

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YATAN HASTALARIN İDRAR KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE
EDİLEN *KLEBSIELLA SPP.*, *ESCHERICHIA COLI*,
ACINETOBACTER BAUMANNII, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
İZOLATLARININ ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ *IN*
VITRO YÖNTEMLERLE SAPTANMASI VE FOSFOMİSİNE
DİRENÇ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Bio. Şeyma NİGİZ

Mikrobiyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2020

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda bana tüm olanakları sağlayan ve beni her konuda destekleyen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer Prof. Dr. Cumhuri Özkuyumcu'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında bilimsel gelişimime katkıda bulunan, eğitimim ve hayatımla ilgili beni destekleyen çok değerli hocam Prof. Dr. Deniz Gür'e,

Çalışmam sırasında bilgi birikimiyle yolumu aydınlatan, tüm içtenliğiyle yanımda olan ve beni cesaretlendiren sayın danışman hocam Doç. Dr. Gülşen Hazırolan'a,

Tezimin yapımı sırasındaki katkılarından dolayı sayın hocam Prof. Dr. Özgen Eser'e,

Çalışmalarında bilgi ve anlayışını esirgemeyen, her daim güzel sohbetiyle hatırlayacağım Uzm. Aslı Çakar'a,

Tezimin deney aşamasında desteği için Nejla Kılıç'a,

Eğitimim süresince bana her anımda destek olan kıymetli dostum Meltem Öztartan'a,

Güzel dostluklarını ilk günden hissettiğim sevgili arkadaşım başta Öznur Gürpınar olmak üzere Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki tüm arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca attığım her adımda beni destekleyen ve yalnız bırakmayan sevgili aileme,

İçten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Nigiz Ş. Yatan Hastaların İdrar Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının *In Vitro* Yöntemlerle Saptanması Ve Fosfomisine Direnç Mekanizmalarının Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2020.

İdrar yolu enfeksiyonlarında en sık izole edilen etkenler, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*'dir. Çoğunlukla ampirik tedavi gerektiren idrar yolu enfeksiyonlarında etkene yönelik uygun tedavinin seçimi için yerel antibiyotik direnç verileri göz önüne alınmaktadır. Bu nedenle her hastanede süreli olarak antibiyotik surveyans araştırmalarının yapılması gereklidir. Kullanılmakta olan antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaların bilinmesi, direncin yayılımını engelleyecek önlemler alınmasını sağlamaktadır. İdrar yolu enfeksiyonlarında yaygın kullanılan bir antibiyotik olan fosfomisin, 1969'da üretilmiş olan, geniş spektrumlu, bakterisidal bir antibiyotiktir, çoklu ilaca dirençli (MDR) *Enterobacterales* gibi birçok sorunlu patojene karşı etkili olduğu için yeniden gündeme gelmiştir. Bununla birlikte fosfomisine dirençli izolatlar tüm dünyada bildirilmeye başlanmıştır. Fosfomisin direnci, üç mekanizma ile oluşmaktadır; fosfomisine azalmış geçirgenlik, antibiyotiğin hedef bölgesi olan MurA'daki modifikasyon ve enzimatik inaktivasyon. Bunlardan ilk ikisi kromozom, üçüncü mekanizma ise plazmid kontrolündedir. Ülkemizde fosfomisin direnci bildirilmekle birlikte hangi direnç mekanizmasının yaygın olduğu bilinmemektedir. Çalışmamız kapsamında; Şubat 2018-Şubat 2019 tarihlerinde Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Bakterioloji Laboratuvarına yatan hastalardan gelen idrar örneklerinden ardışık olarak izole edilen *E. coli* (n=235), *K. pneumoniae* (n=56), *A. baumannii* (n=7) ve *P. aeruginosa* (n=2) 'da antibiyotik duyarlılık profilleri belirlenmiştir. Fosfomisine dirençli izolatlarda (MİK >32mg/L) enzimatik inaktivasyona yol açan plazmid kaynaklı *fosA*, *fosA3* ve *fosC2* direnç genlerinin varlığı araştırılmıştır. Çalışmamızda fosfomisin duyarlılığı için altın standart olan agar dilüsyon yöntemi, diğer antibiyotikler (amikasin, gentamisin, seftazidim, seftriakson, meropenem, siprofloksasin, tigesiklin, trimetoprim/sülfametoksazol, kolistin ve piperasilin/tazobaktam) için sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Plazmid kaynaklı fosfomisin direnç genlerinin ve *bla_{CTX-M}*'in belirlenmesi için PZR yöntemi kullanılmıştır. Amikasin, gentamisin, seftazidim, seftriakson, meropenem, piperasilin/tazobaktam, siprofiloksasin, tigesiklin, trimetoprim/sülfametoksazol ve kolistin için direnç oranları sırasıyla %3,3, %18,7, %26,0, %34,0, %4,3, %24,0, %45,3, %4,0, %44,7 ve %7,0 olarak bulunmuş, fosfomisine ise 20 izolatta (% 6,6) direnç saptanmıştır. Fosfomisine en yüksek oranda direnç *K. pneumoniae* (n=9)'da saptanmıştır. İki *K. pneumoniae* izolatında *fosA* direnç geni saptanmış, bunlardan bir izolatta *fosA* ve *fosA3* genleri birlikte bulunmuş, bu izolatın ayrıca *bla_{CTX-M}* geni taşıdığı da belirlenmiştir. İzolatların hiçbirinde *fosC2* geni bulunmamıştır. Çalışmamızda fosfomisine dirence yol açabilecek sadece üç gen araştırılmıştır buna karşın fosfomisin direncinden sorumlu olabilecek diğer genlerin de araştırılması gereklidir. Fosfomisin direnç genlerinin plazmid kaynaklı olması, fosfomisinin yaygın kullanımıyla birlikte direncin artacağını düşündürmektedir. Bu nedenle fosfomisinin akılcı antibiyotik ilkeleri doğrultusunda kullanılmasına özen gösterilmeli ve direnç gelişimi yakından izlenmelidir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik duyarlılığı, idrar yolu enfeksiyonları, fosfomisin, antibiyotik direnci

ABSTRACT

Nigiz Ş. Investigation of *in vitro* antibiotic susceptibilities of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urine cultures of inpatients and determination of the mechanisms of resistance to fosfomycin. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Microbiology Master of Science Thesis, Ankara, 2020. The most common pathogens in urinary tract infections are *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*. and *A. baumannii*. Therapy which is often empirical requires knowledge on local antibiotic resistance data. Therefore, it is necessary to determine the rate of resistance to antibiotics periodically in each hospital. Awareness of the resistance mechanisms against antibiotics that are currently in use is needed to prevent the spread of resistance. Fosfomycin, which is a widely used antibiotic in urinary tract infections is a broad-spectrum, bactericidal agent which was produced in 1969 and was re-introduced recently because of its effectivity against many problem pathogens such as multidrug-resistant (MDR) Enterobacterales. However, emergence of resistance to this agent is being reported worldwide. Resistance to fosfomycin may be due to three mechanisms; decreased permeability, modification of the target protein MurA and enzymatic inactivation. The first two mechanisms are chromosomal and the third is plasmid mediated. There are reports on fosfomycin resistance in our country but the prevalence of resistance mechanisms is not known. In this study, antibiotic susceptibility profiles of consecutive urinary isolates of *E. coli* (n=235), *K. pneumoniae* (n=56), *A. baumannii* (n= 7) and *P. aeruginosa* (n = 2) collected between February 2018 and February 2019 from inpatients in Hacettepe University Hospitals Bacteriology Laboratory were evaluated. In isolates resistant to fosfomycin, (MIC > 32mg/L), presence of plasmid mediated genes *fosA*, *fosA3* and *fosC2* which cause enzymatic inactivation were investigated. In our study, agar dilution method which is the gold standard for fosfomycin was employed for fosfomycin and broth microdilution test for other antibiotics (amikacin, gentamicin, ceftazidime, ceftriaxone, meropenem, ciprofloxacin, tigecycline, trimethoprim/sulfamethoxazole, colistin and piperacillin/ tazobactam) was used. PCR method was employed to investigate plasmid mediated fosfomycin resistance genes and for the analysis of *bla_{CTX-M}*. For amikacin, gentamicin, ceftazidime, ceftriaxone, meropenem, piperacillin / tazobactam, ciprofloxacin, tigecycline, trimethoprim-sulfamethoxazole and colistin rates of resistance were 3.3%, 18.7%, 26.0%, 34.0%, 4.3%, 24.0%, 45.3%, 4.0%, 44.7% and 7.0% and respectively. Twenty isolates (6.6%) were resistant to fosfomycin. Resistance was most frequently observed in *K. pneumoniae* (n=9). *fosA* genes were detected in two *K. pneumoniae* isolates and *fosA* and *fosA3* genes occurred together in one isolate. This isoate also carried *bla_{CTX-M}*. *fosC2* gene was not detected in any of the isolates. In our study, only three resistance genes were investigated and other genes which may be responsible for fosfomycin resistance should also be investigated. Presence of plasmid originated genes in our isolates suggest that resistance will increase with the widespread use of fosfomycin. Therefore, antibiotic stewardship principles should be followed and the development of resistance should be closely monitored.

Keywords: Antibiotic susceptibility, urinary tract infections, fosfomycin, antibiotic resistance

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI | iv |
| ETİK BEYAN | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| SİMGELER ve KISALTMALAR | xii |
| ŞEKİLLER | xiii |
| TABLolar | xiv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. İdrar Yolu Enfeksiyonu | 3 |
| 2.2. Tedavide Kullanılan Antibiyotikler | 4 |
| 2.3. Antibiyotiklere Direnç | 5 |
| 2.3.1. Genel Direnç Tanımı | 5 |
| 2.4. Beta Laktam Antibiyotikler | 5 |
| 2.4.1. Beta Laktam/Beta Laktamaz İnhibitörlü Kombinasyonlar | 6 |
| 2.4.2. Sefalosporinler | 6 |
| 2.4.3. Karbapenemler | 7 |
| 2.5. Florokinolonlar | 8 |
| 2.6. Aminoglikozidler | 9 |
| 2.7. Trimetoprim/sülfametoksazol | 9 |
| 2.8. Kolistin | 10 |
| 2.9. Fosfomisin | 11 |
| 2.9.1. Etki Mekanizması | 12 |
| 2.9.2. Fosfomisinin Farmakodinamik (FD) ve Farmakokinetik (FK) Özellikleri | 13 |
| 2.9.3. Klinikte Kullanımı | 14 |
| 2.10. Fosfomisine Direnç Mekanizmaları | 15 |
| 2.10.1. Fosfomisine Azalmış Geçirgenlik | 15 |

| | |
|--|----|
| 2.10.2. Antibiyotiğin Hedef Bölgesi Olan MurA'daki Modifikasyonlar | 15 |
| 2.10.3. Enzimatik İnaktivasyon | 16 |
| 2.11. Fosfomisine <i>in vitro</i> Duyarlılığı Belirleme Yöntemleri | 18 |
| 3. GEREÇ-YÖNTEM | 20 |
| 3.1. İzolatların Toplanması ve Saklanması | 20 |
| 3.2. Mikrobiyolojik Kültür ve Tanımlama İşlemleri | 20 |
| 3.2.1. Bakteri Tanımlama Yöntemleri | 20 |
| 3.2.2. İzolatların Fosfomisin Duyarlılıklarının Belirlenmesi İçin Kullanılan Agar Dilüsyon Yöntemi | 20 |
| 3.2.3. Fosfomisin Dışındaki Sulandırılmış Antibiyotiklerin Hazırlanması ve Saklanması | 25 |
| 3.2.4. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi | 26 |
| 3.2.5. Piperasilin /Tazobaktam İçin Sıvı Mikrodilüsyon | 28 |
| 3.3. Moleküler Yöntemlerle Fosfomisin Direncinin Saptanması | 29 |
| 3.3.1. DNA İzolasyonu | 29 |
| 3.3.2. <i>fosA3</i> , <i>fosA</i> , <i>fosC2</i> , <i>bla</i> _{CTX-M} Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi | 29 |
| 3.3.3. <i>fosA3</i> Geninin PZR İle Amplifikasyonu | 30 |
| 3.3.4. <i>fosA</i> Geninin PZR Protokolü | 31 |
| 3.3.5. <i>fosC2</i> Geninin PZR Protokolü | 32 |
| 3.3.6. <i>bla</i> _{CTX-M} PZR Protokolü | 33 |
| 3.3.7. Agaroz Jel Elektroforezi | 34 |
| 4. BULGULAR | 35 |
| 4.1. Çalışmaya Alınan İzolatların Klinik ve Demografik Özellikleri | 35 |
| 4.2. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları | 36 |
| 4.3. Fosfomisine Direnç Mekanizmaları | 39 |
| 5. TARTIŞMA | 40 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 50 |
| 7. KAYNAKLAR | 52 |
| 8. EKLER | |
| EK 1. Etik Kurul Onayı | |
| EK 2. Orjinallik Ekran Çıktısı | |

EK 3. Dijital Makbuz

9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER ve KISALTMALAR

| | |
|---------------------|---|
| ABD | : Amerika Birleşik Devletleri |
| DHFR | : Dihidrolatın tetrahidrofolat |
| FD | : Farmakodinamik |
| FDA | : A.B.D. Gıda ve İlaç Örgütü |
| FK | : Farmakokinetik |
| G3P | : Gliserol-3-Fosfat |
| G6P | : Glikoz-6-Fosfat |
| GSBL | : Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz |
| İYE | : İdrar yolu enfeksiyonu |
| MALDI-TOF MS | : Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Süresi Kütle Spektrometrisi |
| MDR | : Çoklu dirençli |
| MHA | : Müller Hinton Agar |
| MHB | : Müller Hinton Broth |
| MİK | : Minimum İnhibitör Konsantrasyon |
| NDM-1 | : New Delhi metallo-beta-laktamaz-1 |
| OMP | : Dış membran porinleri |
| PBP | : Penisilin bağlayan proteinler |
| PDR | : Tam-dirençli (pan-rezistant) |
| PEP | : Fosfoenolpiruvat |
| PZR | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| TMP-SMX | : Trimetoprim/sülfametoksazol |
| XDR | : İlaçlara Aşırı Dirençli |

ŞEKİLLER

| Şekil | Sayfa |
|---|-------|
| 2.1. Fosfomisin oral formlarının; fosfomisin kalsiyum ($C_3H_5CaO_4P$) (I) ve trometamol ($C_3H_7O_4P \cdot C_4H_{11}NO_3$) (II) kimyasal yapısı. Fosfomisin intravenöz formu fosfomisin disodyumun ($C_3H_5Na_2O_4P$) (III) kimyasal yapısı. | 11 |
| 2.2. Fosfomisini taşıyan transport sistemleri ve fosfomisin etki mekanizması | 13 |
| 2.3. Fosfomisini modifiye edici enzimlerin kimyasal yapısı | 16 |
| 2.4. Fosfomisin 200 µg'lık diskinde <i>Escherichia coli</i> için inhibisyon zon örnekleri | 19 |
| 3.1. Fosfomisin sulandırımının hazırlanması | 21 |
| 3.2. Plaklara antibiyotik çözeltilerinin ve katyonik Müller Hinton Agar eklenmesi | 22 |
| 3.3. İzolatların serum fizyolojik çözeltisi içinde hazırlanması. | 23 |
| 3.4. Agar dilüsyon cihazı ve suşların plaklara ekimi. | 24 |
| 3.5. Fosfomisin plaklarının değerlendirilmesi. | 25 |
| 3.6. Mikrosantrifüj Tüplerinde Saklanan Antibiyotik Çözeltileri | 26 |
| 3.7. MHB besiyerinin mikrop plak kuyucuklarına otomatik pipetle 50'şer µl dağıtılması ve her antibiyotik için seri dilüsyon yapılması. | 27 |
| 3.8. Bulanıklıkların dansitometre cihazıyla saptanması. | 27 |
| 3.9. Mikroplakların aynada değerlendirilmesi. | 28 |
| 4.1. <i>K. pneumoniae</i> izolatının fosfomisin direnci saptanan <i>fosA3</i> , <i>fosA</i> , <i>fosC2</i> ve <i>bla_{CTX-M}</i> PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.. | 39 |

TABLULAR

| Tablo | | Sayfa |
|--------------|--|--------------|
| 3.1. | <i>fosA3</i> geni için hazırlanan PZR karışımının içeriği. | 30 |
| 3.2. | <i>fosA</i> geni için hazırlanan PZR karışımının içeriği. | 31 |
| 3.3. | <i>fosC2</i> geni için hazırlanan PZR karışımının içeriği. | 32 |
| 3.4. | <i>bla</i> _{CTX-M} geni için hazırlanan PZR karışımının içeriği. | 33 |
| 4.1. | Örneklerin izole edildiği klinik servislere göre dağılımı. | 35 |
| 4.2. | Çalışmadaki hastaların demografik özellikleri, örnek türleri ve izole edilen etkenlerin türlere göre dağılımı. | 35 |
| 4.3. | Çalışmada kullanılan antibiyotikler için EUCAST v. 8.1’de belirtilen sınır değerler (mg/L) | 36 |
| 4.4. | Çalışılan tüm bakterilerin antibiyotiklere <i>in vitro</i> duyarlılıkları | 37 |
| 4.5. | Çalışılan antibiyotiklerin tüm bakteriler için MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri | 37 |
| 4.6. | <i>E. coli</i> izolatlarının çalışılan antibiyotiklere <i>in vitro</i> duyarlılığı | 38 |
| 4.7. | <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının çalışılan antibiyotiklere <i>in vitro</i> duyarlılığı | 38 |

1. GİRİŞ

İdrar yolu enfeksiyonu (İYE), her yıl dünya genelinde 150 milyon kişiyi etkileyen en yaygın bakteriyel enfeksiyonlardandır (1). İYE'lerin ekonomik yükü halk sağlığı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve tekrarlayan enfeksiyonlar hastaların yaşam kalitesini büyük ölçüde etkilemektedir (2). Tüm dünyada yapılan ayaktan hasta ziyaretlerinin %0,7'sini İYE oluşturmaktadır (3, 4). İYE, %12,9 prevalans ile hastane kaynaklı enfeksiyonlar arasında da dördüncü sırada yer almakta ve üçte ikisi kateterlerle ilişkilendirilmektedir (5).

Klinik olarak İYE'ler komplike olan ve komplike olmayan olarak sınıflandırılmaktadır. Komplike olmayan İYE'ler tipik olarak sağlıklı olan, yapısal veya nörolojik idrar yolu anomalisi olmayan bireyleri etkilemektedir. Bu enfeksiyonlar alt İYE (sistit) ve üst İYE (piyelonefrit) olarak ayrılmaktadır (6-8). Kadın cinsiyet, geçirilmiş İYE hikayesi, cinsel aktivite, vajinal enfeksiyon, diyabet, obezite ve genetik duyarlılık dahil olmak üzere çeşitli risk faktörleri İYE ile ilişkilendirilmektedir (2, 8). İYE ayrıca hastane ve toplum kaynaklı olmak üzere de sınıflandırılabilir (9).

Komplike İYE, idrar yolu tıkanıkları, nörolojik hastalıkların neden olduğu idrar retansiyonu, immün baskılanma, böbrek yetmezliği, böbrek nakli, hamilelik, kateter ve drenaj tüpü gibi yabancı cisimlerin varlığı dahil olmak üzere idrar yollarını veya konakçı savunmasını tehlikeye sokan faktörlerle ilişkili enfeksiyonlar olarak tanımlanmaktadır (10, 11).

Gram negatif bakteriler, hastane ve toplum kökenli İYE'lerde en sık etkindir (9). İYE'lerde etken olarak en sık izole edilen gram negatif bakteri *Escherichia coli* iken, izole edilen diğer gram negatif bakteriler ise *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*'dir (12, 13). Günümüzde İYE tedavisinde gram negatif basillerdeki artan antibiyotik direnci ve sınırlı tedavi seçenekleri klinisyenler için güçlük yaratmaktadır. Gram negatif bakterilerde sorun yaratan direnç mekanizmaları, AmpC β -laktamazlar, genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL), karbapenemazlar ve antibiyotiklere çoklu dirençtir (14, 15).

İYE ampirik tedavisinde, etkenin ve lokal duyarlılık profillerinin bilinmesi önem arz etmektedir. Klinikte İYE'de en yaygın tedavi seçenekleri olarak

nitrofurantoin, florokinolonlar, piperasilin-tazobaktam, karbapenemler, aminoglikozidler, sefalosporinler, trimetoprim/sülfametoksazol (TMP/SMZ) ve uzun bir aradan sonra tekrar gündeme gelen fosfomisin tercih edilmektedir (16).

Fosfomisin, klinikte ilk kullanımı 1971'de başlayan, günümüzde gram negatif bakterilerde artan direnç oranları nedeniyle yeniden klinikte kullanılmaya başlayan, hücre zarı inhibitörü olarak etkinliğini gösteren bir antibiyotiktir (17). Fosfomisin, temel peptidoglikan bileşeni olan N-asetilmuramik asidin sentezinde yer alan bir enzim olan UDP-N-asetilglukozamin enolpiruvil transferazı (MurA) inhibe eder ve hücre içerisine glikoz-6-fosfat (G6P) taşıyıcı UhpT ve gliserol-3 fosfat (G3P) taşıyıcı GlpT ile alınır. Bu nedenle fosfomisin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin belirlenmesinde üreme ortamına G-6-P eklenmelidir (18).

Çalışmamızın amacı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'nde yatarak tedavi gören hastalardan gönderilmiş idrar örneklerinden izole edilen *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* izolatlarının amikasin, gentamisin, seftazidim, seftriakson, meropenem, piperasilin/tazobaktam, siprofloksasin, tigesiklin, TMP/SMZ, kolistin ve fosfomisine karşı *in vitro* duyarlılık profillerini belirlemektir. Ayrıca test edilen antibiyotiklere dirençli bulunan izolatlarda tedaviye alternatif olabilecek fosfomisine karşı duyarlılık durumunu saptamak ve fosfomisine dirençli bulunan izolatlarda fosfomisin direnç mekanizmalarını araştırmaktır. Ayrıca İYE'de kullanılacak antibiyotiklere ilişkin klinisyenlere yol göstermek amacıyla Türkiye'de bu konuda yapılan ilk kapsamlı çalışma olması bakımından, diğer çalışmalara öncülük etmesi hedeflenmektedir.

