ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Irak'in Al-Anbar Şehri'nde Idrar Örneklerinden İzole Edilen Geniş Spektrumlu B-Laktamaz (ESBL) Üreten *E. coli* Suşlarının Antibiyotiğe Direnç Özelliklerinin Fenotiplendirilmesi ve Genotiplenmesi

Eesee Abduljabbar Saeed SAEED

Danışman
Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN

MOLEKÜLER BİYOLOJİ / BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI

2021

Her hakkı saklıdır

`

TEZ ONAYI

Eesee Abduljabbar Saeed SAEED tarafından hazırlanan "**Irak'ın Al-Anbar Şehri'nde İdrar Örneklerinden İzole Edilen Geniş Spektrumlu B -Laktamaz (ESBL) Üreten *E. coli* Suşlarının Antibiyotiğe Direnç Özelliklerinin Fenotiplendirilmesi ve Genotiplenmesi"** adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Özgür Kuzukıran

Eş-danışman: Dr. Lecturer Jaleel Samanje

College of Health and Medical Technology, Middle Technical University (MTU).

Jüri Üyeleri :

Dr. …….

……. Üniversitesi, ……. Anabilim Dalı

Dr. Öğr. Üys. ……

…….. Üniversitesi

…….. Bölümü

Dr. Öğr. Üysi……

……Üniversitesi, …….. Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL

Enstitü Müdürü

25 /3 / 2021

`

Kontrol edilmiştir

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine göre hazırlamış olduğum "**Irak'ın Al-Anbar Şehri'nde İdrar Örneklerinden İzole Edilen Geniş Spektrumlu B -Laktamaz (ESBL) Üreten *Escherichia Coli* Suşlarının Antibiyotiğe Direnç Özelliklerinin Fenotiplendirilmesi ve Genotiplenmesi**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programıyla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (25/3/2021).

Eesee Abduljabbar Saeed SAEED

(imza)

`

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Irak'ın Al-Anbar Şehri'nde İdrar Örneklerinden İzole Edilen Geniş Spektrumlu B - Laktamaz (ESBL) Üreten *E. coli* Suşlarının Antibiyotiğe Direnç Özelliklerinin Fenotiplendirilmesi Ve Genotiplendirimesi

Eesee Abduljabbar Saeed SAEED

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji/Moleküler biyoloji Bölümü

Danışman: Doç. Dr. Özgür Kuzukıran / Türkiye
Eş-danışman: Dr. Jaleel Samanje / Irak

Bu çalışma, geniş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) üreten üropatojenik *Escherichia coli*'de *(blaCTX-M, blaTEM ve blaOXA*) genlerinin görülme sıklığını ve Al-Anbar/Irak Hastaneleri arasında antibiyotik direnç modellerini belirlemek için tasarlanmıştır. Analiz edilen 65 üropatojenik *E. coli* izolatından 52 izolatın, kombinasyon disk testi ve VITEK sistemi kullanılarak ESBL üreticisi olduğu belirlendi. *E. coli* içerisinde beta-laktamaz (bla) genlerinin (TEM, CTX-M ve OXA) frekansı, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Tekniği ile genetik olarak belirlendi. Bunlardan 29 (%55,76) ESBL üreten üropatojenik *E. coli*'den tamamı blaTEM ve, blaCTX-M yönünden pozitif, blaOXA geni yönünden negatif çıkmıştır. Aynı örneklerin hem blaTEM hem de blaCTX-M genlerini barındırdığı görülmüştür. TEM ve CTX-M genlerinin en yaygın genler olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada izolatlar, Ticarcillin'e (%91), Piperacillin'e (%91), Seftazidime (%91), Cefepime'ye ve (%12.13) Imipenem'e direnç göstermiştir. İzole edilen *E. coli*, Piperacillin / tazobactam'a duyarlılık gösterirken (%69.69). Bu çalışma, Al-Anbar eyaleti

/ Irak'ta üropatojenik *E. coli* suşlarında CTX-M ve TEM genlerinin görülme sıklığını gösterirken, Irak'ta ilk kez *bla*OXA geni (%0) negatif sonuç ile karşılaşıldı.

2021, 85 sayfa

ANAHTAR KELİMELERİ: ESBL, Antibiyotik, *E. coli*, PCR

ABSTRACT

Master Thesis

Study the phenotyping and genotyping of antibiotic resistance of the extended-spectrum β-lactamase (ESBL) of *E.coli* isolated from urine samples in al-anbar province/ıraq.

