicles from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2006;74:2022–2030.
201. Lane MC, et al. Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:16669–16674.
202. Lane MC, et al. Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infect Immun* 2005;73:7644–7656.
203. Lane MC, Mobley HL. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int* 2007;72:19–25.
204. Lindberg S, et al. Regulatory interactions among adhesin gene systems of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2007
205. Lloyd AL, et al. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2007;189:3532–3546.
206. Mansson LE, et al. Role of the lipopolysaccharide-CD14 complex for the activity of hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2007;75:997–1004.

207. Maroncle NM, et al. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2006;74:6124–6134.
208. Marrs CF, et al. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E.coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiol Lett* 2005;252:183–190.
209. Martinez JJ, et al. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *Embo J* 2000;19:2803–2812.
210. Mills M, et al. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infect Immun* 2000;68:5869–5880.
211. Miyazaki J, et al. Type 1, P and S fimbriae and fimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere and invade bladder epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002;33:23–26.
212. Moulin-Schouleur M, et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol* 2007;45:3366–3376.
213. Mulvey MA, et al. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun* 2001;69:4572–4579.
214. Nagy G, et al. Loss of regulatory protein RfaH attenuates virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2002;70:4406–4413.
215. Reigstad CS, et al. Functional genomic studies of uropathogenic *Escherichia coli* and host urothelial cells when intracellular bacterial communities are assembled. *J Biol Chem* 2007;282:21259–21267.
216. Nisel Yılmaz, Neval Agus, Sureyya Gul Yurtsever, Husnu Pullukçu, Zeynep Gulay, Ayten Coşkuner, Sukran Kose, Sohret Aydemir, Nalan Gulenc, Onur Ozgenc. *Med Sci Monit*, 2009; 15(11): pI61-65
217. Aktaş H, Şahin Ü, Yiğit N, Al F, Tuncel E. Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların çift disk sinerji ve E-test yöntemleri ile araştırılması. *İnfek Derg* 2001; 15(3): 325-28
218. Şahin İ, Kaya D, Öksüz Ç, Okay A, Şencan İ, Öztürk E. Klinik örneklerden izole edilen gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı ve antibiyotik duyarlılığı. *İnfek Derg* 2003 ; 17(1): 45-8
219. Jain A, Roy I, Gupta MK, Kumar M, Agarwal SK. Prevalance of extended spectrum beta-lactamase producing gram negative bacteria in septicemic neonates in tertiary care hospital. *J Med Microbiol* 2003; 52(5): 421-25
220. Tzelepi E, Magana CH, Platsouka E, Safianou D, Paniara O, Legakis NJ, Vatopoukos AC, Tzouveleki LS. Extended spectrum beta-lactamase types in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in two Greek hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21(3): 285-88
221. Ho PL, Tsang DN, Que TL, Ho M, Yuen KY. Comparison of screening methods for detection extended spectrum betalactamases and their prevalence among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Hong Kong. *APMIS* 2000; 108(3): 237-40
222. Özkan Ç, Oldacay M, Erdem G. Hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı. *ANKEM Derg* 2002; 16(1):65-68.
223. Smith D, Willshaw G, Stanley J, Arnold C. Genotyping of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: comparison of isolates of a prevalent phage type by fluorescent amplified-fragment length polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis analyses. *J Clin Microbiol* 2000;38(12):4616-20.
224. Osawa R, Iyoda S, Nakayama SI, Wada A, Yamai S, Watanabe H. Genotypic variations of Shiga toxin-converting phages from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 isolates. *J Med Microbiol* 2000;49(6):565-74.