Çalışmamız, Hacettepe Hastanesi'nde klinik servislerinde İYE tedavisine veri sağlayacak, hastanemizdeki güncel direnç oranları ortaya çıkarılacaktır. Fosfomisin İYE'de sık kullanılan bir antibiyotik olmasına rağmen Dünya'da ve Türkiye'de fosfomisin direnç oranları ve genleri hakkında yeterli bilgi yoktur. Bu amaçla yola çıkılarak gelecekteki benzer çalışmalara da kaynak olmak, çalışmamızın hedeflerindedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İdrar Yolu Enfeksiyonu

İdrar yolu enfeksiyonu (İYE) görülme sıklığı açısından toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlar arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Her yıl kliniğe başvuran milyonlarca hasta İYE tanısı almakta, yaklaşık yüz bin hasta İYE nedeniyle hastaneye yatmaktadır (19, 20). Dünya'da İYE'ler tüm hastane kaynaklı enfeksiyonların % 40-60'ından sorumludur. Hastane kaynaklı İYE hastanede yatış süresi, maliyet ve mortaliteyi artırmaktadır. Artan hasta yaşı ve komorbidite, hastaneye yatırılan hastaları enfeksiyona duyarlı hale getirmektedir (21).

İYE'lerin klasik semptom ve bulguları; ateş, akut dizüri, sık idrara çıkma idrar aciliyeti veya sıklığında artış, hematüri, sırt ağrısı, suprapubik hassasiyet veya kostovertebral açı ağrısı veya hassasiyeti olarak karşımıza çıkmaktadır.

Enfeksiyonun yeri ve ciddiyetine bakılmaksızın sınıflandırılan İYE'ler ise, komplike ya da komplike olmayan enfeksiyonlardır. Komplike olmayan bir alt İYE, bilinen yapısal ürolojik anormallikleri olmayan, sağlıklı, premenopozal, gebe olmayan bir kadında ortaya çıkan akut sistit olarak tanımlanmaktadır (22). Komplike İYE ise, idrar yolunun fonksiyonel veya anatomik anormallikleri nedeniyle tekrarlayan, çoğunlukla enfeksiyon riskini veya tedavi başarısızlığı riskini artıran altta yatan bir durumla ilişkilendirilmektedir. Komplike İYE'ler, komplike olmayan İYE'lerle karşılaştırıldığında daha fazla morbidite ve mortalite riskine sahiptir (23).

Komplike olmayan İYE'ler genellikle daha az tanısal test gerektirdiğinden ve kısa süre içinde dar spektrumlu antibiyotiklerle tedavi edilebildiğinden, enfeksiyonun ciddiyetini belirlemek zorunlu olmaktadır. Öte yandan, tüm komplike İYE durumlarında, potansiyel patojenlerin çeşitliliği ve antibiyotik direnci riski nedeniyle etken patojeni tanımlamak için idrar kültürüne mutlaka gereksinim duyulmaktadır. Tekrarlayan enfeksiyonlar, cerrahi girişimler ve tekrarlanan antibiyotik tedavileri, antibiyotiğe dirençli bakterilerin komplike İYE'lere neden olma riskini arttırmaktadır (22, 24).

İYE tedavi yönetimi, enfeksiyonun tipine göre gerçekleştirilmektedir. Komplike olmayan sistit tedavisinde dar spektrumlu antibiyotiklerle başlayan süreç, ampirik tedaviye yanıtı göre sürdürülmektedir. Komplike sistit ve akut piyelonefritin

tedavisinde ise, idrar kültürünün gönderilmesinin ardından geniş spektrumlu antibiyotiğin başlatılmasını ve antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre ise antibiyotik seçimi süreçlerini kapsamaktadır (22, 25).

İYE için ampirik antibiyotik tedavisinin seçiminde göz önünde bulundurulacak önemli noktalar arasında; hastaya özgü altta yatan durumların varlığı (örneğin; böbrek veya karaciğer yetmezliği, ilaç alerjisi öyküsü, geçmiş antibiyotik kullanımı) yanısıra üreyebilecek bakteri spektrumu, yerel direnç verileri, seçilecek antibiyotiğin güvenlik profili ve idrarda antibiyotiğin ulaşabileceği konsantrasyonlar gibi durumlar bulunmaktadır (22, 25).

Hastane kaynaklı İYE’de en sık saptanan etken *E.coli* (%64,9)’dir. Diğer etkenlerin dağılımı sırasıyla *K. pneumoniae* (%10,1), *P. mirabilis* (%5,0), *E. faecalis* (%4,1) ve *P. aeruginosa* (%2,7) olarak bildirilmektedir (12, 26).

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı sonucu oluşan seçici baskının, antibiyotiğe dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında önemli rol oynadığı göz önünde bulundurulduğunda, klinisyenlerin kültür ve duyarlılık profillerine göre antibiyotik seçimine karar vermesi İYE tedavisinde başarıyı artırmaktadır (27).

2.2. Tedavide Kullanılan Antibiyotikler

İYE’de hastane kaynaklı ve toplum kaynaklı durumlarda tedavi seçenekleri değişmektedir. Ampirik olarak başlayan tedavi hastada kompleks faktörlerin varlığı ve antibiyotik direnç durumu da dikkate alınarak planlanmalıdır (28, 29). Toplum kaynaklı İYE tedavisinde en sık tercih edilen antibiyotikler; beta laktam/beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonlar, ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinler, TMP/SMZ, florokinolonlar, aminoglikozitler, karbapenemler ve fosfomisin (30).

Hastane kaynaklı İYE tedavisinde antibiyotik seçilirken, antibiyotiğin farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri, yüksek renal klirensi, hem asidik hem de alkali idrarda iyi antibakteriyel aktiviteye sahip olması gibi ön koşullar dikkate alınmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla daha dirençli izolatlarla karşılaşılabilen gözönünde bulundurulduğunda üçüncü/dördüncü kuşak sefalosporinler, florokinolonlar ve karbapenemler gibi daha geniş spektrumlu antibiyotikler tercih edilmektedir (21).

2.3. Antibiyotiklere Direnç

2.3.1. Genel Direnç Tanımı

Antibiyotiklere direnç, antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucu toplumda ve hastane ortamında önemli bir sorun haline gelmiştir. Direncin biyokimyasal mekanizmalarının bilinmesi, *in vitro* olarak direnç fenotiplerinin belirlenebilmesi ve tedaviye yön göstermenin yanında dirence karşı koyabilen veya bakterilerde farklı hedefleri olan yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine de temel oluşturmaktadır. Bir bakteri, çeşitli direnç mekanizmalardan bir kaçını aynı anda kullanarak farklı grup antibiyotiklere dirençli hale gelebilmektedir. Çoklu ilaç direnci farklı şekillerde gözlenebilmektedir.

Çok ilaca dirençli ("multi-drug resistant", MDR): Üç veya daha çok antibiyotik grubunda en az birer ilaca direnç vardır (örneğin, aminoglikozidler, florokinolonlar, sefalosporinler, karbapenemler vs).

İlaçlara Aşırı Dirençli ("extensively", "extremely drug resistant ", XDR): Bir iki grup dışında hemen hemen tüm gruplarda en az bir ilaca direnç vardır.

Tam-dirençli ("pan-resistant"): Tüm antibiyotiklere dirençlidir (31, 32).

2.4. Beta Laktam Antibiyotikler

Tüm beta-laktam antibiyotikler bakterilerde hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisidal etki göstermektedir. Bakteri hücre duvarı birbirine çapraz bağlar ile bağlanmış peptidoglikan ağından oluşan karmaşık bir yapıdır. Bu yapıdaki glikan bileşeni birbirine çapraz bağlanan N-asetilmuramik asit (NAM) ve N-asetilglukozamin (NAG) birimlerinden oluşmaktadır. Penisilin bağlayan proteinler (PBP) olarak tanımlanan transpeptidaz enzimleri bu çapraz bağlanmayı kataliz eden enzimlerdir. β -laktam antibiyotikler NAM'a bağlı olan pentapeptiddeki D-Ala-D-Ala'ya yapısal benzerlik göstermektedir; bu nedenle PBP'ler hücre duvarı sentezinde yanlışlıkla β -laktam antibiyotiği bağlamakta ve duvar sentezinin bu basamaktan sonraki evreleri gerçekleştirmemekte, otolitik enzimlerin aktivitesi devam ettiği için hücre geçirgen hale gelmekte ve sonuçta bakteri lizise uğramaktadır (31).

β -laktam antibiyotiklere karşı klinikte en sık gözlenen direnç, bakterilerin bu antibiyotikleri inaktive eden β -laktamaz enzimlerini sentezlemesi ile oluşmaktadır.

Beta-laktamazlar, beta laktam antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının siklik amid bağlarını parçalayarak bu antibiyotiklerin etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerdir. Gram negatif bakterilerde β -laktamazlar, dış membran ile sitoplazmik membran arasındaki periplazmik boşlukta bulunmaktadır. β -laktamazlar, bakteriler tarafından kromozomlar, plazmidler ya da transpozonlar aracılığı ile sentezlenmektedirler (33).

2.4.1. Beta Laktam/Beta Laktamaz İnhibitörlü Kombinasyonlar

İYE tedavisinde amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin/sulbaktam ve piperasilin/tazobaktam gibi beta laktam/beta laktamaz inhibitör kombinasyonları kullanılmaktadır. Piperasilin/tazobaktam hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisidal etki gösteren bir beta laktam/beta laktamaz inhibitörüdür. Piperasilin/tazobaktam *Enterobacterales* ve *Pseudomonas* spp.'ye karşı etkinliğe sahip, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir ve orta-şiddetli komplike ve hastane kaynaklı İYE ampirik tedavisinde kullanılan seçeneklerden biridir (22, 25). İnhibitörün enzim aktivitesinin zayıf olması veya bakterinin dış membran permeabilitesinin azlığı nedeniyle doğal dirençli bakterilerin yanı sıra, son yıllarda plazmide bağlı (örneğin TEM-1 gibi) beta laktamazları fazla sentezleyen *E. coli*'lerde piperasilin/tazobaktam direnci gelişmektedir (34).

2.4.2. Sefalosporinler

Sefalosporinler beta-laktamazlara karşı penisilinlere göre daha dirençlidir. Etki spektrumlarına göre sefalosporinler beş gruba ayrılmaktadır. Birinci kuşaktan dördüncü kuşağa doğru gram pozitif etkinlik azalırken, gram negatif etkinlik artmaktadır. Dördüncü kuşak sefalosporinler (sefepim, sefpirom), gram pozitif ve gram negatif bakterilere geniş spektrumlu etki göstermektedir (35, 36). Beşinci grubun diğerlerinden farkı ise metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olmalarıdır (37).

Sefalosporin direncinden sorumlu en sık gözlemlenen mekanizmalar arasında GSBL enzimleri, çoğunlukla plazmidlerce kodlanmakta ve sefotaksim, seftriakson, seftazidim gibi oksiminino sefalosporinleri ve aztreonam gibi monobaktamları hidrolize etmektedirler. Bu enzimler, çoğunlukla *Klebsiella* spp. ve *E. coli* başta olmak üzere neredeyse tüm *Enterobacterales* takımında ve nonfermentatif

bakterilerce üretilmekte olup, bazı tipleri beta-laktamaz inhibitörleriyle inhibe olmaktadır (38).

CTX-M enzimleri günümüzde dünya çapında en yaygın GSBL'ler hâline gelmişlerdir. CTX-M grubu beta laktamazlar, substrat olarak sefotaksimi tercih eden enzimlerdir. Bu enzimler seftazidimi de bir miktar hidroliz etmekle birlikte, bu etki klinikte dirence yol açacak kadar önemli değildir (37).

2.4.3. Karbapenemler

Karbapenemler; hastanede gelişen İYE'de, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörlerinden sonra ampirik tedavide sıklıkla tercih edilen ve birçok bakteri grubuna karşı etki gösterebilen, günümüzdeki mevcut antibiyotikler içinde en geniş etki alanına sahip gruptur (39).

Enterobacterales'de karbapenem direnci, üç mekanizma ile gerçekleşmektedir:

1. PBP'de oluşan değişikliklerle antibiyotığın hedefine bağlanması engellenebilir.
2. Dış membran porinlerinin (OMP) ifadesinde azalma veya atım pompalarıyla ilacın hücre içine girişi önlenir.
3. Karbapenemaz enzimleri ile antibiyotik inaktive edilebilir (40, 41).

Bu mekanizmalar arasında günümüzde karbapenemlere karşı en sık gözlenen direnç, karbapenemaz enzimlerinin sentezlenmesi ile olmaktadır. Karbapenemaz üretimi, dünya çapında sağlık hizmetlerinde en yaygın karşılaşılan antibiyotik direnç tehdididir (42). Karbapenemazlar, karbapenemleri hidroliz etmelerinin yanında geniş spektrumlu penisilinler, sefalosporinler ve sefamisinleri de hidrolize eden enzimlerdir (43). Karbapenemaz enzimlerini kodlayan genler, kromozom, plazmid veya transpozonlarda yer alabilmektedir. Karbapenemazlar üç farklı grupta bulunmaktadır. Bunlar; 1- sınıf A enzimler (SME-1, NMC-A, IMI-1, KPC-1 gibi), 2- sınıf B enzimler; aktivite için Zn^{+2} metal iyonuna ihtiyaç duyan metallo-enzim olarak tanımlanan metallo-beta-laktamazlar (IMP, VIM, NDM gibi) ve 3- sınıf D (OXA türevi karbapenemazlar) enzimlerdir (43-45).

Ülkemizde karbapenemazlardan VIM, IMP, OXA-türleri ve NDM *Enterobacterales* ve *Acinetobacter*'de bildirilmiştir. *Enterobacterales*'de en sık

rastlanan enzim ülkemizde OXA-48'dir. Diğer sık bildirilen enzimler olan IMP ve NDM-1 ise *K. pneumoniae*'da saptanmıştır (46, 47). *A. baumannii* izolatlarında ise OXA-23 en sık saptanan direnç enzimi olup, onu sırasıyla OXA-58, OXA-24 ve GES enzimleri izlemektedir (48-50). Yaygın olarak rastlanan bir metallo beta-laktamaz olan New Delhi metallo-beta-laktamaz-1 (NDM-1), ilk defa 2008'de İsveç'te çok ilaca dirençli *K. pneumoniae*'ye bağlı İYE tanısıyla tedavi gören Hintli bir hastadan izole edilmiş; daha sonra NDM-1 üreten bakteriler birçok ülkede tanımlanmıştır (51). Bu bakteriler, karbapenemleri de içeren beta-laktamlara oldukça dirençlidir ve ortaya çıkan bu geniş spektrumlu direnç, plazmidler aracılığı ile diğer bakterilere transfer edebilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı, NDM üreten suşların neden olduğu enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri oldukça kısıtlanmaktadır (52).

Enterobacterales takımında karbapenemaz üretimi, *K. pneumoniae* suşlarında *E. coli* suşlarına göre daha yaygındır. Belçika, Fransa, İspanya, Türkiye, İngiltere'de çok sayıda OXA-48 karbapenemaz üreten *E.coli* izolatı mevcutken, Bulgaristan ve Sırbistan'da ise çoğunlukla NDM tip karbapenemaza sahip *E. coli* izolatları bildirilmiştir (42).

2.5. Florokinolonlar

Florokinolonlar (norfloksasin, siprofloksasin ve levofloksasin), komplike olmayan sistit ve piyelonefrit tedavisinde klinikte sık kullanılan ikinci basamak seçeneklerdir (22, 25). Etkilerini DNA sentezini inhibe ederek gösterirler. Hedefleri olan DNA giraz ve topoizomerez IV, tip-2 topoizomerezlar sınıfında yer alan enzimlerdir (53-55). *Enterobacterales*'de kinolon direnci; (i) hedef enzimlerdeki değişimler, (ii) ilaç geçirgenliğindeki değişimler ve (iii) nadir rastlanan direnç geninin plazmid aktarımı yollarıyla gerçekleşmektedir (56).

Gram negatif bakterilerdeki en yaygın görülen florokinolon direnç mekanizması *gyrA-B* alt ünitelerindeki spontan mutasyonlar nedeniyle gerçekleşen hedef enzimdeki değişimlerdir. Ayrıca *OmpF* gibi bazı porin proteinlerinin kaybı veya değişimi gibi durumlar, ilacın sitoplazma içerisindeki konsantrasyonunu azaltarak florokinolon direncine neden olabilmektedir. Günümüzde aktif pompa

sistemlerinin aşırı düzeyde üretimi de florokinolon direncinde bilinen başka bir direnç mekanizmasıdır (57).

İYE etkenleri arasında florokinolon direnci hem toplum hem de hastane ortamlarında giderek artmaktadır. Kateter kullanımı, ilerleyen yaş, geçirilmiş İYE, yakın zamanda hastaneye yatış öyküsü ve geçmiş antibiyotik kullanımı gibi durumlar artan florokinolon direnci ile ilişkili risk faktörleridir (15, 26, 58-62).

2.6. Aminoglikozidler

Aminoglikozidler, 30S ribozomal alt biriminin 16S ribozomal RNA'sına bağlanarak bakterilerde protein sentezini inhibe etmekte, ayrıca hücre duvarındaki polisakkaritleri birbirine bağlayan Mg^{+2} ve Ca^{+2} 'nin yerine geçerek, hücre duvarında delikler oluşmasına yol açmaktadır (63).

Aminoglikozid direnci üç tipte olabilir: (i) permeabilite azalması, (ii) hedef değişikliği ve (iii) inaktivasyona yol açan enzimlerin üretimi. Bu tipler arasında en önemli mekanizma, “aminoglikozidleri değiştiren enzimler” ile bu antibiyotiklerin amino ya da hidroksil gruplarının enzimatik olarak değiştirilmesidir (63, 64).

Amikasin, çok ilaca dirençli gram negatif bakterilerle gelişen komplike İYE ve akut piyelonefritin ampirik tedavisinde en sık tercih edilen aminoglikozittir. İYE'deki kullanımı, idrarda yüksek konsantrasyonlara ulaşması nedeniyle başarılı sonuçlar vermesine rağmen, nefrotoksisite riski ve direncin artması endişesi, amikasinin klinikteki kullanımını sınırlamaktadır (65).

2.7. Trimetoprim/sülfametoksazol

Sülfonamidler, *p*-aminobenzoik asit ile yarışmaya girerek belirli mikroorganizmaların gereksinim duyduğu folik asit sentezini önleyen antimetabolitlerdir (66). İYE'de en sık kullanılan sülfonamid, sülfametoksazoldür. Sülfonamidlere direnç, mutasyonlar sonucu gelişebilir. *E. coli*'deki direnç, dihidropteroatın yapısal değişikliği ile sülfonamidlere azalmış afinite sonucu olabilir. Plazmid yoluyla ilaca dirençli enzimlerin kodlanması veya bakteriyel hücre geçirgenliğinin azalmasıyla da direnç gelişebilir. Plazmid kaynaklı sülfonamid direnci özellikle trimetoprim ile birlikte kullanılmaya başlandıktan sonra giderek artmıştır (31).

Trimetoprim diğerk bir antimetabolittir ve dihidrofolat redüktazı inhibe edip dihidrofolatın tetrahidrofolata (DHFR) dönüşmesini engelleyerek folik asit metabolizmasını bozar. Trimetoprim, çoğunlukla sülfametoksazol ile kombine edilir ve böylece folik asit sentezinin iki basamağına etkili sinerjistik bir kombinasyon ortaya çıkmış olur. Trimetoprime direnç, kromozom ya da plazmid kontrolünde gelişebilmektedir. DHFR'nin aşırı sentezine ya da permeabilitede azalmaya yol açan kromozomal mutasyonlar oluşabilmesine karşın klinikte nadirdir. Trimetoprime karşı en sık gözlenen direnç mekanizması, plazmid veya transpozonlarda bulunan *dhfr* genleri tarafından yeni, trimetoprime dirençli bir DHFR enzimi sentezlenmesidir (40).

TMP-SMZ, birçok gram pozitif ve gram negatif bakteriye etkilidir ve özellikle *E.coli* gibi duyarlı mikroorganizmalarla gelişen akut ve kronik İYE tedavisinde seçilecek ilaçtır (66). Son yıllarda birçok ülkeden bildirilen hızla artan direnç oranları nedeniyle günümüzde TMP-SMZ, İYE ampirik tedavisinde ilk seçenek olarak tercih edilmemektedir (22).

2.8. Kolistin

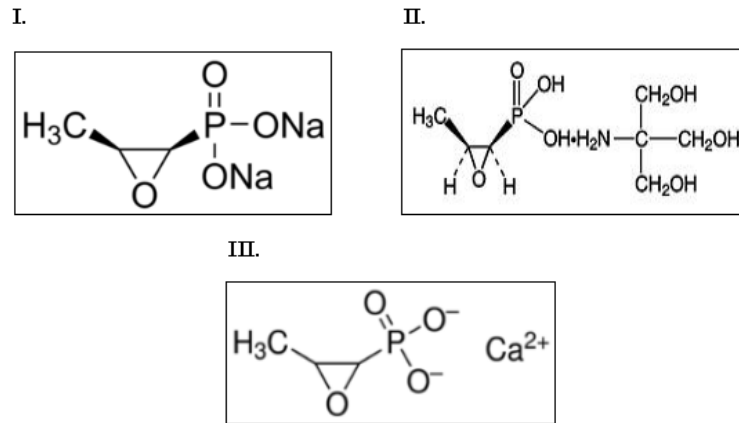
Kolistin, özellikle gram negatif bakterilere karşı önemli aktiviteye sahip, bakterilerin dış zarına etki eden, dar spektrumlu, polimiksin grubundan bir antibiyotiktir. Günümüzde MDR bakterilerde son çare tedavisi olarak kullanılmaktadır. Bakteri dış zarındaki lipopolisakkarit tabakasını stabil halde tutan divalant katyonların (Ca^{+2} , Mg^{+2}) yerini değiştirerek, dış zarda bozulma ve permeabilite artışı sonucu bakterinin ölümüne neden olmaktadır. Antibakteriyel etkisinin yanında kolistin, lipopolisakkaridin lipit A kısmına bağlanarak bakterinin endotoksin etkisini bloke etmektedir (67-69).