Eesee Abduljabbar Saeed SAEED

Çankırı Karatekin University
Institute of Science
Department of Biology/Molucular Biology

Supervisor: Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN / Turkey
Co-supervisor: Dr. Lecturer Jaleel SAMANJE / Iraq

The present study was designed to determine the occurrence frequency of (*bla*CTX-M, *bla*TEM and *bla*OXA) genes in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing uropathogenic *Escherichia coli*, and their antibiotic resistance patterns among the Hospitals of Al-Anbar province/Iraq. Out of the 65 uropathogenic *E.coli* isolates analyzed, 52 isolates were identified to be ESBL producers by using combination disc test and VITEK system. The frequency of beta-lactamase (*bla*) genes (TEM, CTX-M and OXA) among *E. coli* was genetically determined by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. Out of 29 (55.76%) ESBL-producing uropathogenic *E. coli*, 29 (100%) were positive for *bla*TEM, 29 (100%) were positive for *bla*CTX-M while recorded 29/29 (0%) negative result of *bla*OXA gene. And well 29 (100%) harbored both *bla*TEM and *bla*CTX-M genes. TEM and CTX-M genes were the most prevalent gene. In this study Isolates were resistance (91%) toward Ticarcillin, (91%) to Piperacillin, (91%) to Ceftazidime, (91%) to Cefepime, and (12.13%) to Imipenem. While the isolated *E. coli* showed susceptibility to Piperacillin/ tazobactam (69.69%). This study demonstrated the occurrence frequency of CTX-M and TEM genes in uropathogenic *E. coli* strains in Al-Anbar province/Iraq. while *bla*OXA gene first time studied in Iraq with (0%) negative

result. Even though molecular techniques are more reliable in the detection of ESBL production, routine clinical screening for ESBL-producing uropathogens using phenotypic method should be introduced and encouraged in clinical settings as they are less expensive.

2021, 85 sayfa

KEY WORD: ESBL , Antibiotic, *E. coli*, PCR

TEŞEKKÜR

Danışmanım **Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN**'a teşekkür ederek başlamak istiyorum. Bana her zaman çok güvendiniz ve her zaman düz olmayan yollarda kendi projelerimi geliştirmeme ve almama izin verdiniz. Beni tekrar doğru yola sokmak için her zaman oradaydınız! Yazım hatalarının tüm teşvik, destek, fikir ve düzeltmeleri için çok minnettarım.

Eş-danışmanım **DR. JALEEL SAMANJE**, mükemmel tavsiyeleri ve teşvikleri için teşekkür ederim. Bilim konu olunca büyük bir hevesiniz var ve her zaman ilginç bakış açıları ve fikirler buluyorsunuz. Yardımcı amirim, bana baştan sona büyük bir destek oldunuz ve her zaman küçük ve büyük görevleri dinlemek ve yardımcı olmak için oradaydınız. Projelerim sizsiz tamamlanamazdı!

Haditha Genel Hastanesindeki tüm meslektaş ve dostlara ve Ramadi Eğitim Hastanesindeki arkadaşlarım Ahmed Dhahir ve Hammed Naif'e çok teşekkür ederim. Bana projemde çok yardımcı oldular.

Sevgim, hayatı çok daha iyi hale getiren ve yolun her adımında benimle birlikte oldukları ve hem alçak hem de yüksek noktalarımı paylaştıkları ve bana her zaman gerçekten önemli olanı hatırlattıkları için babam, kardeşlerim tüm aileme gidiyor!

Ayrıca tezimin farklı alanlarında çok etkili oldukları için arkadaşlarıma da teşekkür etmek istiyorum. Aydınlatıcı tartışmalar ve fikirler için MSc Mohamed shehab ve Saif Aziz'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Eesee Abduljabbar Saeed SAEED

ÇANKIRI, 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET……..….....i
ABSTRACT …….....iii
TEŞEKKÜR…..…….....….……...…….....…… v
İÇİNDEKİLER…...……...…….....….vi
ŞEKİLLER DİZİNİ……...……...…….…….. ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ …….....……...……...……...…..… x
SİMGELER DİZİNİ…….....xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
1.1 Giriş.....1
1.2 Amaç 2
2. LİTERATÜR İNCELEMESİ 3
2.1 Escherichia coli (*E. coli*) Genel Bakış 3
2.1.1 *E. coli*'nin Sınıflandırılması.....3
2.1.2 *E. coli* Türleri.....4
2.1.3 Serotip 5
2.1.4 Virülans faktörleri.....5
2.1.5 *E. coli'nin* Patojenitesi.....6
2.1.6 *E. coli* Antimikrobiyal Direnç 8
2.1.7 *E. coli*'nin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları 9
2.2 B-Laktamlar ve B-Laktamazlar.....11
2.2.1 B-Laktamlara Direnç.....11
2.2.2 ESBL'nin tanımı ve sınıflandırılması 12
2.2.3 Risk ESBL enfeksiyonu 13
2.2.4 β-laktamazların Genetiği.....14
2.2.5 ESBL Enfeksiyonunu Tedavi Etmek.....16
2.2.6 ESBL Direncinin Tespiti.....16
2.2.6.1 ESBL Tarama Yöntemleri 17
2.2.6.1.1 Disk Difüzyon Yöntemi.....17
2.2.6.1.2Seyreltme Antimikrobiyal Duyarlılık Testi 18
2.2.6.2 ESBL Üretimi için Doğrulayıcı Testler 18
2.2.6.2.1 Fenotipleme Yöntemleri 18
2.2.6.2.1.1 Kombinasyon diskleri (Sefalosporin / klavulanat) 18
2.2.6.2.1.2 Beslenme Ortamı Mikro Seyreltme….....19
2.2.6.2.1.3 Çift Disk Difüzyon (Sinerji) Testi 19
2.2.6.2.1.4 VITEK ESBL Testi 19
2.2.6.2.1.5 E-Testi 20
2.2.6.3 ESBL Genlerinin Moleküler Tespiti 20
2.2.6.3.1 Oligotipleme Yöntemi 20
2.2.6.3.2 PCR Teknikleri.....21
2.2.6.3.3 Nükleotid Dizileme 21
3. Malzemeler ve Yöntemler.....22
3.1 Çalışma Tasarımı (Çalışma Protokolü).....22
3.2 Malzemeler 22
3.2.1 İle Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Aparatlar 22
3.2.2 Reaktifler ve Kimyasal.....23