Kolistin direnci, kromozomal mutasyonlarla veya plazmid kaynaklı olarak LPS modifikasyonu ile farklı yollardan meydana gelmektedir. Direnç gelişiminde PmrA-PmrB ve PhoQ-PhoP regülatuar sistemleri rol oynar. Kolistine karşı direnç için en yaygın stratejiler, LPS'nin değiştirilmesi ve negatif yükünün azaltılması yoluyla bakteri dış zarının modifikasyonlarıdır. Günümüzde özellikle plazmid kaynaklı horizontal dirençten sorumlu *mcr* geni taşıyan izolatlarla tüm dünyada rastlanabilmektedir (70-72).

2.9. Fosfomisin

Fosfomisin ($C_3H_7O_4P$), orijinal adıyla “fosfonomisin”, İspanya’da 1969 yılında *Streptomyces fradiae* türünün fermentasyon ürünlerinden türetilmiş, fosfoenolpirüvat (PEP) analogu geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Mevcut antibiyotikler arasındaki 138 Da ağırlığı ile en küçük moleküler kütleye sahiptir. Suda çözünebilen güçlü bir polar moleküldür (73-75).

Fosfomisin 1970’lerin başından beri kullanılmaya başlanmış, ilk zamanlarda disodyum tuzunun intravenöz formu olarak piyasaya sürülmüştür. Daha sonrasında fosfomisin oral formu trometamol olarak kullanıma girmiştir. Klinikte, oral formu, İYE tedavisinde ilk olarak İspanya, Almanya, Fransa, Japonya, Brezilya ve Güney Afrika’da kullanıma girmiş ve ilerleyen yıllarda diğer endikasyonlarda da geniş kullanım alanına sahip olmuş ve 1996’da A.B.D. Gıda ve İlaç Örgütü (FDA) tarafından kullanımı onaylanmıştır. Günümüzde fosfomisin iki oral formu (kalsiyum ve trometamol) ve bir intravenöz formu (disodyum tuzu) ticari olarak kullanımdadır (76). Fosfomisin oral ve intravenöz formlarının kimyasal yapıları Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Fosfomisin oral formlarının; fosfomisin kalsiyum ($C_3H_5CaO_4P$) (I) ve trometamol ($C_3H_7O_4P$, $C_4H_{11}NO_3$) (II) kimyasal yapısı. Fosfomisin intravenöz formu fosfomisin disodyumun ($C_3H_5Na_2O_4P$) (III) kimyasal yapısı.

Son yıllarda küresel bir sorun haline gelen antibiyotik direnci, tedavide etkili antibiyotik sayısında büyük azalmaya sebep olmuştur. Yeni antibiyotik üretimindeki kısıtlılıklar ve özellikle çoklu ilaca dirençli gram negatif bakteriler ile gelişen enfeksiyonlardaki artışa karşın mevcut antibiyotiklerin yetersiz kalması, eski

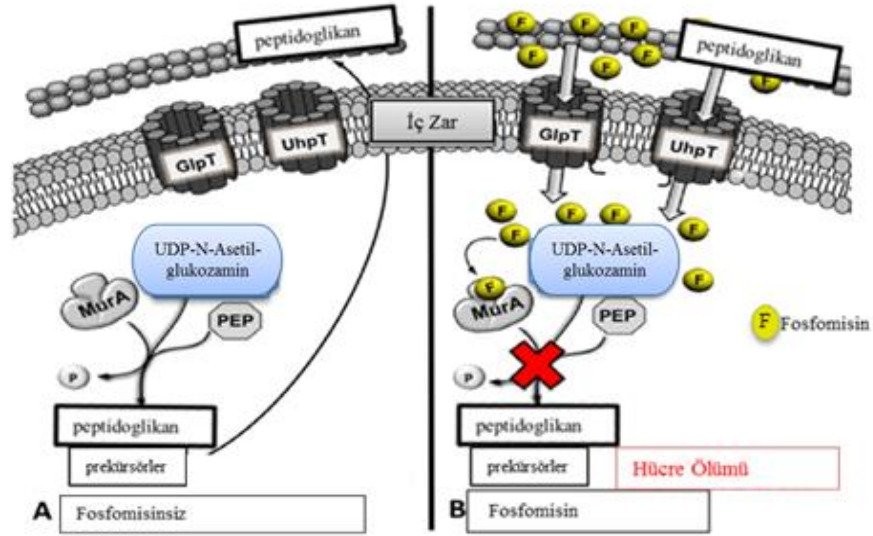
antibiyotiklerin kullanımını yeniden gündeme getirmiştir (77-79). Bu antibiyotiklerden biri de, dünyada hala üropatojenlerde direnç oranlarının görece düşük ve sabit kaldığı fosfomisin olmuştur. Fosfomisin komplike olmayan sistit enfeksiyonları başta olmak üzere, metisiline dirençli *S.aureus*, vankomisine dirençli enterokoklar gibi gram-pozitif koklara etkilidir. Gram-negatif basillerdeki etkinliği, gram-pozitif koklara göre daha üstündür (80, 81).

In vitro çalışmalar, duyarlı bakteriler üzerinde fosfomisinin bakterisidal etkinliğini 30 dakika içinde gösterdiği ortaya koymuştur. Ayrıca, bakteri fimbrialarının sentezini ve hareket yeteneklerini azaltarak idrar yolu epitelyumuna ve üriner kateterlerin iç yüzeyine yapışmasını ve kolonizasyonunu engellemektedir. Fosfomisinin düşük inhibitör konsantrasyonlarda bile, *E. coli*'nin plazmid transferi yapabilme ve patojenite ile ilgili enzimleri sentezleme yeteneğinde zayıflamaya neden olduğu da gösterilmiştir (82, 83).

2.9.1. Etki Mekanizması

Fosfomisin, bakteri hücre duvarı sentezinin erken bir aşamasını geri dönüşümsüz olarak engelleyen bakterisidal bir antibiyotiktir. Bakterisidal aktivitesini sitoplazmaya ulaşarak yapmaktadır. Fosfomisin, hedef hücreye girmek için iki transport sistem kullanmaktadır. Birincisi, glikoz-6-fosfat (G6P) tarafından indüklenen heksoz monofosfat taşıma sistemi (UhpT) iken, diğeri gliserol-3-fosfat (G3P) tarafından indüklenen L-alfa-gliserofosfat taşıma sistemi (GlpT) dir (84, 85). Şekil 2.2.'de fosfomisinin transport sistemleri gösterilmiştir.

Fosfomisin sitoplazmaya ulaştığında, bir fosfoenolpiruvat (PEP) analogu olarak hareket eder ve MurA'nın 115. sistein rezidüsüne (UDP-GlcNAc enopiruvil transferaz) bağlanmaktadır. Böylece, peptidoglikan sentezinden sorumlu ana enzim olan enolpiruvil transferazı inhibe eder (18). Sonuç olarak, peptidoglikan sentezinin ilk basamağında, UDP-GlcNAc ve PEP'den, UDP-GlcNAc-3-O-enolpiruvatın oluşmasını önler. Bakteriyel hücre lizisine ve ölüme yol açar. Bu etkilere ek olarak, fosfomisin PEP analogu olarak görev yapar ve onunla rekabet eder (85).



Şekil 2.2. Fosfomisini taşıyan transport sistemleri ve fosfomisinin etki mekanizması (86) nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir.

2.9.2. Fosfomisinin Farmakodinamik (FD) ve Farmakokinetik (FK) Özellikleri

Fosfomisin disodyum çok hidrofilik bir maddedir (73). Yaklaşık 1,5-2 saatlik yarılanma ömrüne sahiptir. Karaciğerde metabolize edilmez. İntravenöz uygulamadan sonra, fosfomisinin tahminen %93'ü böbrek yolu ile aktif olarak elimine edilir. Biyoaktif formlar %50-60 civarında ilk 3-4 saatte glomerüler filtrasyon ile atılmaktadır. İlacın yaklaşık %3'ü serum proteinlerine bağlanır: plazma proteinlerine bağlanma seviyeleri göz ardı edilebilecek seviyede düşüktür. Ayrıca düşük moleküler ağırlığı sayesinde yüksek seviyelerde böbrek, mesane, prostat, akciğer, göz, kemik, deri lezyonlarındaki sekresyonlara, beyin omurilik sıvısı ve safra yollarına yüksek düzeyde difüze olabildiği gösterilmiştir (84).

Fosfomisinin, FK/FD parametreleri açıkça tanımlanmamış ve mikroorganizmaya bağlı olduğu bildirilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar gram negatif basillerde (*P. aeruginosa*, *E. coli* ve *Proteus spp.*), fosfomisin aktivitesini en iyi öngören FK/FD parametresinin eğri altındaki alanın MİK'e oranı (AUC)/(MİK) olduğu saptanırken (87, 88), *S. aureus* ve *Enterococcus*'ta ise,

fosfomisinin zamana bağı (T> MİK) bir tutum sergilediği gösterilmiştir (89). Bir çalışmada ayrıca, fosfomisin yüksek bir postantibiyotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (90).

2.9.3. Klinikte Kullanımı

Fosfomisin, komplike olmayan alt İYE etkeni olan *Enterococcus faecalis* gibi gram pozitif ve *E. coli* gibi gram negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu, hızlı bakterisidal etkiye sahip bir antibiyotiktir. ABD’de sadece komplike olmayan sistitli hastaların tedavisinde (gebeler dahil) tek doz olarak kullanımı onaylanmıştır ve nefrit, piyelonefrit gibi üst İYE tedavisinde önerilmemektedir (91).

Fosfomisinin, metallo-beta-laktamaz türler de dahil olmak üzere birçok MDR ve XDR *Enterobacterales* türüne karşı *in vitro* ve *in vivo* aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. *E. coli* suşlarıyla gelişen alt İYE tedavisinde gün aşırı üç kür fosfomisin-trometamolün ucuz, güvenilir ve etkili bir ilaç olduğu tespit edilmiştir (92, 93).

Fosfomisin diğer antibiyotiklerle birlikte kullanıldığında, sinerjistik etki ile MDR gram negatif bakterilerle gelişen tedavilerde %100’e yakın başarılı sonuçlar vermektedir. Fosfomisin ve β -laktam antibiyotikler arasındaki sinerjistik etki, hücre duvarı sentezinin ayrı adımlarda inhibe edilmesinden kaynaklanmaktadır; fosfomisin ilk enzimatik basamağı inhibe ederken, β -laktam antibiyotikler hücre duvarı sentezi sürecinde ilk aşamayı inhibe etmektedir. Yapılan çalışmalarda fosfomisin ve siprofloksasin arasında etkin bir sinerjik etki olduğu gösterilmiştir. *P. aeruginosa* ile yapılan birkaç *in vitro* çalışmada fosfomisin ile aztreonam, sefepim, meropenem, imipenem, seftazidim, gentamisin, amikasin, siprofloksasin dahil olmak üzere başka antibiyotikler arasında da sinerji bulunmuştur (94, 95). Fosfomisin ayrıca, *Enterobacterales* türlerini tedavi etmek için diğer antibiyotiklerle birlikte kullanıldığında *in vitro* sinerjik etkilere sahiptir (95, 96). Artan antibakteriyel etkinliğe ek olarak, fosfomisin, bu ilaçların doz miktarlarını düşürebileceği gibi, aminoglikozitler, glikopeptitler ve polimiksin B gibi diğer antibiyotiklerle ilişkili toksisiteyi de azaltabilmektedir (97-99).

2.10. Fosfomisine Direnç Mekanizmaları

Fosfomisine direnç, kromozomal veya plazmid aracılı olarak gelişebilmektedir. Diğer bakterilere aktarılamayan kromozomal dirençli mutantların çoğunda, transport sistemlerindeki mutasyonlar nedeniyle direnç oluşmaktadır (100). Plazmidle dirençli hale gelen suşların ise genellikle çok dirençli oldukları bilinmektedir. Konjugasyon veya transformasyon yoluyla plazmidler diğer bakterilere aktarılabilir.

Fosfomisin direnci, ikisi kromozomal genlerle, biri ise plazmidlerle kodlanmak üzere üç mekanizma ile oluşmaktadır:

- 1) Fosfomisine azalmış geçirgenlik
- 2) Antibiyotiğin hedef bölgesi olan MurA'daki modifikasyonlar
- 3) Enzimatik inaktivasyon (101).

2.10.1. Fosfomisine Azalmış Geçirgenlik

Kromozomal olarak gelişen direnç mekanizmasıdır. *glpT* ve *uhpT* genlerindeki mutasyonlar sonucu direnç oluşmaktadır. Her iki sistem de siklik adenozin monofosfat tarafından regüle edilmektedir (102).

glpT ve *uhpT* genlerindeki mutasyonlarla gelişen fosfomisin direnci, *E. coli* ve *P.aeruginosa* izolatlarında tanımlanmıştır. *Acinetobacter baumannii*'deki kromozomal direnç ise tetrasiklin ve kloramfenikol direncinden de sorumlu *abrp* genindeki mutasyonlarla olmaktadır (103).

2.10.2. Antibiyotiğin Hedef Bölgesi Olan MurA'daki Modifikasyonlar

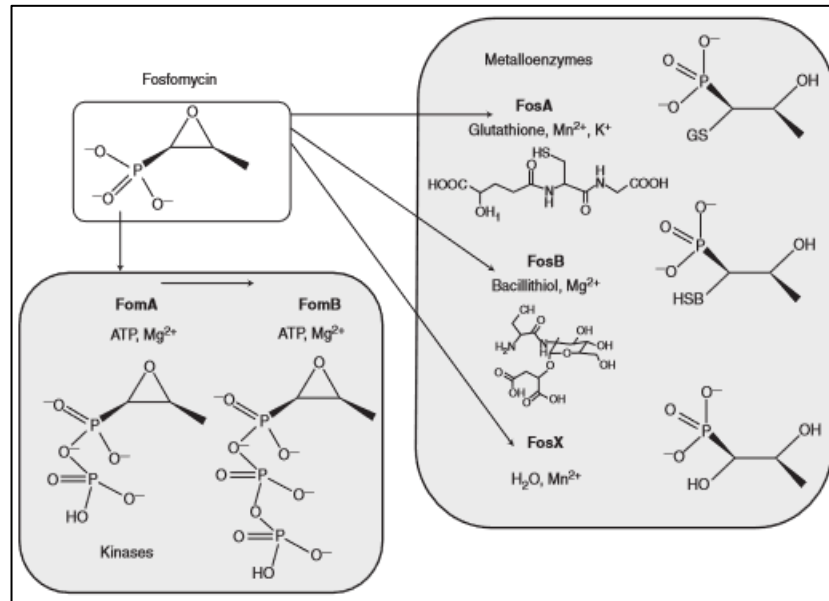
Fosfomisin direnciyle sonuçlanan başka bir kromozomal direnç mekanizması da, MurA enzimine (UDP-N-asetilglukozamin enolpiruvil transferaz) geri dönüşümsüz olarak bağlanarak enzimi etkisiz hale getiren antibiyotik hedefindeki modifikasyonudur. *E. coli*'de *murA* (sistein 115) genindeki mutasyonu, fosfomisine dirençle sonuçlanmaktadır (104).

Fosfomisin bakterilerdeki içsel direnç mekanizmaları nedeniyle de substrat hedefi olma özelliğini kaybetmektedir. *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Vibrio fischeri* ve *Borrelia burgdorferi* doğal olarak MurA'yı, sistein rezidisü yerine aspartat ile sunmaktadır. Bu nedenle fosfomisin ile etkileşime

girememekte ve içsel direnç oluşmaktadır (105-109). Klinik izolatlarda *murA* genindeki mutasyonlar nadir olarak gözlenmektedir. *E. coli*'nin *murA* sekansındaki mutasyonlar (Asp369→Asn ve Leu370→Ile) yakın zamanda *in vivo* olarak klinik bir izolatta bildirilmiştir (109). Bazı mikroorganizmalarda (*P. aeruginosa* ve *Pseudomonas putida*) peptidoglikan sentezinde MurA'dan bağımsız alternatif metabolik yolların kullanılması, bu bakterilerde görülen düşük fosfomisin duyarlılığına sebep olmaktadır (110).

2.10.3. Enzimatik İnaktivasyon

Enzimatik inaktivasyon direnç mekanizması, fosfomisin epoksit halkasının enzimatik bölünmesiyle ya da fosfonat grubunun fosforilasyonu ile etkisizleştirilmesine dayanmaktadır. Kovalent modifikasyonlarla fosfomisini inaktive eden çeşitli metalloenzimler; fosfonat kinazlar (FomA ve FomB), tiyol transferazlar, glutatyon fosfomisin (FosA), L-sistein-fosfomisin (FosB), ATP fosfomisin (FosC) ve su-fosfomisin (FosX)'dir (100, 111-113). Fosfomisin direncinden sorumlu olan fosfomisini modifiye edici enzimlerin kimyasal yapısı Şekil 2.3'te verilmiştir. FomA ve FomB, ATP ve Mg^{+2} kofaktör varlığında fosfomisinin fosfonat kısmına art arda fosfatlar ekleyen ve *Streptomyces wedmorensis*'den elde edilen kinazlardır (114).



Şekil 2.3. Fosfomisini modifiye edici enzimlerin kimyasal yapısı (86)

Günümüze kadar en az 10 çeşit enzim sentezleyen *fos* geni tanımlanmıştır. *fosA2* dışındaki bütün *fos* genleri plazmid kaynaklıdır. Ayrıca transpozonlar, insersiyon dizileri ve integronlar gibi mobilizasyon elemanlarının, *Enterobacterales*'de plazmid aracılı *fos* genlerinin yayılımında önemli roller oynadığı gözlemlenmiştir (115).

E. coli ve *K. pneumoniae* izolatlarında ortaya çıkan *fosA3*, *fosC2*, *bla_{TEM-1b}*, *bla_{CTX-M-65}* ve *rmtB* kodlayan, fosfomisin, penisilin, sefalosporin ve aminoglikozitlere çoklu dirence neden olan genler Asya'dan (Japonya, Güney Kore ve Çin) bildirilmiştir. Bununla birlikte, klinik izolatlarda fosfomisin direncinin moleküler mekanizmaları hakkında bilinenler sınırlıdır. Bu nedenle, klinik suşlarda fosfomisin direncinde yer alan moleküler mekanizmaların daha derinlemesine incelenmesi, gelecekte fosfomisinin enfeksiyonların tedavisindeki etkinliğini artırabilir (76). Ayrıca 2006'dan bu yana, Doğu Asya'daki bazı ülkelerdeki araştırmacılar, çoğunlukla CTX-M ile ilişkili bir konjugatif plazmid olan ve dünya genelinde direnç genlerinin yayılma vektörü olarak bilinen IncFII üzerinde birlikte bulunan *fosA3* geni bildirmişlerdir (116).

Mn⁺² ve K⁺ye bağımlı glutatyon-S-transferazı (GST) kodlayan ilk *fosA*, 1980'de *Serratia marcescens*'te transpozon TN2921'de rapor edilmiştir. *fosA* geninin *fosA2*, *fosA3*, *fosA4*, *fosA5*, *fosA6*, *fosA7*, *fosA8* gibi çeşitli homolog genleri, *E. coli* izolatlarında ve karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşlarında saptanmıştır (100).

Kromozomal yerleşimli *fosA2*, ilk olarak Kanada'daki Salmon Nehri'nden alınan su örneğinden izole edilen *Enterobacter cloacae* suşundan bildirilmiştir. Literatürde günümüze kadar başka bir *fosA2* bildiri yapılmamıştır (117).

fosA3, Asya ülkelerinde ve son zamanlarda Avrupa'da klinik ve çevresel *E. coli* izolatları arasında yayılan en yaygın *fos* gen çeşididir (118). Dünyanın birçok ülkesinde klinik örneklerden, evcil ve kümes hayvanlarından ve hayvan kaynaklı gıdalardan *fosA3* bildiri yapılmıştır. *fosA3* taşıdığı ilk bildirilen klinik *E. coli* izolatı Japonya'da 2006'da tanımlanmıştır, ancak *fosA3* taşıyan ilk çevresel *E. coli* izolatı 2004 yılında Çin'deki domuzlarda tanımlanmıştır. Evcil hayvan ve hayvan kaynaklı gıdalarda *fosA3*'ün farklı *bla_{CTX-M}* tipleri ile birlikte bulunabildiği gösterilmiştir (119).

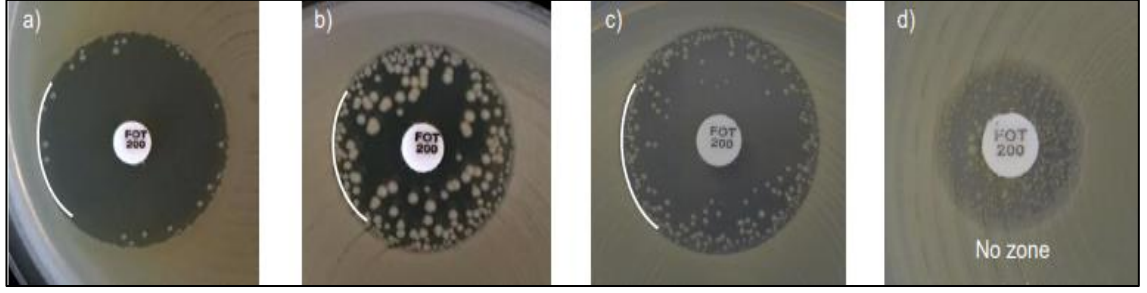
Plazmidlerde bulunan *fosC2*, *fosA* ile %56 oranında amino asit dizisi benzerliği paylaşmaktadır. *fosC2*, *fosA* gibi GST aktivitesi yoluyla fosfomisini değiştirmektedir. *fosC2*'nin sınıf 1 integronlarda farklı antibiyotik direnç genleriyle birlikte bulunabileceği gösterilmiştir. Ayrıca MDR izolatlarda plazmidlerde *fosC2* ve *bla_{IMP-34}*'ün beraber taşınabildiği saptanmıştır (120).

FosX, fosfomisinin epoksit halkasını kırmak için su kullanan, Mn^{+2} 'ye bağımlı hidrolazdır. *Mesorhizobium loti* ve *Desulfotobacterium hafniense* gibi intrinsik fosfomisin direncine sahip çevresel mikroorganizmalarda bulunmuştur. FosX enzimleri *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* ve *Brucella melitensis*'te bulunmaktadır (121).

İlk FosB tipi enzim, 1990 yılında *Staphylococcus epidermidis*'te gözlenmiştir (122). FosA and FosX enzimleri gram negatif bakteriler tarafından üretilirken, FosB enzimleri, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus aureus* gibi gram pozitif bakterilerde bulunmaktadır. *In vitro* sonuçlar, FosB enzimlerinin substrat olarak tiyoller (bacillithiol) ve kofaktör olarak Mg^{+2} metalini kullandığını göstermiştir. *S. aureus*'ta bulunan FosB kromozomal bir enzimdir (123).

2.11. Fosfomisine *in vitro* Duyarlılığı Belirleme Yöntemleri

EUCAST, fosfomisinin duyarlılığını belirleme yöntemi olarak agar dilüsyonu altın standart olarak belirlemiştir. Fosfomisin bileşiklerinin bakteri hücrelerine girişi, çoğu *Enterobacterales* üyesi bakteride G6F tarafından indüklenir (80). Fosfomisinin deneysel enfeksiyonlardaki etkinliği, G6F'nin eş zamanlı uygulanmasıyla artırılmıştır. Bu nedenle agar dilüsyon testinde besiyerinde 25 mg/L G6F bulunmalıdır. Sadece *E. coli*'nin idrar izolatları için 50 µg G-6-F içeren 200 µg'lık fosfomisin diski ile disk difüzyon testi kullanılmaktadır. Disk difüzyon sonuçları değerlendirilirken inhibisyon zonunun içindeki koloniler göz ardı edilmelidir. Fosfomisinin 200 µg'lık diskinde *E. coli* için inhibisyon zonu örnekleri Şekil 2.4'te verilmiştir (124).



Şekil 2.4. Fosfomisinin 200 µg'lık diskinde *Escherichia coli* için inhibisyon zon örnekleri

3. GEREÇ-YÖNTEM

3.1. İzolatların Toplanması ve Saklanması

Çalışmaya Şubat 2018 – Şubat 2019 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda orta akım idrar (n=277), nefrostomi (n=18), direkt üriner kateter (n=5) örneklerinden izole edilen toplam 300 adet *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* izolatu dahil edilmiştir. Her hastanın sadece tek bir örneği çalışmaya eklenmiştir.

Toplanan bakteriler çalışma için yapılan canlandırma işlemine kadar %10 gliserol içeren beyin kalp infüzyon buyyon içerisinde –20 °C'de saklanmıştır.

3.2. Mikrobiyolojik Kültür ve Tanımlama İşlemleri

3.2.1. Bakteri Tanımlama Yöntemleri

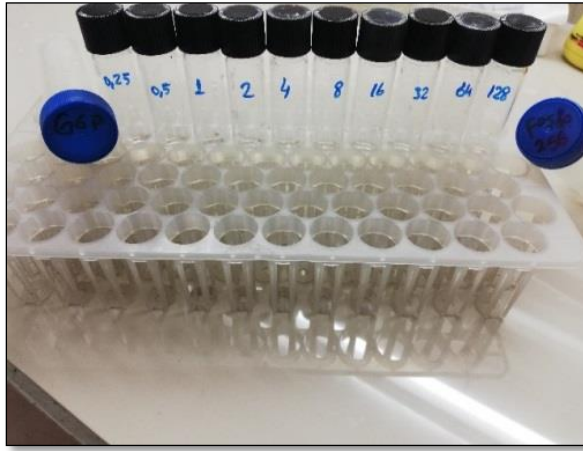
İzolatların tanımlanması ve karışık üreyen stok bakteri kültürlerinin doğrulanması için, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda kütle spektrometrisi temelli bir yöntem olan 'matriks destekli lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş süresi kütle spektrometrisi' (MALDI-TOF MS, Bruker, Almanya) kullanılmıştır.

3.2.2. İzolatların Fosfomisin Duyarlılıklarının Belirlenmesi İçin Kullanılan Agar Dilüsyon Yöntemi (125)

Fosfomisin Çözeltisinin Hazırlanması

1. İzolatların fosfomisin duyarlılıklarının belirlenmesinde fosfomisin toz antibiyotiği (Sigma- Aldrich, ABD) kullanılmıştır.
2. Fosfomisin 1000 potensle 12,8 mg tartılarak $V = w \times P / c$ formülüne göre 5120 mg/L stok çözeltisi hazırlanmıştır. (V: Sulandırıcı, w: Antibiyotik ağırlığı, P: Antibiyotik potensi, c: İstenilen konsantrasyon)
3. Fosfomisin (12,8 mg) 2,5 ml distile su ile sulandırılarak 256 mg/L konsantrasyon elde edilmiştir.
4. Fosfomisin 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 mg/L konsantrasyonlarının her biri için tüplere 1,2 ml distile su eklenmiştir.

5. Stok çözültiden alınan 1,2 ml çözülti, seri sulandırımın ilk basamağı olan 128 mg/L tüpüne eklenmiş ve karıştırılmıştır.
6. İlk (128 mg/L) tüpten alınan 1,2 ml çözülti 2. tüpe [64 mg/L] tüpüne aktarılmış ve karıştırılmıştır.
7. Son (0,25 mg/L) konsantrasyon tüpüne kadar aynı şekilde seri sulandırım uygulanmış ve son tüpten alınan 1,2 ml çözültinin atılmasıyla sulandırım sonlanmıştır. Fosfomisin sulandırmaları Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Fosfomisin sulandırmalarının hazırlanması

Fosfomisin Plaklarının Hazırlanması

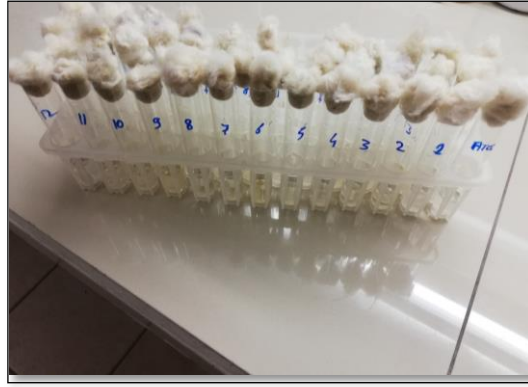
1. Her dilüsyon için bir adet katyonik Müller Hinton Agar (Merck, ABD) plağı (96 mm) hazırlanmıştır.
2. Katyonik Müller Hinton Agar (MHA) şişe içinde steril edilip su banyosunda 45 °C'ye soğutulmuş, içerisine 25 mg/L G-6-F eklenerek karıştırılmıştır.
3. Her plağa 19 ml MHA ve 1 ml antibiyotik çözültisi eklenmiştir. Plaklara antibiyotik çözültilerinin ve katyonik Müller Hinton Agar eklenmesi Şekil 3.2.'de verilmiştir.
4. İşlemin sonunda plaklar soğumaya bırakılmış, sonrasında plaklar kapakları açılarak kuruyana kadar etüvde tutulmuştur.



Şekil 3.2. Plaklara antibiyotik çözeltilerinin ve katyonik Müller Hinton Agar eklenmesi

İzolatların Ekime Hazırlanması

1. Toplanan *E. coli*, *Klebsiella* spp., *A. baumannii*, *P. aeruginosa* izolatlarına ait stok bakteri kültürleri oda sıcaklığında bekletilerek çözülmüştür.
2. Kanlı agar ve MacConkey agar plaklarına öze ile tek koloni ekim tekniği ile pasajları yapılmıştır. Besiyerleri 35 °C'lik etüvde 18-24 saat süreyle inkübe edilmiştir.
3. Üreyen suşların kanlı agardan alınan kolonileri 4 ml serum fizyolojik çözeltisi içinde süspanse edilmiştir.
4. Süspanse edilen çözeltiler, dansitometri cihazında 0,5 MacFarland bulanıklık değerine ayarlanmıştır.
5. İzolatları 1/10 oranında sulandırmak için, 0,5 MacFarland süspanسیونundan alınan 1ml'lik çözelti, 9ml'lik serum fizyolojik çözeltisine eklenmiş ve karıştırılmıştır. İzolatların serum fizyolojik içerisinde hazırlanması Şekil 3.3.'te verilmiştir.



Şekil 3.3. İzolatların serum fizyolojik çözeltisi içinde hazırlanması.

İzolatların Fosfomisin Plaklarına Ekimi

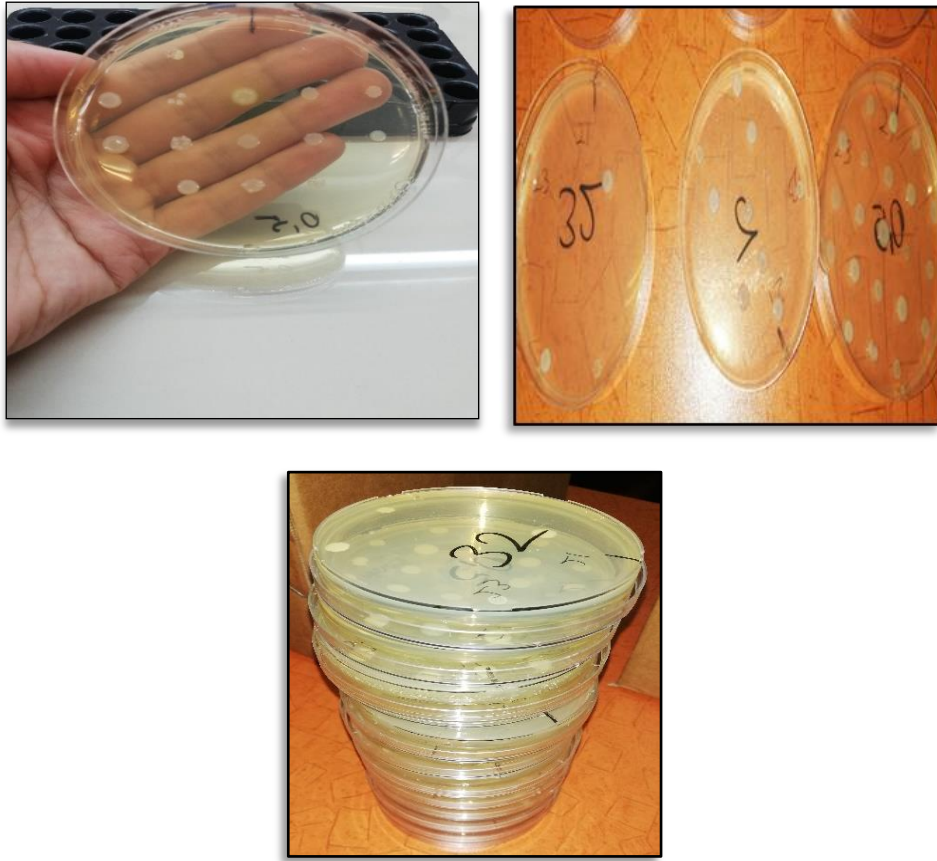
1. Çalışmada fosfomisine duyarlılık testi için EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)'in referans yöntem olarak belirlediği agar dilüsyon yöntemi çalışılmıştır.
2. Bu amaçla steril edilebilen 21 metal kuyucuklu, 3 mm çapında iğneleri olan ve 2 µL damlatabilen replikatörlere sahip agar dilüsyon cihazı kullanılmıştır (multipoint inoculator, Jencons, UK). Agar dilüsyon cihazı ve suşların plaklara ekimi Şekil 3.4.'te verilmiştir.
3. İlk kuyucuğa *E.coli* ATCC 25922 standart suşu olmak üzere kalan her kuyucuğa sulandırılmış bakteri kökenlerinden hazırlanan 10 ml'lik serum fizyolojik çözeltilerinden 1'er ml alınarak eklenmiştir.
4. Ekleme işlemi tamamlandıktan sonra, 11 konsantrasyonun her bir plağı cihazın ilgili bölümüne yerleştirilmiş, cihazın pedal kısmına basılarak çivilerin plağa ekimi yapılmıştır.



Şekil 3.4. Agar dilüsyon cihazı ve suşların plaklara ekimi.

Fosfomisin Plaklarının Değerlendirilmesi

1. 24 saat 35 °C’de inkübe edilen plaklar değerlendirilmeye alınmıştır.
2. Kolonilerin yoğun zon olarak gözle görülebilmesi üreme olarak kabul edilmiştir.
3. *E.coli* ATCC 25922 standart suşu için EUCAST’te verilen referans aralığı olan 0,25 –2 mg/L değerleri dikkate alınmıştır.
4. 0,25 mg/L konsantrasyondan başlayarak her bir suş için üremenin olmadığı ilk plak konsantrasyonu MİK değerini vermiştir.
5. Duyarlılık ve direnç durumu EUCAST v.8.1.’da belirtilen sınır değerlerine göre belirlenmiştir.
6. Fosfomisin için MİK \leq 32 mg/L olarak bulunan izolatlar duyarlı kabul edilmiştir. Fosfomisin plaklarının değerlendirilmesi Şekil 3.5.’te verilmiştir.

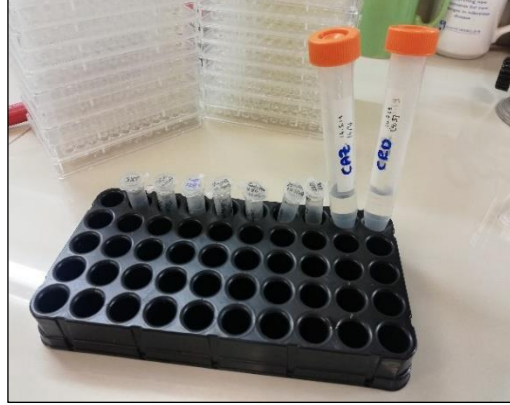


Şekil 3.5. Fosfomisin plaklarının değerlendirilmesi.

3.2.3. Fosfomisin Dışındaki Sulandırılmış Antibiyotiklerin Hazırlanması ve Saklanması

1. Amikasin, gentamisin, seftazidim, seftriakson, meropenem, piperasilin/tazobaktam, siprofloksasin, tigesiklin, TMP/SMZ, kolistin antibiyotiklerinin toz hali Sigma-Aldrich (ABD)'den sağlanmıştır.
2. $V = w \times P / c$ formülüne göre her antibiyotik için gereken toz miktarı tartılıp sulandırılmıştır. Başlangıç konsantrasyonları amikasin, gentamisin, seftazidim, seftriakson, meropenem, piperasilin/tazobaktam antibiyotikleri için 256 mg/L; siprofloksasin, tigesiklin, TMP/SMZ ve kolistin antibiyotikleri için 32 mg/L'den başlanmış, hazırlanan stok çözeltiler mikrosantrifüj tüpleri içinde çalışılana kadar -20° 'de tutulmuştur. Mikrosantrifüj tüplerinde saklanan antibiyotik çözeltileri Şekil 3.6.'da verilmiştir.

3. TMP/SMZ 1:19'luk, piperasilin/tazobaktam ise 1:4'lük konsantrasyonlarla hazırlanmıştır.



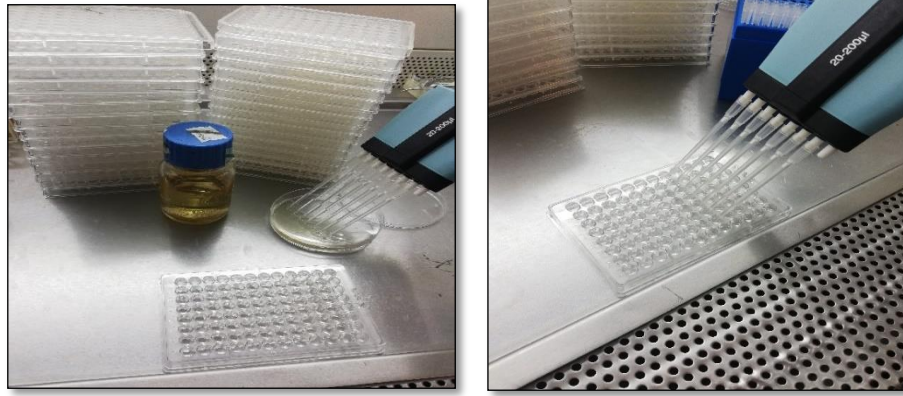
Şekil 3.6. Mikrosantrifüj Tüplerinde Saklanan Antibiyotik Çözeltileri

3.2.4. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

1. Steril otomatik pipetlerle (8 kanallı) 96 kuyucuklu steril U tabanlı mikropalakların tüm kuyucuklarına 50 µl MHB (Mueller Hinton Broth) dağıtılmıştır. Bir mikropalakta her suşun, 7 antibiyotik için seri dilüsyonu hazırlanmıştır. En alttaki sağda ve solda bulunan kuyucuklar besiyeri ve üreme kalite kontrolü olarak kullanılmıştır. Her antibiyotik için pozitif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşları ve ayrıca kolistin için *mcr-1* pozitif *E. coli* NCTC 13846 standart suşları çalışılmıştır.
2. Oda sıcaklığında çözülerek vortekslenen antibiyotik çözeltilerinden alınan 50'şer µl, mikropalağın en solunda bulunan ilk kuyucuklara yukarıdan aşağıya sırayla eklenmiştir.
3. İlk kuyucuktaki antibiyotiklerden alınan 50'şer µl, 12. kuyucağa kadar sulandırılmış, 12. kuyucuktan alınan 50 µl karışım ise dışarı atılmıştır. MHB besiyerinin mikropalak kuyucuklarına otomatik pipetle 50'şer µl dağıtılması ve her antibiyotik için seri dilüsyon yapılması Şekil 3.7.'de verilmiştir.
4. Standart inokulum için, 24 saat önceden kanlı agara pasajlanmış taze kültürden bakteri kolonileri alınarak doğrudan koloni süspansiyonu hazırlanmıştır. Her suş, serum fizyolojik (SF) içerisinde 0,5 MacFarland

bulanıklığa (2×10^8 koloni oluşturan birim; KOB/ml) süspansiyon edilmiş, bulanıklıklar dansitometre ile okunmuştur. Bulanıklıkların dansitometre cihazıyla saptanması Şekil 3.8.'de verilmiştir.

5. Bulanıklığı 0,5 MacFarland olarak ayarlanan tüpten 100 µl alıp 9900µL Mueller-Hinton Broth (Merck, ABD) besiyeri içeren tüpe aktarılmıştır. Vortekslenen tüp içindeki bakteri süspansiyonu, besiyeri ve antibiyotik karışımı içeren her bir kuyucuğa 50'şer µl olarak eklenmiştir.
6. Kurumayı engellemek için kapakla kapatılan mikrodilüsyon plakları, 35°C'de 24 saat süre ile etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
7. Mikroplaklardaki antibiyotik duyarlılık sonuçları Şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.7. MHB besiyerinin mikropalak kuyucuklarına otomatik pipetle 50'şer µl dağıtılması ve her antibiyotik için seri dilüsyon yapılması.



Şekil 3.8. Bulanıklıkların dansitometre cihazıyla saptanması.

3.2.5. Piperasilin /Tazobaktam İçin Sıvı Mikrodilüsyon

1. Piperasilin/tazobaktam kombinasyonunda, çalışılan diğer antibiyotiklerden farklı olarak tazobaktam son aşamada sabit konsantrasyonda tüm kuyucuklara eklenmiştir.
2. Piperasilin 20 mg tartılarak $V = w \times P / c$ formülüne göre 2048 mg/L stok zeltisi olarak hazırlanmıştır. (V: Sulandırıcı, w: Antibiyotik ağırlığı, P: Antibiyotik potensi, c: İstenilen konsantrasyon)
3. Piperasilin (20 mg) 8,78 ml su ile sulandırılarak 2048 mg/L konsantrasyon elde edilmiş, diğer kullanımlar için mikrosantrifüj tüplerine birer ml hacimlerde dağıtılarak olarak -20 C'de dondurulmuştur.
4. Tazobaktam (10 mg) 5,62 su ile sulandırılarak 1600 mg/L konsantrasyon elde edilmiş, mikroplağa eklenecek son konsatrasyonu olan 16 mg/L'ye kadar sulandırılmıştır.
5. Dağıtılan 50'şer μ l'lik MHB'nin üzerine ilk olarak 2048 mg/L piperasilin eklenerek 12. kuyucuğa kadar seri dilüsyon yapılıp son kuyucuktaki 50 μ l'lik karışım atılmıştır.
6. Plaktaki her kuyucuğa 50'şer μ l 16 mg/L tazobaktam konulmuş, zerine 0,5 MacFarland bulanıklığa sahip, 1/100 oranında sulandırılan bakteri süspansiyonundan 100 μ l eklenmiştir. Mikroplaklardaki duyarlılık sonuçları aynada değerlendirilmiştir.



şekil 3.9. Mikroplakların aynada değerlendirilmesi.

3.3. Moleküler Yöntemlerle Fosfomisin Direncinin Saptanması

3.3.1. DNA İzolasyonu

1. Çalışmaya alınan her bir izolat tek koloni ekim yöntemi ile kanlı agara ekim yapıldıktan sonra besiyerleri 35 °C’de normal atmosfer şartlarında 18-24 saat inkübe edilmiştir. Bakteri kültüründen alınan tek bir koloni, 2 ml MHB’a ekildikten sonra 37 °C’de 18 saat çalkalayıcı etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
2. Sıvı besiyerinde üreyen bakteri süspansiyonu 3 dakika 3000 xg’de santrifüj edilmiştir.
3. Üstte kalan sıvı aspire edildikten sonra dipteki çökelti üzerine 750 µl Tris/EDTA (TE) tamponu eklenerek vortekslenmiş, 1,5 ml hacminde mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
4. Süspansiyon tekrar 1 dakika 12.000 xg’de santrifüj edilmiş ve üstteki sıvı atılmıştır.
5. Kalan çökeltinin üzerine 750 µl TE tamponu eklenerek birkaç kez pipetaj işlemi uygulanmıştır. Tüpler vortekslenmiş ve mikrosantrifüjde 1 dakika 12.000 xg’de santrifüj edilmiştir.
6. Üstteki sıvı atıldıktan sonra yıkama işlemi en az 3 kez tekrarlanmıştır. En son basamakta yıkama sonrası dipteki çökeltiye 500 µl TE tamponu eklenerek tüpler kuru ısı bloğunda 15 dakika 100 °C’de bekletilmiştir.
7. Bloktan çıkarılan tüpler 12.000 xg’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından dipteki çökeltiye dokunulmadan üstteki sıvı, steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
8. İzolasyon sonrası elde edilen DNA -20°C’de saklanmıştır.

3.3.2. *fosA3*, *fosA*, *fosC2*, *bla_{CTX-M}* Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi

Fosfomisine dirençli izolatlara Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemiyle *fosA3*, *fosA*, *fosC2* genleri; *fosA3* dirençli saptanan izolata ise *bla_{CTX-M}* geni bakılmıştır. Çalışmamızda *fosA3*, *fosA* ve *fosC2* genleri için, pozitif kontrol suşu Dr. Luisia Pexie (Porto Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Porto, Portekiz)’den temin edilmiştir.

3.3.3. *fosA3* Geninin PZR İle Amplifikasyonu

PZR koşulları Hou ve ark. (126)'nın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Aşağıda belirtilen primerler 100 pmol/μl sulandırılarak kullanılmıştır.

Kullanılan Primerler (115):

| | |
|--------------|---|
| <i>fosA3</i> | F- 5'-GGC ATT TTA TCA GCA GT-3' (350bp) |
| <i>fosA3</i> | R-5'-AGA CCA TCC CCT TGT AG-3' |

PZR karışımının hazırlanması: PZR karışımının içeriği Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. *fosA3* geni için hazırlanan PZR karışımının içeriği.

| İçerik | Hacim | Son konsantrasyon |
|---------------------------|---------|-------------------|
| Su | 13,7 μl | |
| Taq DNA tampon (10x) | 2,5 μl | 1x |
| MgCl ₂ (25 mM) | 2,5 μl | 2.5 mM |
| dNTP (10 mM) | 0,5 μl | 200μM |
| Primer F (100 pmol) | 0,3 μl | 30 pmol |
| Primer R (100 pmol) | 0,3 μl | 30 pmol |
| Taq polimeraz (5 U/μl) | 0,2 μl | 1 U |
| DNA | 5,0 μl | |
| Toplam Hacim | 25 μl | |

PZR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile yapılmıştır. Amplifikasyon programı aşağıdaki gibidir;

- 1) İlk denatürasyon: 94°C 5 dakika
- 2) Denatürasyon: 94°C 30 saniye

- 3) Primer birleşmesi: 57,5°C 30 saniye
 4) Uzama: 72 °C 1 dakika

Yukarıdaki basamaklar toplamda 30 döngü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ardından 72 °C’de 7 dakika son uzama basamağı yapılmış ve reaksiyon sonlandırılmıştır.

3.3.4. *fosA* Geninin PZR Protokolü

PZR koşulları Hou ve ark. (126)’nın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Aşağıda belirtilen primerler 100 pmol/μl sulandırılarak kullanılmıştır.

Kullanılan Primerler (115):

| | |
|-------------|--|
| <i>fosA</i> | F-5’-ATC TGT GGG TCT GCC TGT CGT-3’ (271 bp) |
| <i>fosA</i> | R-5’-ATG CCC GCA TAG GGC TTCT-3’ |

PZR karışımının hazırlanması: PZR karışımının içeriği Tablo 3.2.’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. *fosA* geni için hazırlanan PZR karışımının içeriği.

| İçerik | Hacim | Son konsantrasyon |
|---------------------------|---------|-------------------|
| Su | 13,7 μl | |
| Taq DNA tampon (10x) | 2,5 μl | 1x |
| MgCl ₂ (25 mM) | 2,5 μl | 2.5 mM |
| dNTP (10 mM) | 0,5 μl | 200 μM |
| Primer F (100 pmol) | 0,3 μl | 30 pmol |
| Primer R (100 pmol) | 0,3 μl | 30 pmol |
| Taq polimeraz (5 U/μl) | 0,2 μl | 1 U |
| DNA | 5,0 μl | |
| Toplam Hacim | 25 μl | |

PZR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile yapılmıştır. Amplifikasyon programı aşağıdaki gibidir;

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

Yukarıdaki basamaklar toplamda 30 döngü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ardından 72 °C'de 7 dakika son uzama basamağı yapılmış ve reaksiyon sonlandırılmıştır.

3.3.5. *fosC2* Geninin PZR Protokolü

PZR koşulları Hou ve ark. (126)'nın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Aşağıda belirtilen primerler 100 pmol/μl sulandırılarak kullanılmıştır.

Kullanılan Primerler (115):

| | |
|--------------|--|
| <i>fosC2</i> | F- 5'-CGA GCC AAG ATT ACT GT-3' (196bp) |
| <i>fosC2</i> | R-5'-AAC GAT TCC AAA CGA CT-3' |

PZR karışımının hazırlanması: PZR karışımının içeriği Tablo 3.3.'te özetlenmiştir.

Tablo 3.3. *fosC2* geni için hazırlanan PZR karışımının içeriği.

| İçerik | Hacim | Son konsantrasyon |
|---------------------------|---------|-------------------|
| Su | 13,7 μl | |
| Taq DNA tampon (10x) | 2,5 μl | 1x |
| MgCl ₂ (25 mM) | 2,5 μl | 2.5 mM |
| dNTP (10 mM) | 0,5 μl | 200μM |
| Primer F (100 pmol) | 0,3 μl | 30 pmol |
| Primer R (100 pmol) | 0,3 μl | 30 pmol |
| Taq polimeraz (5 U/μl) | 0,2 μl | 1 U |
| DNA | 5,0 μl | |
| Toplam Hacim | 25 μl | |

PZR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie 96, ABD) cihazı ile yapılmıştır.

Amplifikasyon programı aşağıdaki gibidir;

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

Yukarıdaki basamaklar toplamda 30 döngü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ardından 72 °C’de 7 dakika son uzama basamağı yapılmış ve reaksiyon sonlandırılmıştır.

3.3.6. *bla*_{CTX-M} PZR Protokolü

*bla*_{CTX-M} PZR protokolü aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerler 100 pmol/μl olacak şekilde sulandırılmıştır. Pozitif kontrol suşu kullanılmıştır.

Kullanılan Primerler (127):

| | |
|-----------------------------|--|
| <i>bla</i> _{CTX-M} | F -5’-TCT TCC AGA ATA AGG AAT CCC-3’ (909 bp) |
| <i>bla</i> _{CTX-M} | R - 5’ - CCG TTT CCG CTA TTA CAA AC-3’ |

PZR karışımının içeriği Tablo 4’te özetlenmiştir

Tablo 3.4. *bla*_{CTX-M} geni için hazırlanan PZR karışımının içeriği.

| İçerik | Hacim | Son konsantrasyon |
|-------------------------------|---------|-------------------|
| Su | 15,0 μl | |
| <i>Taq</i> DNA tampon (10x) | 2,5 μl | 1x |
| MgCl ₂ (25mM) | 2,5 μl | 2,5 mM |
| dNTP (10 mM) | 0,5 μl | 200 μM |
| PrimerF (100 pmol) | 0,3μl | 30 pmol |
| PrimerR (100 pmol) | 0,3μl | 30 pmol |
| <i>Taq</i> polimeraz (5 U/μl) | 0,2μl | 1 U |
| DNA | 5,0μl | |
| Toplam Hacim | 25 μl | |

PZR Koşulları: DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.4.'te gösterilmiştir. Amplifikasyon programı (128) nolu referanstan modifiye edilmiştir.

Amplifikasyon programı;

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

olacak şekilde toplam 35 döngü olarak programlanmıştır. Amplifikasyonun sonunda 72°C'de 3 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırılmıştır.

3.3.7. Agaroz Jel Elektrofrez

1) Steril olarak hazırlanan 50xTAE (242 g TRIS; 57.1 ml glasiyal asetik asit, 0.5 M EDTA, pH 8) çözeltisinden 20 ml alıp 1 litre distile suya tamamlanarak 1xTAE tamponu hazırlanmıştır.

2) Agaroz jel, 220 ml 1xTAE içine %1 oranında agaroz eklenerek hazırlanmıştır. Tampon çözelti içerisindeki agaroz mikrodalga fırında eritildikten sonra 45-50 °C'ye soğutulmuş ve içerisine 25 µl etidyum bromür çözeltisi eklenmiştir. Düz bir zeminde agarozun döküleceği kalıp hazırlanıp jel dökülerek bir süre katılaşması beklenmiştir. Önceden hazırlanan 1xTAE tampon çözeltisi, jelin üzerini tamamen kapatacak şekilde jelin yürütüleceği tank içine dökülmüştür.

3) PZR ürünlerinin herbirinden 5 µl alınıp, 10 µl orange G yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara sırayla yüklenmiştir. Moleküler ağırlık belirteci olarak 100 bp ladder (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, ABD) kullanılmıştır.

4) PZR ürünleri 120 voltta 60 dakika yürütülerek jel elektrofrez gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel distile su ile yıkanarak etidyum bromürün jelden uzaklaştırılması sağlanmış, BioSpectrum 500 (UVP, Cambridge, Birleşik Krallık) cihazı ile ultraviyole ışık altında incelenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmaya Alınan İzolatların Klinik ve Demografik Özellikleri

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na Şubat 2018 – Şubat 2019 yılları arasında yatan hastalardan gönderilen idrar yoluyla ilişkili örneklerden [orta akım idrar (n=277), nefrostomi (n=18), direkt kateter (n=5)] ardışık olarak izole edilen 300 adet izolat çalışılmıştır. Çalışmaya, her hastadan alınan tek bir örnek dahil edilmiştir. İzole edilen etkenler arasında *E. coli* %78,3 ile birinci sırada yer almaktadır. 300 erişkin hastanın, 228 (%76)'sinin kadın, 72 (%24)'sinin ise erkek olduğu tespit edilmiştir. Laboratuvara gelen örnek türleri bazında çalışılan örneklerin %92,3'ü orta akım idrardır. Çalışmada en çok örnek toplanan servis dahiliye birimleri olmuştur. Çalışmaya alınan örneklerin klinik servislere göre dağılımı Tablo 4.1'de, çalışmadaki hastaların demografik özellikleri, örnek türleri ve izole edilen etkenlerin türlere göre dağılımı Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Örneklerin izole edildiği klinik servislere göre dağılımı.

| Klinik Servisler | (%) | (n) |
|--------------------|------|-----|
| Dahiliye birimleri | 52,7 | 158 |
| Cerrahi birimler | 36,3 | 109 |
| Onkolojik birimler | 11,0 | 33 |

Tablo 4.2. Çalışmadaki hastaların demografik özellikleri, örnek türleri ve izole edilen etkenlerin türlere göre dağılımı.

| Demografik özellikler,örnek türleri ve etken türleri | Sayı (n) | Yüzde (%) |
|--|----------|-----------|
| <u>Cinsiyet</u> | | |
| Kadın | 228 | 76,0 |
| Erkek | 72 | 24,0 |
| <u>Örnek türleri</u> | | |
| Orta Akım İdrar | 277 | 92,3 |
| Nefrostomi | 18 | 6,0 |
| Direkt Kateter | 5 | 1,7 |
| <u>Etken Türleri</u> | | |
| <i>E.coli</i> | 235 | 78,3 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 56 | 18,7 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 7 | 2,3 |
| <i>A. baumannii</i> | 2 | 0,7 |

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Üç yüz *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* izolatının antibiyotiklere duyarlılıkları fosfomisin için agar dilüsyon; amikasin, gentamisin, seftazidim, seftriakson, meropenem, siprofloksasin, tigesiklin, TMP/SMZ, kolistin, piperasilin/tazobaktam için mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Duyarlılık sonuçları EUCAST (2018; v.8.1) uluslararası standartlarına göre değerlendirilmiştir (152). Tablo 4.3'te çalışmada kullanılan antibiyotikler için EUCAST v. 8.1'de belirtilen sınır değerler (mg/L), çalışılan tüm bakterilerin antibiyotiklere *in vitro* duyarlılıkları Tablo 4.4'te verilmiştir. Çalışılan tüm antibiyotikler için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo 4.5'te, *K. pneumoniae* izolatlarının antibiyotiklere *in vitro* duyarlılığı Tablo 4.6'da ve *E. coli* izolatlarının antibiyotiklere *in vitro* duyarlılığı Tablo 4.7.'de gösterilmiştir. İzole edilen yedi *P.aeruginosa* izolatının ikisi (%28,5) ve iki *A.baumannii* izolatının ise tamamı (%100) fosfomisine dirençli saptanmıştır.

Tablo 4.3. Çalışmada kullanılan antibiyotikler için EUCAST v. 8.1'de belirtilen sınır değerler (mg/L)

| Antibiyotikler | Duyarlı (S) (mg/L) | Dirençli (R) (mg/L) |
|------------------------|-----------------------|------------------------|
| Amikasin | ≤8 | >16 |
| Gentamisin | ≤2 | >4 |
| Seftazidim | ≤1 | >4 |
| Seftriakson | ≤1 | >2 |
| Meropenem | ≤2 | >8 |
| Siprofloksasin | ≤0,25 | >0,5 |
| Tigesiklin | ≤1 | >2 |
| TMP/SMZ | ≤2 | >4 |
| Kolistin | ≤2 | >2 |
| Piperasilin/tazobaktam | ≤8 | >16 |
| Fosfomisin | ≤32 | >32 |

Tablo 4.4. Çalışılan tüm bakterilerin antibiyotiklere *in vitro* duyarlılıkları (n=300)

| Antibiyotik | Duyarlı n (%) | Orta n (%) | Dirençli n (%) |
|-------------------------|---------------|------------|----------------|
| Amikasin | 283 (94,4) | 7 (2,3) | 10 (3,3) |
| Gentamisin | 241 (80,3) | 3 (1,0) | 56 (18,7) |
| Seftazidim | 207 (69,0) | 15 (5,0) | 78 (26,0) |
| Seftriakson | 190 (63,3) | 8 (2,7) | 102 (34,0) |
| Meropenem | 284 (94,7) | 3 (1,0) | 13 (4,3) |
| Siprofiloksasin | 147 (49,0) | 17 (5,6) | 136 (45,3) |
| Tigesiklin | 282 (94,0) | 6 (2,0) | 12 (4,0) |
| TMP/SMZ | 164 (54,7) | 2 (0,6) | 134 (44,7) |
| Kolistin | 279 (93,0) | - | 21 (7,0) |
| Fosfomisin | 280 (93,3) | - | 20 (6,6) |
| Piperasilin/ tazobaktam | 218 (72,7) | 10 (3,3) | 72 (24,0) |

Tablo 4.5. Çalışılan antibiyotiklerin tüm bakteriler için $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri (n=300)

| Antibiyotik | Aralık | $MİK_{50}$ (mg/L) | $MİK_{90}$ (mg/L) |
|------------------------|-------------|-------------------|-------------------|
| Amikasin | 0,125- >256 | 1 | 8 |
| Gentamisin | 0,125- >256 | 0,5 | 64 |
| Seftazidim | 0,125- >256 | <0,125 | 32 |
| Seftriakson | 0,125- >256 | <0,125 | 128 |
| Meropenem | 0,125- >256 | <0,125 | 0,25 |
| Siprofiloksasin | 0,015- >32 | 0,5 | 32 |
| Tigesiklin | 0,015- >32 | 0,125 | 0,5 |
| TMP/SMZ | 0,015- >32 | 0,0625 | >32 |
| Kolistin | 0,015- >32 | 0,25 | 2 |
| Fosfomisin | 0,25- >256 | 2 | 16 |
| Piperasilin/tazobaktam | 0,125- >256 | 2 | 256 |

Tablo 4.6. *E. coli* izolatlarının çalışılan antibiyotiklere *in vitro* duyarlılığı (n=235)

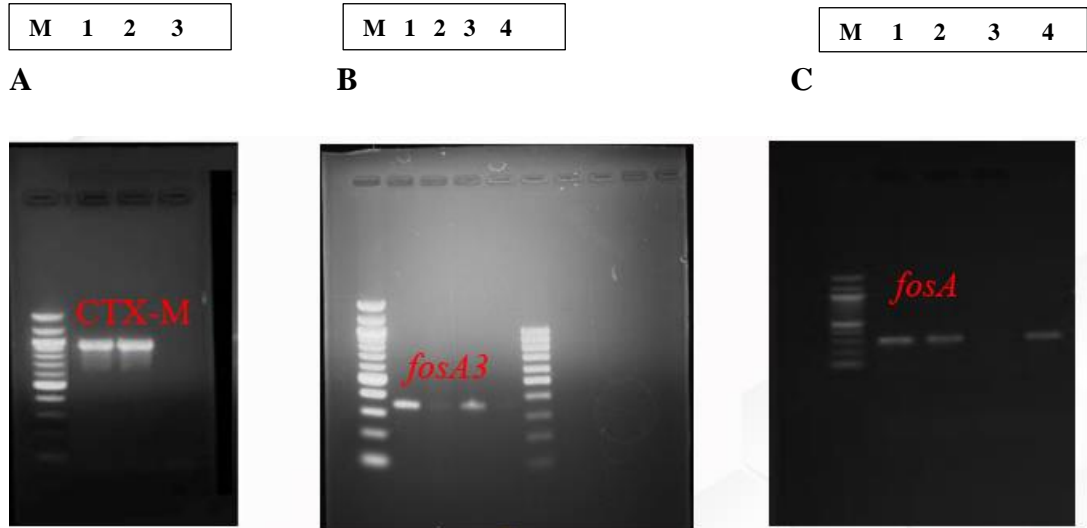
| Antibiyotik | Duyarlı n (%) | Orta n (%) | Dirençli n (%) |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Amikasin | 227 (96,6) | 6 (2,5) | 2 (0,9) |
| Gentamisin | 194 (82,5) | 2 (0,9) | 39 (16,6) |
| Seftazidim | 169 (72,0) | 12 (5,0) | 54 (23,0) |
| Seftriakson | 158 (67,2) | 5 (2,1) | 72 (30,7) |
| Meropenem | 231 (98,3) | 1 (0,4) | 3 (1,3) |
| Siprofiloksasin | 120 (51,0) | 14 (6,0) | 101 (43,0) |
| Tigesiklin | 229 (97,4) | 2 (0,9) | 4 (1,7) |
| TMP/SMZ | 132 (56,2) | 0 | 103 (43,8) |
| Kolistin | 223 (94,9) | - | 12 (5,1) |
| Fosfomisin | 228 (97,0) | - | 7 (3,0) |
| Piperasilin/ tazobaktam | 189 (80,4) | 8 (3,4) | 38 (16,2) |

Tablo 4.7. *K. pneumoniae* izolatlarının çalışılan antibiyotiklere *in vitro* duyarlılığı (n=56)

| Antibiyotik | Duyarlı n (%) | Orta n (%) | Dirençli n (%) |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Amikasin | 49 (87,5) | 1 (1,8) | 6 (10,7) |
| Gentamisin | 41 (73,2) | 0 | 15 (26,8) |
| Seftazidim | 34 (60,7) | 2 (3,6) | 20 (35,7) |
| Seftriakson | 29 (51,8) | 3 (5,4) | 24 (42,8) |
| Meropenem | 47 (84) | 1 (1,7) | 8 (14,3) |
| Siprofiloksasin | 23 (41,1) | 2 (3,6) | 31 (55,3) |
| Tigesiklin | 50 (89,2) | 3 (5,3) | 3 (5,3) |
| TMP/SMZ | 31 (55,4) | 1 (1,8) | 24 (42,8) |
| Kolistin | 50 (89,3) | - | 6 (10,7) |
| Fosfomisin | 47 (83,9) | - | 9 (16,1) |
| Piperasilin/ tazobaktam | 23 (41,1) | 2 (3,6) | 31 (55,3) |

4.3. Fosfomisine Direnç Mekanizmaları

Çalışılan 300 izolattan 20 izolat (%6, 6) fosfomisine dirençli bulunmuştur. Bu izolatların etkenlere göre dağılımı şöyledir: Dokuz *K. pneumoniae*, yedi *E.coli*, iki *A.baumannii*, iki *P.aeruginosa*. İki *K. pneumoniae* izolatında *fosA* direnç geni saptanmış, bunlardan bir izolatta *fosA* ve *fosA3* genleri birlikte bulunmuştur. İzolatların hiçbirinde *fosC2* geni tespit edilmemiştir. Ayrıca, *fosA* ve *fosA3* pozitif bulunan izolatın *bla_{CTX-M}* geni taşıdığı da belirlenmiştir. *K. pneumoniae* izolatının fosfomisin direnci saptanan *bla_{CTX-M}*, *fosA3* ve *fosA* PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. *K. pneumoniae* izolatının fosfomisin direnci saptanan *fosA3*, *fosA*, *fosC2* ve *bla_{CTX-M}* PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. A) M: 100 bp moleküler ağırlık belirteci. 1; *bla_{CTX-M}* pozitif izolat. 2; pozitif kontrol suşu. B) M: 100 bp moleküler ağırlık belirteci. 1; *fosA3* pozitif izolat. 3; pozitif kontrol. 4; negatif kontrol C) M: 100 bp moleküler ağırlık belirteci. 1; *fosA* pozitif izolat. 2; *fosA* pozitif izolat. 3; negatif kontrol. 4; pozitif kontrol.

5. TARTIŞMA

İdrar yolu enfeksiyonları toplumda en sık görülen enfeksiyonlardan biridir. Dünya genelinde her yıl yaklaşık 150 milyon İYE enfeksiyonu olgusu ile karşılaşmaktadır. İYE 20-50 yaş arasında, kadınlarda, erkeklere oranla daha sık görülmektedir. Çocuklarda ve erişkinlerde, kadınlarda ve erkeklerde, ayaktan ve yatan hastalarda, mevcut olan çeşitli risk faktörlerine göre enfeksiyon sıklığı ve etken mikroorganizma profili değişmektedir (129).

Gerek toplumdan kazanılmış, gerekse hastane kökenli İYE'lerin %95'ten fazlası tek bakteri türü tarafından oluşmaktadır. Tüm dünyada en sık izole edilen bakteri *E. coli*'dir (130). Diğer etkenler ise sıklık sırası değişmekle birlikte *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türleridir (131). Ülkemizde yapılan birçok çalışmada, yatan hastaların İYE'lerinde %35-80 oranlarda en sık izole edilen etken *E. coli*, ikinci olarak da *Klebsiella* türleridir (132-134). Çalışmamızda yatan hastaların idrar örneklerinden en sık *E.coli* (%78,3) izole edilmiştir. İkinci en sık izole ettiğimiz bakteri ise %18,7 ile *K. pneumoniae* olmuştur.

Birçok ülkede, İYE tedavisinde sık kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen direnç oranlarında artış görülmektedir. Ülkemizde de antibiyotik kullanımının yaygın olması nedeniyle oluşan antibiyotik direnci, özellikle gram negatif bakterilerde giderek önem kazanan bir sorun haline gelmiştir (135, 136). Yatan ve ayaktan başvuran hastalardan izole edilen bakterilerin antibiyotiklere direnç oranları karşılaştırıldığında, yatan hastalardan izole edilen izolatların genel olarak test edilen antibiyotiklere karşı daha dirençli olduğu gözlenmektedir (137, 138). Türkiye'de İYE tedavisinde sık kullanılan antibiyotikler arasında, direnç oranı araştırıldığında en yüksek direnç oranı ampisilin için bildirilmiştir. Ampisilini, TMP-SMZ ve siprofloksasin izlemektedir (139).

Ülkemizde İYE tedavisinde en sık reçete edilen antibiyotiklerden olan siprofloksasin ve TMP-SMZ'ye direnç oranları çalışmamızda sırasıyla, %45,3 ve %44,7 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda siprofloksasin ve TMP-SMZ'ye direnç oranları tür düzeyinde değerlendirildiğinde direnç oranları sırasıyla, *E. coli* izolatlarında %43 ve %43,8 iken, *K. pneumoniae*'da %55,3 ve %42,8 olarak saptanmıştır. Türkiye'de İYE etkeni *E. coli* izolatlarının duyarlılıklarının araştırıldığı çalışmalara bakıldığında TMP-SMZ için %29 ile %49 arasında değişen direnç

oranları görülmektedir (140, 141). Temiz ve ark.'nın (142) çalışmasında *E. coli*'nin TMP-SMZ direncini yatan hastalarında %54,6 oranında, *K. pneumoniae* izolatlarında ise %49,1 oranında bildirilmiştir. Pullukçu ve ark (131) ise, yatan hastalardan izole edilen *E. coli* izolatlarında TMP-SMZ direncini %58,4 oranında, siprofloksasin direncini de %47 oranında bulmuşlardır. TMP-SMZ'e *E. coli* izolatları arasında direnç dünyanın çeşitli bölgelerinde %10 ile %70 arasında değişmektedir. ECO.SENS II sürveyans programının verilerine göre komplike olmayan 147 üropatojen *E. coli* izolatında TMP-SMZ direnci %14,4 olarak bulunmuştur (143). Kashef ve ark.'nın (144) yaptıkları çalışmada ise üropatojen *E. coli* izolatlarında TMP-SMZ direnci %61,8 olarak rapor edilmiştir. ABD'de 2003-2012 döneminde yapılan çalışmada da *E. coli* kaynaklı İYE nedeniyle tedavi alan yetişkin kadınlarda TMP-SMZ direncinin %17,2'den %22,2' ye yükseldiği bildirilmiştir (12). Çalışmamızda idrar yolu örneklerinden izole ettiğimiz *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında saptadığımız TMP-SMZ direnç oranları literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Dünyada ve ülkemizde siprofloksasin direnç verileri bölgeler ve hastaneler arasında değişebilmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda İYE etkeni olarak izole edilen *E. coli* izolatlarında siprofloksasin direnci %17 ile %50 arasında değişmektedir (145, 146). Uslu ve ark (139), yatan hastalarda, *E. coli* izolatlarında siprofloksasin direnç oranını %48,7 olarak saptamıştır. Yüz bir çalışmayı derleyen bir meta analizde de, idrar kültürlerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında, 1996-2001 yıllarında %12,27, 2002-2007 yıllarında %23,16 ve 2008-2012 yıllarında ise %30,98 oranlarında, giderek artan siprofloksasin direnci bildirilmiştir (141). Demirci ve ark.'nın (147) 2018 yılında, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde idrar örneklerinden izole edilen 299 *E. coli* izolatıyla yaptıkları çalışmada siprofloksasin direnci %34,7 olarak saptanmıştır. Gupta ve ark.'nın (148) yaptığı bir çalışmada ise siprofloksasin direnci %80,7 gibi oldukça yüksek oranlarda tespit edilirken, Avrupa ülkelerini kapsayan ECO.SENS sürveyans programında bu oran %0,5-7,6 arasında saptanmıştır (149). ABD'den bildirilen bir çalışmada İYE tanısıyla tedavi alan yetişkin kadınlarda, *E. coli*'nin siprofloksasine direncinin, 2003-2012 yılları arasında %3,6'dan %11,8'e yükseldiği bildirilmiştir (12). Dünyada ve ülkemizde üropatojen *E.*

coli izolatlarında tespit edilen siprofloksasin direç oranları oldukça değişken olup, çalışmamızda da *E.coli* izolatlarında siprofloksasin direnci %43 olarak saptanmıştır.

Aykan ve ark.'nın (141) bildirdiği meta analizde de 1997-2007 yılları arasında idrar kültürlerinden izole edilen *E.coli* izolatlarının TMP-SMZ direncinde azalma, siprofloksasin direncinde artış saptanmıştır. İYE etkenlerinde TMP-SMZ direncindeki azalmanın, kinolonların İYE tedavisinde daha sık kullanılmasıyla birlikte TMP-SMZ kullanımının azalmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple yüksek direnç oranları göz önüne alındığında TMP-SMZ'nin ampirik tedavide uygun bir seçenek olmadığı ve yerel direnç verilerinin %20'nin altına indiği durumlarda tercih edilmesi gerekliliği belirtilmektedir (140).

İYE tedavisinde önemli bir yere sahip bir diğer antibiyotik grubu beta-laktamlardır. Bu antibiyotiklere karşı gelişen dirençte en sık karşılaşılan mekanizma bakterilerin sentezlediği beta-laktamazlardır. Beta laktam antibiyotiklerden 3. kuşak sefalosporinler, 1. ve 2. kuşak sefalosporinlere göre beta-laktamazlara daha dayanıklı olmakla birlikte, GSBL'ye duyarlıdırlar. Günümüzde gram negatif bakterilerde gözlenen yüksek GSBL oranı, seftriakson ve seftazidim direncini açıklamaktadır (150-152). Ülkemizde yapılan çalışmalarda İYE etkeni *E. coli* izolatlarında seftriakson direnci yatan hastalarda %3,9-%19,5 arasında bildirilmektedir (142). Yılmaz ve ark. (140), üropatojen *E. coli* suşlarının %14,9'unu seftazidime, %28'ini ise seftriaksona dirençli bulmuşlardır. Aykan ve ark.'nın (141) *E. coli* izolatlarında, 1996-2001, 2002-2007 ve 2008-2012 yılları arasında olmak üzere dönemlere ayırarak, seftriakson direncini derlediği meta analiz çalışmasında, seftriakson direnci sırasıyla %14,71, %13,59 ve %19,22 olarak saptanmıştır. Demirci ve ark.'nın (147) 2018 yılında yaptığı çalışmada da, *E. coli* izolatlarında seftriakson direnci %30,1 olarak tespit edilmiştir. Kuzey Amerika ve Avrupa izolatlarının değerlendirildiği SMART alışması kapsamında, yatan hastaların idrar örneklerinden izole edilen, *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında seftriakson duyarlılık oranları sırasıyla, %89 ve %92 olarak bildirilmiştir (153). Çalışmamızda da üropatojen *E. coli* izolatlarında seftriakson direnci %30,7, seftazidim direnci ise %23,0 olarak saptanmıştır. *K. pneumoniae* izolatlarında seftriakson ve seftazidim direnci sırasıyla %42,8 ve %35,7 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda tespit edilen sefalosporin direnç oranları, literatürdeki sefalosporin direnç oranlarına benzer bulunmuştur. Sefalosporinler

yatarak tedavi alan hastalarda, saptanan yüksek direnç oranlarından dolayı İYE tedavi seçeneği olarak dikkatli kullanılmalıdır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, İYE tedavisinde en etkin antibiyotikler amikasin, meropenem ve tigesiklin olarak bildirilmektedir. Uslu ve ark. (139), çalışmalarında yatan hastaların idrar örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında en düşük direnç oranlarını meropenem (%1,3), imipenem (%2,6) ve amikasin (%7,7) için saptamışlardır. Çetin ve ark. (31), üropatojen *E. coli* izolatlarında meropenem direncini %1, Eroğlu ve ark. (32), üropatojen *E. coli* izolatlarında amikasin direncini %3,4 olarak saptamışlardır. Akay ve ark. (135) ise çalışmalarında İYE etkeni *E. coli* izolatlarında en duyarlı antibiyotiklerin amikasin ve meropenem olduğunu tespit etmişlerdir. Demirci ve ark. (147) üropatojen *E. coli* izolatlarında en etkin antibiyotikleri meropenem (%0) ve amikasin (%1) olarak bildirmişlerdir. İpekçi ve ark.'nın (154) komplike İYE'den izole edilen *E. coli* suşlarında amikasin etkinliğini araştırdıkları çalışmasında ise, amikasin direncini %5,9 oranında bildirmişlerdir. Çalışmamızda test edilen antibiyotikler arasında amikasin (%3,3), tigesiklin (%4,0) ve meropenem (%4,3), ülkemizde yapılan diğer çalışmalara paralel olarak en etkin antibiyotik olarak bulunmuştur.

Aminoglikozidler, özellikle gram negatif bakterilerin etken olduğu İYE tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Üropatojenlerde görülen aminoglikozid direnciyle ilgili oranlar, ülkemizdeki çalışmalarda değişkendir. Yatan hastalardaki üropatojen *E. coli* izolatlarında gentamisin direncini, Doğru ve ark. (145) %0,7, Arslan ve ark. (146) ise %8 oranlarında saptarken, Yılmaz ve ark (33) %28 oranında gentamisin direnci bildirmişlerdir. Literatürde, ECO.SENS surveyans çalışmasında (143) üropatojen *E. coli* izolatlarında gentamisin direnci %1,3 oranında iken, Sharma ve ark.'nın (155) çalışmasında bu oran, %33,3 olarak tespit edilmiştir. Gupta ve ark. (148), 161 üropatojen *E. coli* izolatında gentamisin direncini %63,4 oranında bildirmişlerdir. Huang ve ark. (156) ise, yatan hastalardan izole edilen üropatojen *E. coli* izolatlarında amikasin direnci saptamamışlardır.

Ülkemizde gram negatif bakterilerde, amikasin ve gentamisin direnci yüksek oranda bildirilmemektedir. Çalışmamızda tüm test edilen izolatlarda, gentamisin direnci %18,7, amikasin direnci %3,3 olarak saptanmıştır. Tür bazında değerlendirildiğinde *E. coli* izolatlarındaki gentamisin direnci %16,6 oranında, *K.*

pneumoniae izolatlarında gentamisin direnci ise %26,8 oranında saptanmıştır. Bu direnç oranın literatüre göre yüksek bulunması Türkiye’de ve hastanemizde gentamisinin İYE dışında diğer enfeksiyon tedavilerinde de sık kullanımına bağlı olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda hastane kaynaklı İYE tedavisinde sık tercih edilen beta laktam/beta-laktamaz inhibitörlerinden piperasilin/tazobaktamın duyarlılığı test edilmiştir. Çalışmamızda *E. coli* izolatlarında piperasilin/tazobaktam direnci %16,2 iken, *K. pneumoniae* izolatlarında bu oran %55,3 olarak saptanmıştır. Türkiye’den bildirilen çalışmalara bakıldığında, Gülcan ve ark. (157), yatan hastalardan izole ettikleri 591 üropatojen *E. coli* izolatında piperasilin/tazobaktam direncini %23,7, 55 üropatojen *K. pneumoniae* izolatında ise bu oranı %33,3 olarak bildirmişlerdir. Temiz ve ark. (142), yatan hastalardan izole ettikleri 385 üropatojen *E. coli* ve 61 *Klebsiella* spp. izolatıyla yaptıkları çalışmada, piperasilin/tazobaktam direncini sırasıyla %35,2 ve %45,6 olarak bildirmişlerdir. Avrupa ve Kuzey Amerika’da yatan hastaların idrar örneklerinden toplanan *Enterobacterales* izolatlarıyla yapılan çok merkezli SMART çalışmasında (158), Kuzey Amerika’dan toplanan *E. coli* (n=859) ve *K. pneumoniae* (n=249) suşlarında piperasilin/tazobaktam direnci sırasıyla %4,5 ve %8,1 iken, Avrupa’dan toplanan *E. coli* (n=1382) ve *K. pneumoniae* (n=355) suşlarında direnç sırasıyla %7,5 ve %34,6 olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda *E. coli* suşlarında piperasilin/tazobaktam direnç oranı %16,2 olarak literatürde bildirilen oranlarla uyumlu bulunmuştur. *Enterobacterales* ile gelişen enfeksiyonların tedavisinde karbapenemlerle piperasilin/tazobaktam aktivitesini karşılaştıran çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, tedavi başarısında karbapenemlerin piperasilin/tazobaktama göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (159, 160). Çalışmamızda da meropenemde, piperasilin/tazobaktama göre daha düşük direnç oranları saptanmıştır. İYE tedavisinde piperasilin/tazobaktam kullanılırken yerel direnç oranları göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmamızda *E. coli* suşlarında piperasilin/tazobaktam düşük direnç oranı tespit edildiği için, hastanemizde İYE tedavisinde tercih edilebileceği öngörülmüştür. Ancak *K. pneumoniae*’da elde edilen yüksek piperasilin/tazobaktam için direnç oranı sebebiyle, *K. pneumoniae* ile gelişen İYE tedavisinde, piperasilin/tazobaktamdan kaçınılması gerektiği düşünülmüştür.

Direnç sorununun giderek arttığı günümüzde eski antibiyotiklerden biri olan ve tekrar gündeme gelen kolistin, nefrotoksisitesi ve direnç artışı kaygısı nedeniyle klinikte sadece çoklu ilaç direnci bulunan mikroorganizmalar (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) ile oluşan enfeksiyonlarda ve özellikle de kolistin dışındaki diğer antibiyotiklere direnç varlığında kullanılması önerilmektedir. Bu nedenle, kolistin, özellikle çok ilaca dirençli gram-negatif bakterilerin etken olduğu hastane kökenli İYE tedavisinde kullanılmaktadır (68, 161). İdrar yolu izolatlarında kolistine direnç oranı düşük seviyelerde seyretmektedir. Bununla birlikte, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* ve *Pseudomonas* spp.'de kolistin direnci gözlenebilmektedir (162, 163). Kolistin *in vitro* duyarlılığını belirlemede, EUCAST, altın standart yöntemi sıvı mikrodilüsyon test yöntemi olarak bildirmiştir (124). Literatürde, idrar yolu örneklerinden izole edilen bakterilerde, kolistin duyarlılık profilinin mikrodilüsyon test yöntemi ile çalışılarak bildirildiği kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Amladi ve ark. (164), idrar yolundan izole ettikleri karbapenem dirençli *Enterobacterales* izolatlarıyla yaptıkları çalışmada kolistin direncini 81 *E. coli* izolatında %5, 69 *K. pneumoniae* izolatında da %15 olarak saptamışlardır. Endimiani ve ark. (165) ise, 68 *bla_{KPC}* taşıyan *K. pneumoniae* izolatında kolistin direncini %7 oranında tespit etmişlerdir. Livermore ark (166), 81 üropatojen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatında kolistin direncini %7,4 oranında saptamışlardır. Çalışmamızda *E. coli* izolatlarında kolistin direnci %5,1 iken, *K. pneumoniae* izolatlarında bu oran %10,7 olarak literatür ile uyumlu saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda kolistine dirençli saptanan 21 izolatın 18 tanesi (%85,7) fosfomisine duyarlı bulunmuştur. Çalışmamız sonucunda kolistine dirençli izolatlarda da fosfomisin İYE tedavisinde iyi bir seçenek olabileceği düşünülmüştür.

Fosfomisin direnci, 1977'de, fosfomisine dirençli *E. coli* ve *Salmonella typhimurium* izolatlarının saptanmasıyla ortaya çıkmıştır (167). Gram negatif bakterilerde, fosfomisin direnç prevalansı ülkeler arasında ve bakteri türleri arasında değişiklik göstermektedir. Direnç mekanizması, bir bölgedeki direncin yayılmasında da önemli bir rol oynamaktadır. Fosfomisinin *in vitro* duyarlılığını belirlemede, EUCAST, altın standardı agar dilüsyon yöntemi olarak bildirmiştir. Ayrıca

fosfomisin duyarlılık testi çalışılırken ortama mutlaka G-6-F eklenmelidir. Aksi takdirde duyarlı izolatların dirençli saptanması gözlenebilmektedir (124).

Literatür taraması yapıldığında fosfomisine direnç oranı, insan ve hayvan konaklarında, dünyanın diğer bölgelerine göre Çin ve Asya'da daha yüksek saptanmıştır. Çin'deki *E.coli* izolatlarında fosfomisin direncinden sorumlu ana mekanizma *fosA3* kontrolünde enzimatik inaktivasyon olarak bildirilmiştir (168). Fosfomisinin genel direnç oranı diğer antibiyotiklere göre daha düşük olmasına rağmen, artan direnç önemli bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Çin'de yapılan çok merkezli bir çalışmada 2009-2010 yıllarında *E. coli* izolatlarında fosfomisin direnci araştırılmış, fosfomisin direnç oranı %7,8 olarak saptanmıştır (169). Cao ve ark. (168), 2010–2014 yıllarında idrar örneklerinden izole ettikleri *E. coli* izolatlarında fosfomisin direnç oranını %10 olarak bildirmiştir. Kanada'da 2010-2013 yılları arasında, idrardan izole edilen 868 *E. coli* izolatında fosfomisin duyarlılığı araştırılmış ve fosfomisin duyarlılığı %99,4 oranında bildirilmiştir (26). Yine Kanada'da 2007-2013 yılları arasında CANWARD sürveyans programı kapsamında yapılan bir başka çalışmada idrardan izole edilen *E. coli* izolatlarının fosfomisine duyarlılık oranı %96 olarak saptanmıştır (170). Ohio'dan yapılan iki çalışmada da idrardan izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarında fosfomisinin iyi etkinliğe sahip olduğu, kolistin ve tigesikline dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında fosfomisin duyarlılık oranlarının sırasıyla %92 ve %93 olduğu bildirilmiştir (165, 171).

Avrupa'da gerçekleştirilen çalışmalar, fosfomisinin uzun yıllardır kullanımına rağmen, Avrupa ülkelerinde fosfomisin direncinin düşük olduğunu göstermektedir. Çok merkezli yapılan bir Almanya çalışmasında, üropatojen *E. coli* izolatları arasında fosfomisine düşük direnç oranları (%1,2-%4,5) saptanmıştır (172, 173). ARESC (Antimicrobial Resistance Epidemiological Survey on Cystitis) çalışmasından elde edilen Fransa verilerinde, 409 *E. coli* idrar izolatında, fosfomisine duyarlılık oranı %99 olarak bildirilmiştir (173). Fransa'da yapılan bir diğer çalışmada da, fosfomisinin *E. coli* izolatlarında %93,7 duyarlılığa sahip olduğu, *K. pneumoniae* izolatlarında ise fosfomisin duyarlılık oranının %74,4 olduğu bildirilmiştir (174). İspanya'da 27 hastanenin katıldığı, 183 *E. coli* idrar izolatıyla yapılan çalışmada, fosfomisin direnci düşük (%9,1) saptanmasına rağmen, çalışma verileri yıllara göre incelendiğinde, son dört yılda fosfomisin direncinde önemli bir

artış olduğu tespit edilmiştir. Çalışmacılar, artan bu fosfomisin direnç oranını, İspanya’da fosfomisin kullanımının son yıllardaki artışına bağlamışlardır (175). İsviçre ve İtalya’dan bildirilen çalışmalarda da fosfomisin, üropatojen *E. coli* izolatlarında en etkin antibiyotik olarak bulunmuş ve fosfomisin duyarlılığı bu ülkelerde sırası ile %100 ve %98 oranlarında bildirilmiştir (176-178). İsveç’te yapılan çalışmalarda ise idrar örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında fosfomisin duyarlılık oranları %97-99 arasında değişmektedir (179, 180). Boston’da yapılan bir çalışmada, 2010-2013 yılları arasında 204 adet çok ilaca dirençli hastane kaynaklı gram negatif üropatojenin fosfomisin direnç oranı %19,9 olarak bulunurken, *Klebsiella* spp. izolatlarında bu oran %32 olarak saptanmıştır (181). Fosfomisin direnci hala tüm dünyada toplum kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen üropatojen izolatlarda düşük olsa da, özellikle hastane kaynaklı *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında yüksek fosfomisin direnç oranları bildirilmektedir.

Ülkemizde üropatojen *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında fosfomisin direncini altın standart yöntem olan agar dilüsyon yöntemi ile araştıran kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Türkiye’de Erdem ve ark. (30) Trakya Bölgesi’nde İYE’li 90 kadın hastayla yaptıkları çalışmada, *E. coli* izolatlarında fosfomisin duyarlılığını disk difüzyon yöntemi ile araştırmışlar ve fosfomisini, %5,5 direnç oranıyla İYE tedavisi için en etkili antibiyotik olarak bildirmişlerdir. Yılmaz ve ark. (140), 2008-2014 yılları arasında idrar kültürlerinden izole ettikleri 8975 *E.coli* izolatıyla yaptıkları çalışmada, fosfomisin duyarlılığını yine disk difüzyon yöntemi ile araştırmışlar ve fosfomisin direncini %4,3 oranında tespit etmişlerdir. Demirci ve ark. (147), üropatojen 299 *E.coli* izolatıyla yaptıkları çalışmada fosfomisin direncini agar dilüsyon yöntemiyle %2,7 oranında saptamışlardır. Çalışmamızda fosfomisin direnci altın standart yöntem olan agar dilüsyon yöntemi ile araştırılmış ve fosfomisin direnci *E. coli* izolatlarında %3,0 oranında, *K. pneumoniae* izolatlarında da %16,1 oranında saptanmıştır. Çalışmamızda *E.coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında elde ettiğimiz fosfomisin direnç oranı literatür ile uyumlu bulunmuştur. Çalışmamız verilerine dayanarak İYE etkenlerinde tespit edilen düşük fosfomisin direnç oranları doğrultusunda hastanemizde ve ülkemizde fosfomisinin İYE tedavisinde kullanılabileceği öngörülmüştür. Ayrıca çalışmamızda, İYE tedavisinde sıklıkla tercih edilen TMP-SMZ ve siprofloksasin dirençli *E.coli* ve *K. pneumoniae*

izolatlarında fosfomisin direnç oranı düşük olarak tespit edilmiştir. TMP-SMZ'ye dirençli 134 izolatın yedisi (%5,2) fosfomisin dirençli iken, siprofloksasine dirençli 136 izolatın sekizi (%5,9) fosfomisine dirençli saptanmıştır. Bu durum İYE tedavisinde sıklıkla tercih edilen bu iki antibiyotiğe dirençli izolatlarda, fosfomisin tedavisiyle yüksek oranda başarı elde edilebileceğine işaret etmektedir.

Üropatojen çok ilaca dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının, fosfomisine duyarlılıklarının 2010-2015 yılları arasında değerlendirildiği bir meta analizde, *K. pneumoniae* izolatlarının fosfomisine duyarlılığının %40-%97,5 arasında değiştiği görülmüştür (182). Literatürde, farklı bölgelerden bildirilen fosfomisin lokal duyarlılık verileri dikkate alındığında, MDR *K. pneumoniae* izolatlarıyla gelişen İYE tedavisinde, fosfomisinin antibiyotik duyarlılık test sonucuna göre kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır (183). Çalışmamızda da çok ilaca dirençli 56 *K. pneumoniae* izolatının %65,2'si (n=15) fosfomisine duyarlı olarak saptanmıştır. Bu veri doğrultusunda hastanemizde İYE tedavisinde MDR *K. pneumoniae* izolatlarında da, fosfomisinin iyi bir seçenek olabileceği ancak antibiyotik duyarlılık test sonucuna göre İYE tedavisinde yer alabileceği düşünülmüştür.

Literatürde fosfomisin direnciyle ilgili bildirilen çalışmalarda, *E. coli* ve *Klebsiella* izolatlarıyla yapılam çalışmalar ile karşılaştırıldığında, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatları ile yapılan az sayıda çalışma mevcuttur ve *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarında fosfomisin direnci, *E. coli* ve *Klebsiella* izolatlarına kıyasla daha yüksek oranda bildirilmektedir. Demir ve ark.(184)'nın yatan ve ayaktan tedavi alan hastaların idrar yolundan izole ettikleri 1562 *E. coli* ve 260 *K. pneumoniae* izolatında fosfomisin direncini sırasıyla %2,0 ve %6,9 saptarken, 75 *Pseudomonas* spp. ve 37 *A. baumannii* izolatında fosfomisin direncini sırasıyla %56,0 ve %48,6 olarak bulmuşlardır. Falagas ve ark.(185)'nin idrar izolatlarının da yer aldığı nonfermenter gram negatiflere fosfomisin direnci test edilen 19 çalışmadan derledikleri sonuca göre, 1693 *P. aeruginosa* izolatında %69,8 oranında fosfomisine direnç saptanmıştır. Çalışmamızda izole edilen yedi *P. aeruginosa* izolatının ikisi (%28,5) ve iki *A. baumannii* izolatının ise tamamı (%100) fosfomisine dirençli saptanmıştır. İzolat sayısının az oluşu, çalışmamızın *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* açısından kısıtlılığdır.

Fosfomisin direnci, kromozomal veya plazmid aracılı gelişebilmektir. Fosfomisin direnç geni *fosA3* ve *blaCTX-M* tipi GSBL genlerinin aynı plazmidler üzerinde bulunarak yayıldığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (126, 186, 187). İngiltere, İtalya ve İspanya gibi çeşitli Avrupa ülkelerinden CTX-M-15 taşıyan sporadik *K. pneumoniae* izolatları bildirilmektedir (188-190). Bu izolatlar çok merkezli çalışmalarda sunulan verilerde gösterildiği üzere, kısa sürede dünya çapında geniş yayılıma sahip olmuş, önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (191-193). Genetik elementlerin hareketliliği, klonal yayılımın artmasına katkı sağlayarak çok ilaca dirençli izolatların hastanelerde ve toplumda yayılmasına neden olmaktadır (191, 193). Kore, Japonya ve Çin'den bildirilen çalışmalarda *blaCTX-M* geni saptanan *E. coli* izolatlarında, fosfomisin direncinden sorumlu en yaygın mekanizmanın (%62,5), yatay olarak kazanılan *fosA3* geniyle olduğu bildirilmiştir (118, 120, 126). Asya ülkelerinde yapılan çalışmalarda, *fosA3* barındıran *E. coli* izolatlarında, aynı zamanada *blaCTX-M* tipi beta laktamaz üretiminin de varlığı gösterilmiş ve bu direnç mekanizmalarını taşıyan *E. coli* izolatlarının hem klinik ortamda hem de veterinerlik ortamında bulunduğunu gösterilmiştir (118-120). *Enterobacteriales* takımı üyeleri arasında *blaCTX-M* geninin geniş ölçüde yayılmış olması ve günümüzde fosfomisin kullanımının artması nedeni ile, fosfomisin direncinin yaygınlaşabileceği düşünülmektedir (119).

Günümüzde *blaCTX-M* tipi GSBL genlerini taşıyan plazmidler ile bağlantılı fosfomisine dirençli olgular sadece Asya ülkeleriyle sınırlı kalmaktadır (120). Literatürde, hem *fosA3* prevalansı hem de *fosA3*'ün *blaCTX-M* geni birlikteliği ilişkisiyle ilgili kısıtlı veri bulunmaktadır. Bu nedenle özellikle *fosA3* yayılımı ile ilgili küresel bir sürveyans çalışmasına ihtiyaç duyulmaktadır (115). Bizim çalışmamızda, Asya'dan bildirilen çalışmaları destekleyecek şekilde MDR bir *K. pneumoniae* izolatında *fosA*, *fosA3* ve *blaCTX-M* geni birlikte saptanmıştır. Ülkemizde klinik örneklerden izole edilen izolatlarda fosfomisin direnç genlerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bilgilerimiz doğrultusunda bu izolat Türkiye'den bildirilen ilk *fosA3* pozitif örnek olma özelliğini taşımaktadır. Ülkemizde fosfomisin direncinin moleküler tanımlamasını yapılacağı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Bakteriyojji Laboratuvarı'na Şubat 2018-Şubat 2019 tarihleri arasında gönderilen yatan hastaların idrar yolu örneklerinden izole edilen *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatları arasında, *E. coli* (n=235) %78,3 oranı ile ilk sırada yer almaktadır. İzolatların antibiyotiklere duyarlılıkları fosfomisin için agar dilüsyon; amikasin, gentamisin, seftazidim, seftriakson, meropenem, siprofloksasin, tigesiklin, TMP-SMZ, kolistin ve piperasilin/tazobaktam için sıvı mikrodilüsyon test yöntemi ile saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları EUCAST (2018; v.8.1) standartlarına göre değerlendirilmiştir.

İdrar yolu örneklerinden izole edilen *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarında test edilen antibiyotikler arasında en etkili antibiyotik amikasin olarak saptanmıştır. İYE tedavisinde TMP-SMZ ve siprofloksasin sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak çalışmamızda tedavide sıklıkla kullanılan TMP-SMZ ve siprofloksasine yüksek oranda direnç tespit edilmiştir. Bu nedenle hastanemizde, İYE tedavisinde bu iki antibiyotik kullanılırken dikkatli olunmalı ve izolatın antibiyotik duyarlılık test sonucuna göre tedavi planlanmalıdır.

Fosfomisin direnci, test edilen 300 izolat arasında sadece 20 izolatta (%6,6) saptanmıştır. Fosfomisinin idrar yolu örneklerinden izole edilen *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatları arasında *in vitro* duyarlılığının hala yüksek olması, hastanemizde İYE tedavisinde güvenle kullanılacak bir antibiyotik olduğunu düşündürmektedir.

Fosfomisine dirençli 20 izolatta [*K. pneumoniae* (n=9), *E. coli* (n=7), *A. baumannii* (n=2), *P. aeruginosa*.(n=2)] *fosA3*, *fosA*, *fosC2* direnç genleri araştırılmıştır. İki *K. pneumoniae* izolatında *fosA* direnç geni saptanmıştır. Bu iki *K. pneumoniae* izolatının birinde *fosA* geni ile birlikte *fosA3* geni de tespit edilmiştir. Ayrıca sadece bu *K. pneumoniae* izolatı, *bla_{CTX-M}* geni açısından da araştırılmış ve izolatın *bla_{CTX-M}* geni de taşıdığı saptanmıştır.

Enterobacterales'de, *bla_{CTX-M}* ve *fosA3* genlerinin aynı plazmid ile aktarıldığı çalışmalarda bildirilmiştir. *K. pneumoniae* izolatında saptadığımız *bla_{CTX-M}* ve *fosA3* gen bölgelerinin birlikteliği, direncin plazmid kaynaklı aktarılabileceğini düşündürmüştür. Ülkemizde *Enterobacterales*'de *bla_{CTX-M}* enziminin sıklıkla

saptanması, gelecekte bu izolatlarda fosfomisin direncinin artabileceği açısından endişe vericidir.

Sonuç olarak, hastaneler arasında İYE etkenlerinin dağılımı ve antibiyotik duyarlılık profilleri değişebilmektedir. Bu nedenle hastaneler, kendi izolatları için antibiyotik duyarlılık profillerini saptamalıdır. Çalışmamızda, idrar yolu örneklerinden izole edilen *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarında saptanan antibiyotik duyarlılık profilinin, hastanemiz ve ülkemizde İYE tedavisinin yönlendirilmesinde kaynak oluşturabileceğini düşünmekteyiz. Ülkemizde fosfomisin duyarlılık profilinin saptanmasında altın standart yöntem olan agar dilüsyon ile belirlenen fosfomisin duyarlılık oranları ile ilgili kısıtlı veri bulunmaktadır. Standart yöntem ile saptadığımız fosfomisin duyarlılık profilinin, hastanemiz ve ülkemiz için İYE tedavisinde fosfomisin kullanımında yol gösterici olduğunu düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Stamm WE, Norrby SR. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J Infect Dis.* 2001;183 Suppl 1:S1-4.
2. Foxman B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect Dis Clin North Am.* 2014;28(1):1-13.
3. Schappert SM, Rechtsteiner EA. Ambulatory medical care utilization estimates for 2007. *Vital Health Stat 13.* 2011(169):1-38.
4. Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol.* 2010;7(12):653-60.
5. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med.* 2014;370(13):1198-208.
6. Hooton TM. Clinical practice. Uncomplicated urinary tract infection. *N Engl J Med.* 2012;366(11):1028-37.
7. Nielubowicz GR, Mobley HL. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat Rev Urol.* 2010;7(8):430-41.
8. Hannan TJ, Totsika M, Mansfield KJ, Moore KH, Schembri MA, Hultgren SJ. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(3):616-48.
9. Tandogdu Z, Wagenlehner FM. Global epidemiology of urinary tract infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29(1):73-9.
10. Lichtenberger P, Hooton TM. Complicated urinary tract infections. *Curr Infect Dis Rep.* 2008;10(6):499-504.
11. Levison ME, Kaye D. Treatment of complicated urinary tract infections with an emphasis on drug-resistant gram-negative uropathogens. *Curr Infect Dis Rep.* 2013;15(2):109-15.
12. Sanchez GV, Babiker A, Master RN, Luu T, Mathur A, Bordon J. Antibiotic Resistance among Urinary Isolates from Female Outpatients in the United States in 2003 and 2012. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(5):2680-3.
13. Linsenmeyer K, Strymish J, Gupta K. Two Simple Rules for Improving the Accuracy of Empiric Treatment of Multidrug-Resistant Urinary Tract Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(12):7593-6.
14. Linhares I, Raposo T, Rodrigues A, Almeida A. Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000-2009). *BMC Infect Dis.* 2013;13(1):19.
15. Hirsch EB, Zucchi PC, Chen A, Raux BR, Kirby JE, McCoy C, et al. Susceptibility of Multidrug-Resistant Gram-Negative Urine Isolates to Oral Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(5):3138-40.
16. Bader MS, Loeb M, Brooks AA. An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. *Postgrad Med.* 2017;129(2):242-58.
17. Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum beta-lactamase producing, *Enterobacteriaceae* infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(1):43-50.

18. Brown ED, Vivas EI, Walsh CT, Kolter R. MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1995;177(14):4194-7.
19. Leblebicioğlu H. Nozokomiyal Üriner Sistem Enfeksiyonları. *Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*. 2007;3(11):26-33.
20. Kolaylı F. Üriner sistem enfeksiyonlarında etken patogenezi ve mikrobiyolojik tanımı. *Turkiye Klinikleri J Urology-Special Topics*. 2010;3(3):8-18.
21. Wagenlehner F, Naber K. Hospital-acquired urinary tract infections. *J Hosp Infect*. 2000;46(3):171-81.
22. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis*. 2011;52(5):e103-20.
23. Johansen TE, Botto H, Cek M, Grabe M, Tenke P, Wagenlehner FM, et al. Critical review of current definitions of urinary tract infections and proposal of an EAU/ESIU classification system. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38 Suppl:64-70.
24. Peterson J, Kaul S, Khashab M, Fisher A, Kahn JB. Identification and pretherapy susceptibility of pathogens in patients with complicated urinary tract infection or acute pyelonephritis enrolled in a clinical study in the United States from November 2004 through April 2006. *Clin Ther*. 2007;29(10):2215-21.
25. Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R, Geerlings SE, Rice JC, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2010;50(5):625-63.
26. Karlowsky JA, Lagace-Wiens PR, Simner PJ, DeCorby MR, Adam HJ, Walkty A, et al. Antimicrobial resistance in urinary tract pathogens in Canada from 2007 to 2009: CANWARD surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(7):3169-75.
27. Barlam TF, Cosgrove SE, Abbo LM, MacDougall C, Schuetz AN, Septimus EJ, et al. Executive Summary: Implementing an Antibiotic Stewardship Program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Clin Infect Dis*. 2016;62(10):1197-202.
28. Arman D, Ağalar C, Dizbay M, Güzel Tunçcan Ö, Tozlu Keten D, Aygün G, et al. Birinci basamak sağlık merkezlerinde toplum kökenli alt üriner sistem enfeksiyonları: Etkenler ve antimikrobiyal duyarlılıkları. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob*. 2012;1(10):1-8.
29. Etienne M, Lefebvre E, Frebourg N, Hamel H, Pestel-Caron M, Caron F, et al. Antibiotic treatment of acute uncomplicated cystitis based on rapid urine test and local epidemiology: lessons from a primary care series. *BMC infectious diseases*. 2014;14(1):137.
30. Erdem I, Ali RK, Ardic E, Omar SE, Mutlu R, Topkaya AE. Community-acquired lower urinary tract infections: Etiology, antimicrobial resistance, and treatment results in female patients. *J Glob Infect Dis*. 2018;10(3):129.

31. Topçu AW SG, Doğanay M, Gür D. Bakterilerde antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç. 4. Baskı ed: Nobel Tıp Kitapevleri; 2017. 243-56 p.
32. Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11(5):477-85.
33. Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10):e01076-18.
34. Thomson KS, Weber DA, Sanders CC, Sanders WE, Jr. Beta-lactamase production in members of the family Enterobacteriaceae and resistance to beta-lactam-enzyme inhibitor combinations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(4):622-7.
35. Ayaz C. Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. Baskı Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi sistemlere göre enfeksiyonlar ed: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi. 2008:266-78.
36. Khardori N. Antibiotics--past, present, and future. *Med Clin North Am.* 2006;90(6):1049-76.
37. Institute of Medicine Forum on Microbial T. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. Antibiotic Resistance: Implications for Global Health and Novel Intervention Strategies: Workshop Summary. Washington (DC): National Academies Press (US) National Academy of Sciences.; 2010.
38. Akyar I, Kocagöz S, Kocagöz T, Sarıgüzel-Sar N, Gültekin M, Ercis S. Beş yılda izole edilen 15434 *Escherichia coli* ve 3178 *Klebsiella* spp. suşunda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin yıllara, kliniklere ve örnek türlerine dağılımı. *Ankem Derg.* 2010;24(1):34-41.
39. Kanj SS, Kanafani ZA, editors. Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clinic Proceedings*; 2011: Elsevier.
40. Rice LB, Bonomo R. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. In: Murray PR, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover MC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 1. 9 ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 2007. p. 1114-30.
41. Babic MH, A. M. Bonomo, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat.* 2006;9(3):142-56.
42. Grundmann H, Glasner C, Albigler B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(2):153-63.
43. Opal SM, Pop-Vicas A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*: Elsevier; 2015. p. 235-51. e3.
44. Jacoby G, Bush K. β -Lactam resistance in the 21st century. *Frontiers in Antimicrobial Resistance*: American Society of Microbiology; 2005. p. 53-65.
45. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(4):682-707.

46. Alp E, Percin D, Colakoglu S, Durmaz S, Kurkcu CA, Ekincioglu P, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *J Hosp Infect.* 2013;84(2):178-80.
47. Poirel L, Ozdamar M, Ocampo-Sosa AA, Turkoglu S, Ozer UG, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2784-5.
48. Keskin H, Tekeli A, Dolapci I, Ocal D. [Molecular characterization of beta-lactamase-associated resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical samples]. *Mikrobiyol Bul.* 2014;48(3):365-76.
49. Zeka AN, Poirel L, Sipahi OR, Bonnin RA, Arda B, Ozinel M, et al. GES-type and OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(4):1145-6.
50. Cicek AC, Saral A, Iraz M, Ceylan A, Duzgun AO, Peleg AY, et al. OXA- and GES-type beta-lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(5):410-5.
51. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5046-54.
52. Shakil S, Azhar EI, Tabrez S, Kamal MA, Jabir NR, Abuzenadah AM, et al. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): an update. *J Chemother.* 2011;23(5):263-5.
53. Drlica K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2(5):504-8.
54. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(2):337-41.
55. Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 2000;31 Suppl 2:S24-8.
56. Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(8):5638-42.
57. Kaye KS, Fraimow HS, Abrutyn E. Pathogens resistant to antimicrobial agents. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infect Dis Clin North Am.* 2000;14(2):293-319.
58. Sanchez GV, Baird AM, Karlowsky JA, Master RN, Bordon JM. Nitrofurantoin retains antimicrobial activity against multidrug-resistant urinary *Escherichia coli* from US outpatients. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(12):3259-62.
59. van der Starre WE, van Nieuwkoop C, Paltansing S, van't Wout JW, Groeneveld GH, Becker MJ, et al. Risk factors for fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in adults with community-onset febrile urinary tract infection. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(3):650-6.
60. Rattanaumpawan P, Tolomeo P, Bilker WB, Fishman NO, Lautenbach E. Risk factors for fluoroquinolone resistance in Gram-negative bacilli causing healthcare-acquired urinary tract infections. *J Hosp Infect.* 2010;76(4):324-7.
61. Rooney PJ, O'Leary MC, Loughrey AC, McCalmont M, Smyth B, Donaghy P, et al. Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase

- (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 2009;64(3):635-41.
62. O'Brien KA, Zhang J, Mauldin PD, Gomez J, Hurst JM, Sean Boger M, et al. Impact of a Stewardship-Initiated Restriction on Empirical Use of Ciprofloxacin on Nonsusceptibility of *Escherichia coli* Urinary Isolates to Ciprofloxacin. Pharmacotherapy. 2015;35(5):464-9.
 63. Boehr DD, Moore IF, Wright GD. Aminoglycoside resistance mechanisms. Frontiers in Antimicrobial Resistance: American Society of Microbiology; 2005. p. 85-100.
 64. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol. 2015;13(1):42-51.
 65. Vidal L, Gafter-Gvili A, Borok S, Fraser A, Leibovici L, Paul M. Efficacy and safety of aminoglycoside monotherapy: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2007;60(2):247-57.
 66. Murray R, Pfaller, Us D. A., Başustaoğlu A. Tıbbi Mikrobiyoloji. Altıncı Baskı ed: Pelikan Yayınevi; 2016.
 67. Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis. 2005;40(9):1333-41.
 68. Lim LM, Ly N, Anderson D, Yang JC, Macander L, Jarkowski III A, et al. Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. 2010;30(12):1279-91.
 69. Li J, Turnidge J, Milne R, Nation RL, Coulthard K. In Vitro Pharmacodynamic Properties of Colistin and Colistin Methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(3):781-5.
 70. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. Clin Microbiol Rev. 2008;21(3):449-65.
 71. Nation RL, Li J. Colistin in the 21st century. Curr Opin Infect Dis. 2009;22(6):535-43.
 72. Xavier BB, Lammens C, Ruhai R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro Surveill. 2016;21(27).
 73. Saiprasad PV, Krishnaprasad K. Exploring the hidden potential of fosfomycin for the fight against severe Gram-negative infections. Indian J Med Microbiol. 2016;34(4):416-20.
 74. Grif K, Dierich MP, Pfaller K, Miglioli PA, Allerberger F. In vitro activity of fosfomycin in combination with various antistaphylococcal substances. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2001;48(2):209-17.
 75. Tessier F, Quentin C. In vitro activity of fosfomycin combined with ceftazidime, imipenem, amikacin, and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 1997;16(2):159-62.
 76. Silver LL. Fosfomycin: Mechanism and Resistance. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017;7(2).

77. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48(1):1-12.
78. ECDC E. The bacterial challenge: time to react. Stockholm: European Center for Disease Prevention and Control. 2009.
79. Freire-Moran L, Aronsson B, Manz C, Gyssens IC, So AD, Monnet DL, et al. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria-time to react is now. *Drug Resist Updat*. 2011;14(2):118-24.
80. Greenwood D. Fosfomycin and fosmidomycin, pp: 294-6. *Antibiotic and Chemotherapy*. 2003.
81. Falagas ME, Giannopoulou KP, Kokolakis GN, Rafailidis PI. Fosfomycin: use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. *Clin Infect Dis*. 2008;46(7):1069-77.
82. Baylan O. [Fosfomycin: past, present and future]. *Mikrobiyol Bul*. 2010;44(2):311-21.
83. Schito GC. Why fosfomycin trometamol as first line therapy for uncomplicated UTI? *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22 Suppl 2:79-83.
84. Popovic M, Steinort D, Pillai S, Joukhadar C. Fosfomycin: an old, new friend? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(2):127-42.
85. Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci*. 1974;235(0):364-86.
86. Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A. Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomycin resistance. *Antibiotics*. 2013;2(2):217-36.
87. Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G, Andersson DI. Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(9):2850-8.
88. Merkel TJ, Nelson DM, Brauer CL, Kadner RJ. Promoter elements required for positive control of transcription of the *Escherichia coli uhpT* gene. *J Bacteriol*. 1992;174(9):2763-70.
89. Yang B, Gerhardt SG, Larson TJ. Action at a distance for glp repressor control of glpTQ transcription in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*. 1997;24(3):511-21.
90. Gorke B, Stulke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(8):613-24.
91. Frossard M, Joukhadar C, Erovic BM, Dittrich P, Mrass PE, Van Houte M, et al. Distribution and Antimicrobial Activity of Fosfomycin in the Interstitial Fluid of Human Soft Tissues. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(10):2728-32.
92. Aykut Arca E, Karabiber N. [Short communication: comparison of susceptibilities of *Escherichia coli* urinary tract isolates against fosfomycin trometamol and different antibiotics]. *Mikrobiyol Bul*. 2007;41(1):115-9.
93. Francois M, Mariani-Kurkdjian P, Dupont E, Bingen E. [Acute ethmoiditis in children, a series of 125 cases]. *Arch Pediatr*. 2006;13(1):6-10.
94. Martinez-Martinez L, Rodriguez G, Pascual A, ISABEL SUÁREZ A, Perea EJ. In-vitro activity of antimicrobial agent combinations against multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 1996;38(6):1107-8.

95. Santimaleeworagun W, Wongpoowarak P, Chayakul P, Pattharachayakul S, Tansakul P, Garey KW. In vitro activity of colistin or sulbactam in combination with fosfomycin or imipenem against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases. *Southeast Asian J Trop Med*. 2011;42(4):890.
96. Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos D, Vouloumanou E, Falagas M. Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(5):695-701.
97. Inouye S, Watanabe T, Tsuruoka T, Kitasato I. An increase in the antimicrobial activity in vitro of fosfomycin under anaerobic conditions. *J Antimicrob Chemother*. 1989;24(5):657-66.
98. Yanagida C, Ito K, Komiya I, Horie T. Protective effect of fosfomycin on gentamicin-induced lipid peroxidation of rat renal tissue. *Chem Biol Interact*. 2004;148(3):139-47.
99. Nakamura T, Kokuryo T, Hashimoto Y, Inui KI. Effects of fosfomycin and imipenem-cilastatin on the nephrotoxicity of vancomycin and cisplatin in rats. *J Pharm Pharmacol*. 1999;51(2):227-32.
100. Suarez JE, Mendoza MC. Plasmid-encoded fosfomycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(5):791-5.
101. Etienne J, Gerbaud G, Courvalin P, Fleurette J. Plasmid-mediated resistance to fosfomycin in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett*. 1989;52(1-2):133-7.
102. Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G, Andersson DI. Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(9):2850-8.
103. Díez-Aguilar M, Cantón R. New microbiological aspects of fosfomycin. *Revista Española de Quimioterapia*. 2019;32(Suppl 1):8.
104. Kim DH, Lees WJ, Kempell KE, Lane WS, Duncan K, Walsh CT. Characterization of a Cys115 to Asp substitution in the *Escherichia coli* cell wall biosynthetic enzyme UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase (MurA) that confers resistance to inactivation by the antibiotic fosfomycin. *Biochemistry*. 1996;35(15):4923-8.
105. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomycin. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(2):321-47.
106. De Smet KA, Kempell KE, Gallagher A, Duncan K, Young DB. Alteration of a single amino acid residue reverses fosfomycin resistance of recombinant MurA from *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*. 1999;145 (Pt 11):3177-84.
107. Jiang S, Gilpin ME, Attia M, Ting YL, Berti PJ. Lyme disease enolpyruvyl-UDP-GlcNAc synthase: fosfomycin-resistant MurA from *Borrelia burgdorferi*, a fosfomycin-sensitive mutant, and the catalytic role of the active site Asp. *Biochemistry*. 2011;50(12):2205-12.
108. McCoy AJ, Sandlin RC, Maurelli AT. In vitro and in vivo functional activity of Chlamydia MurA, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase involved in peptidoglycan synthesis and fosfomycin resistance. *J Bacteriol*. 2003;185(4):1218-28.

109. Takahata S, Ida T, Hiraishi T, Sakakibara S, Maebashi K, Terada S, et al. Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(4):333-7.
110. Gisin J, Schneider A, Nägele B, Borisova M, Mayer C. A cell wall recycling shortcut that bypasses peptidoglycan de novo biosynthesis. *Nat Chem Biol*. 2013;9(8):491.
111. Woodyer RD, Shao Z, Thomas PM, Kelleher NL, Blodgett JA, Metcalf WW, et al. Heterologous production of fosfomycin and identification of the minimal biosynthetic gene cluster. *Chem Biol*. 2006;13(11):1171-82.
112. Bernat BA, Laughlin LT, Armstrong RN. Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochemistry*. 1997;36(11):3050-5.
113. Fillgrove KL, Pakhomova S, Newcomer ME, Armstrong RN. Mechanistic diversity of fosfomycin resistance in pathogenic microorganisms. *J Am Chem Soc*. 2003;125(51):15730-1.
114. Kuzuyama T, Kobayashi S, O'Hara K, Hidaka T, Seto H. Fosfomycin monophosphate and fosfomycin diphosphate, two inactivated fosfomycin derivatives formed by gene products of fomA and fomB from a fosfomycin producing organism *Streptomyces wedmorensis*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1996;49(5):502-4.
115. Sato N, Kawamura K, Nakane K, Wachino J-I, Arakawa Y. First detection of fosfomycin resistance gene *fosA3* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from healthy individuals in Japan. *Microbial Drug Resistance*. 2013;19(6):477-82.
116. Benzerara Y, Gallah S, Hommeril B, Genel N, Decré D, Rottman M, et al. Emergence of plasmid-mediated fosfomycin-resistance genes among *Escherichia coli* isolates, France. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(9):1564.
117. Xu H, Miao V, Kwong W, Xia R, Davies J. Identification of a novel fosfomycin resistance gene (*fosA2*) in *Enterobacter cloacae* from the Salmon River, Canada. *Lett Appl Microbiol*. 2011;52(4):427-9.
118. Lee SY, Park YJ, Yu JK, Jung S, Kim Y, Jeong SH, et al. Prevalence of acquired fosfomycin resistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Korea and IS26-composite transposon surrounding *fosA3*. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(12):2843-7.
119. Hou J, Yang X, Zeng Z, Lv L, Yang T, Lin D, et al. Detection of the plasmid-encoded fosfomycin resistance gene *fosA3* in *Escherichia coli* of food-animal origin. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(4):766-70.
120. Wachino J-i, Yamane K, Suzuki S, Kimura K, Arakawa Y. Prevalence of fosfomycin resistance among CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(7):3061-4.
121. Yang TY, Lu PL, Tseng SP. Update on fosfomycin-modified genes in *Enterobacteriaceae*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2019;52(1):9-21.
122. Zilhao R, Courvalin P. Nucleotide sequence of the fosB gene conferring fosfomycin resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS microbiology letters*. 1990;68(3):267-72.

123. Thompson MK, Keithly ME, Goodman MC, Hammer ND, Cook PD, Jagessar KL, et al. Structure and function of the genomically encoded fosfomycin resistance enzyme, FosB, from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*. 2014;53(4):755-65.
124. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Ref: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1 [Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1/Breakpoint_Tables.pdf].
125. Antibiyotik duyarlılık testleri, EUCAST: Uygulama, yorum ve uzman kurallar. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.Ek sayı* ,46(http://tmc.dergisi.org/pdf/tmc_supplement_2016.pdf):19-22.
126. Hou J, Huang X, Deng Y, He L, Yang T, Zeng Z, et al. Dissemination of the fosfomycin resistance gene *fosA3* with CTX-M beta-lactamase genes and *rmtB* carried on IncFII plasmids among *Escherichia coli* isolates from pets in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(4):2135-8.
127. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2818-24.
128. Lalzampaia H, Dutta T, Warjri I, Chandra R. PCR-based detection of extended-spectrum β -lactamases (bla CTX-M-1 and bla TEM) in *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Klebsiella pneumoniae* isolated from pigs in North Eastern India (Mizoram). *Indian J Microbiol*. 2013;53(3):291-6.
129. Bacterial urinary tract infections [Available from: <https://www.msdmanuals.com/professional/genitourinary-disorders/urinary-tract-infections-utis/bacterial-urinary-tract-infections-utis>].
130. Demirtürk N, Demirdal T, Eldemir H, İnce R, Altındış M. İdrar örneklerinden izole edilen bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2005;35(2):275-8.
131. Pullukçu H, Taşbakan M, Aydemir Ş, Sipahi O, Turhan A, Öznel M. İdrar kültürlerinden soyutlanan bakteriler ve çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *Ankem Derg*. 2006;20(1):26-30.
132. Altoparlak Ü, Özbek A, Aktaş F. Üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2002;32(3-4):167-73.
133. Kibar F, Yaman A, Dünder İH. İdrar örneklerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2004;34(3):162-70.
134. Dünder D, Willke A, Sönmez T. İdrar yolu infeksiyonu etkenleri ve antibiyotik duyarlılıkları. *Klimik Derg*. 2008;21(1):7-11.
135. Duranay MA, AKAY Akay, Hatice All, At. Üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen mikroorganizmaların dağılımı ve *Escherichia coli* suşlarında antibiyotik duyarlılığı. *İst Tıp Fak Derg*. 2006;69(1):1-4.
136. 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(1):69-76.

137. Yılmaz EÖ, Cüneyt Sinirtaş, Melda Gedİkoğlu, Suna. Uludađ Üniversitesi Tıp Fakóltesi Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda 1999-2002 Yılları Arasında İdrar Örneklerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Duyarlılıkları. Turk J Med. 2005;19(1):91-6.
138. Gündüz T, Mumcuoğlu, İpek. İdrar örneklerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2004;34:157-61.
139. Uslu M, Bağcıoğlu M, Tekdoğan ÜY, Kocaaslan R, Çeçen K. Kars Bölgesindeki İdrar Yolu Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi ve Antibiyotik Dirençleri. Kafkas J Med Sci 2019;9(2):90-6.
140. Yılmaz N, Ağuş N, Bayram A, Şamlıoğlu P, Şirin MC, Derici YK, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Escherichia coli* isolates as agents of community-acquired urinary tract infection (2008–2014). Turk J Urol. 2016;42(1):32.
141. Aykan ŞB, Çiftçi İH. Türkiye'de idrar kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotiklere direnç durumu: Bir meta-analiz. Mikrobiyol Bul. 2013;47(4):603-18.
142. Temiz H, Akkoç H, Gül K. Laboratuvarımızda idrar kültürlerinden izole edilen gram negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç. Dicle Tıp Dergisi. 2008;35(4):234-9.
143. Kamenski G, Wagner G, Zehetmayer S, Fink W, Spiegel W, Hoffmann K. Antibacterial resistances in uncomplicated urinary tract infections in women: ECO· SENS II data from primary health care in Austria. BMC Infect Dis. 2012;12(1):222.
144. Kashef N, Djavid GE, Shahbazi S. Antimicrobial susceptibility patterns of community-acquired uropathogens in Tehran, Iran. J Infect Dev Ctries 2010;4(04):202-6.
145. Doğru A, Karatoka B, Ergen P, Aydın ÖŞ, Tigen ET. The resistance rates of urinary tract infections: Our data from year 2010. Turk J Urol. 2013;39(4):237.
146. Arslan H, Azap ÖK, Ergönül Ö, Timurkaynak F. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. J Antimicrob Chemother. 2005;56(5):914-8.
147. Demirci S ÜT, Eser Ö, Çakar A, Altun B, Sancak B, Gür D. Antimicrobial Susceptibility and Prevalence of O25b-ST131 Clone With Emerging Fosfomycin and Cefotaxime Resistant Determinants in Urinary *Escherichia coli* Isolates. 28th ECCMID, 21 – 24 April 2018; Spain.
148. Gupta S, Kapur S, Padmavathi D. Comparative prevalence of antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infection cases from representative States of northern and southern India. J Clin Diagn Res. 2014;8(9):Dc09-12.
149. Kahlmeter G, Poulsen HO. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: the ECO· SENS study revisited. Int J Antimicrob Agents. 2012;39(1):45-51.
150. Donowitz G. Third generation cephalosporins. Infectious disease clinics of North America. 1989;3(3):595-612.
151. Donowitz GR MG. Principles and Practice of Infection Diseases. Third Edition ed1990.

152. Pechère J-C. Resistance to third generation cephalosporins: the current situation. *Infection*. 1989;17(5):333-7.
153. Hoban DJ, Lascols C, Nicolle LE, Badal R, Bouchillon S, Hackel M, et al. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae*, including molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing species, in urinary tract isolates from hospitalized patients in North America and Europe: results from the SMART study 2009–2010. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74(1):62-7.
154. Ipekci T, Seyman D, Berk H, Celik O. Clinical and bacteriological efficacy of amikacin in the treatment of lower urinary tract infection caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. *J Infect Chemother* 2014;20(12):762-7.
155. Sharma I, Paul D. Prevalence of community acquired urinary tract infections in Silchar Medical College, Assam, India and its antimicrobial susceptibility profile. *Indian J Med Sci*. 2012;66(11/12):273.
156. Huang L-F, Lo Y-C, Su L-H, Chang C-L. Antimicrobial susceptibility patterns among *Escherichia coli* urinary isolates from community-onset health care-associated urinary tract infection. *J Formos Med Assoc*. 2014;113(12):970-3.
157. Gülcan AA, Ahmet Gülcan, Erim. İdrar kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve in vitro antibiyotik duyarlılık durumları. 2012;1(3):129-35.
158. Bouchillon SK, Badal RE, Hoban DJ, Hawser SP. Antimicrobial susceptibility of inpatient urinary tract isolates of Gram-negative bacilli in the United States: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) Program: 2009– 2011. *Clin Ther*. 2013;35(6):872-7.
159. Vardakas KZ, Tansarli GS, Rafailidis PI, Falagas ME. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(12):2793-803.
160. Groupa IH. B-Lactam/B-Lactam Inhibitor Combinations for the Treatment of Bacteremia Due to Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli*: A Post Hoc Analysis of Prospective Cohorts. *Clin Infect Dis*. 2012;54(2):167-74.
161. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis* 2006;6(9):589-601.
162. Qureshi ZA, Hittle LE, O'Hara JA, Rivera JI, Syed A, Shields RK, et al. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. *Clin Infect Dis*. 2015;60(9):1295-303.
163. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161-8.
164. Amladi AU, Abirami B, Devi SM, Sudarsanam TD, Kandasamy S, Kekre N, et al. Susceptibility profile, resistance mechanisms & efficacy ratios of fosfomycin, nitrofurantoin & colistin for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* causing urinary tract infections. *Indian J Med Res*. 2019;149(2):185.

165. Endimiani A, Patel G, Hujer KM, Swaminathan M, Perez F, Rice LB, et al. In vitro activity of fosfomycin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):526-9.
166. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob.* 2011;37(5):415-9.
167. Aghamali M, Sedighi M, Mohammadzadeh N, Abbasian S, Ghafouri Z, Kouhsari E. Fosfomycin: mechanisms and the increasing prevalence of resistance. *Journal of medical microbiology.* 2018;68(1):11-25.
168. Cao X-L, Shen H, Xu Y-Y, Xu X-J, Zhang Z-F, Cheng L, et al. High prevalence of fosfomycin resistance gene *fosA3* in bla CTX-M-harboured *Escherichia coli* from urine in a Chinese tertiary hospital during 2010–2014. *Epidemiol Infect.* 2017;145(4):818-24.
169. Li Y, Zheng B, Li Y, Zhu S, Xue F, Liu J. Antimicrobial susceptibility and molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical *Escherichia coli* isolates in mainland China. *PloS one.* 2015;10(8):e0135269.
170. Karlowsky JA, Denisuk AJ, Lagacé-Wiens PR, Adam HJ, Baxter MR, Hoban DJ, et al. In vitro activity of fosfomycin against *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections in Canada as part of the CANWARD surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):1252-6.
171. Neuner EA, Sekeres J, Hall GS, van Duin D. Experience with fosfomycin for treatment of urinary tract infections due to multidrug-resistant organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):5744-8.
172. Kresken M, Pfeifer Y, Hafner D, Wresch R, Körber-Irrgang B, Chemotherapy WPARotP-E-Sf. Occurrence of multidrug resistance to oral antibiotics among *Escherichia coli* urine isolates from outpatient departments in Germany: extended-spectrum β -lactamases and the role of fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(4):295-300.
173. Schmiemann G, Gágyor I, Hummers-Pradier E, Bleidorn J. Resistance profiles of urinary tract infections in general practice-an observational study. *BMC Urol.* 2012;12(1):33.
174. Martin D, Fougnot S, Grobost F, Thibaut-Jovelin S, Ballereau F, Gueudet T, et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in community-onset urinary tract infections in France in 2013. *J Infect.* 2016;72(2):201-6.
175. Oteo J, Orden B, Bautista V, Cuevas O, Arroyo M, Martínez-Ruiz R, et al. CTX-M-15-producing urinary *Escherichia coli* O25b-ST131-phylogroup B2 has acquired resistance to fosfomycin. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(4):712-7.
176. Meier S, Weber R, Zbinden R, Ruef C, Hasse B. Extended-spectrum β -lactamase-producing Gram-negative pathogens in community-acquired urinary tract infections: an increasing challenge for antimicrobial therapy. *Infection.* 2011;39(4):333-40.
177. Bonkat G, Müller G, Braissant O, Frei R, Tschudin-Suter S, Rieken M, et al. Increasing prevalence of ciprofloxacin resistance in extended-spectrum- β -

- lactamase-producing *Escherichia coli* urinary isolates. *World J Urol.* 2013;31(6):1427-32.
178. Bartoloni A, Sennati S, Di Maggio T, Mantella A, Riccobono E, Strohmeyer M, et al. Antimicrobial susceptibility and emerging resistance determinants (*bla*_{CTX-M}, *rmtB*, *fosA3*) in clinical isolates from urinary tract infections in the Bolivian Chaco. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;43:1-6.
 179. Balkhed ÅÖ, Tärnberg M, Monstein H-J, Hällgren A, Hanberger H, Nilsson LE. High frequency of co-resistance in CTX-M-producing *Escherichia coli* to non-beta-lactam antibiotics, with the exceptions of amikacin, nitrofurantoin, colistin, tigecycline, and fosfomicin, in a county of Sweden. *Scand J Infect Dis.* 2013;45(4):271-8.
 180. Titelman E, Iversen A, Kahlmeter G, Giske CG. Antimicrobial susceptibility to parenteral and oral agents in a largely polyclonal collection of CTX-M-14 and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Apmis.* 2011;119(12):853-63.
 181. Linsenmeyer K, Strymish J, Weir S, Berg G, Brecher S, Gupta K. Activity of fosfomicin against extended-spectrum- β -lactamase-producing uropathogens in patients in the community and hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(2):1134-6.
 182. Mazzariol A, Bazaj A, Cornaglia G. Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *J Chemother.* 2017;29(sup1):2-9.
 183. Vardakas KZ, Legakis NJ, Triarides N, Falagas ME. Susceptibility of contemporary isolates to fosfomicin: a systematic review of the literature. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;47(4):269-85.
 184. Demir T, Buyukguclu T. Evaluation of the in vitro activity of fosfomicin tromethamine against Gram-negative bacterial strains recovered from community-and hospital-acquired urinary tract infections in Turkey. *Int J Infect Dis.* 2013;17(11):e966-e70.
 185. Falagas ME, Kastoris AC, Karageorgopoulos DE, Rafailidis PI. Fosfomicin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;34(2):111-20.
 186. Yang X, Liu W, Liu Y, Wang J, Lv L, Chen X, et al. F33: A-: B-, IncHI2/ST3, and IncI1/ST71 plasmids drive the dissemination of *fosA3* and *bla*_{CTX-M-55/-14/-65} in *Escherichia coli* from chickens in China. *Front Microbiol.* 2014;5:688.
 187. Jiang Y, Shen P, Wei Z, Liu L, He F, Shi K, et al. Dissemination of a clone carrying a *fosA3*-harbouring plasmid mediates high fosfomicin resistance rate of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45(1):66-70.
 188. Livermore D, Hawkey P. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. Oxford University Press; 2005.
 189. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Perilli M, Amicosante G, et al. CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(8):2700-6.

190. Hernández J, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque T, Pascual A. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(5):2122-5.
191. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infect Genet Evol.* 2012;12(5):883-93.
192. Younes A, Hamouda A, Dave J, Amyes S. Prevalence of transferable *bla*_{CTX-M-15} from hospital-and community-acquired *Klebsiella pneumoniae* isolates in Scotland. *J Antimicrob Chemother.* 2010;66(2):313-8.
193. Coelho A, Mirelis B, Alonso-Tarrés C, Larrosa MN, Miró E, Abad RC, et al. Detection of three stable genetic clones of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Barcelona metropolitan area, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(4):862-4.