3.2.3 ESBL disk....24
3.2.4 VITEK® 2 Sistemi....25
3.2.4.1 VITEK® 2 Sisteminin Prensibi....25
3.2.4.2 Süspansiyon Hazırlığı....25
3.2.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Malzemeleri....26
3.2.5.1 DNA ekstraksiyonu için Presto ™ Mini gDNA Bakteri Kiti....26
3.2.5.2 Primerler....27
3.2.5.3 PCR Yeşil Ana Karışım....27
3.3 Yöntemler....28
3.3.1 Sterilizasyon Yöntemleri....28
3.3.2 Agar ve Kültür Ortamının Hazırlanması....28
3.3.2.1 BHI Broth (Brain Heart Infusion Broth)....28
3.3.2.2 MacConkey Agar....28
3.3.2.3 Mueller Hinton Agar....28
3.3.2.4 Besin Suyu....29
3.3.2.5 Eozin Metilen Mavisi Agar....29
3.3.3 Bakım Ortamı (İzolatların Saklanması)....29
3.3.4 Jel Elektroforez Bufferları....29
3.3.4.1 Tris Borat EDTA Tamponu (TBE 10X)....29
3.3.4.2 Tris Borate EDTA Buffer (TBE 1X)....30
3.3.5 Numune Koleksiyonu....30
3.3.6 *E. coli'nin* İzolasyonu ve Tanımlanması....30
3.3.6.1 Koloni Morfolojisi....30
3.3.6.2 Biyokimyasal Test....30
3.3.6.2.1 Indol testi....31
3.3.6.2.2 Metil Kırmızısı Testi....31
3.3.6.2.3 Voges- Proskauer Testi....31
3.3.6.2.4 Citrate Testi....31
3.3.6.3 VITEK 2 Sistemi....31
3.3.6.3.1 Prosedür....32
3.3.7 İzole *E. coli*'nin ESBL Direncinin Fenotip Tanımlaması....32
3.3.7.1 Kombinasyon Disk Testi (CDT)....33
3.3.8 *E. coli*'nin ESBL Direncinin Genotipleme Tanımlaması....33
3.3.8.1 Genomik DNA Ekstraksiyonu ve Saflaştırma Yöntemi....33
3.3.8.1.1 Numune Hazırlama....34
3.3.8.1.2 Liziz....34
3.3.8.1.3 DNA Bağlanması....34
3.3.8.1.4 Yıkama....35
3.3.8.1.5 Elüsyon....35
3.3.8.2 DNA Ürünlerinin Agaroz Jel ile Analizi....35
3.3.8.3 ESBL direnç geninin amplifikasyonu....36
3.3.8.3.1 Primerlerin Hazırlanması....36
3.3.8.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Amplifikasyonu....36
3.3.8.3.2.1 PCR Karışımı Hazırlama....36
3.3.8.3.2.2 PCR Termal Döngüleyici Programları....37
3.3.8.3.2.2.1 (TME) gen tespiti için PCR amplifikasyon programı....37
3.3.8.3.2.2.2 (CTX-M) gen tespiti için PCR amplifikasyon programı....37
3.3.8.3.2.2.3 (OXA) gen tespiti için PCR amplifikasyon programı....38

3.3.8.3.2.3 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel ile Analizi 38
3.3.8.3.2.4 Agaroz Jelde DNA Şablonunun Yüklenmesi ve Çalıştırılması .. 39
4. Sonuç ve Tartışma 40
4.1 *E. coli* İzolatlarının Tanımlanması 40
4.1.1 Klasik Tanımlama Testi 40
4.1.2 VITEK® 2 SYSTEM ile Onaylayıcı Tanımlama 41
4.2 Cinsiyet dağılımı *E. coli* 41
4.3 Yaş dağılımı *E. coli* 42
4.4 Fenotipleme Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi 43
4.4.1 Birleşik Diskler Testi (CDT) İle Belirleme 43
4.4.2 VITEK® 2 SYSTEM İle Onaylayıcı Belirleme 46
4.5 ESBL Üreten *E. coli* İzolatlarının Genotipik Olarak Tespiti 49
4.6. ESBL geninin dizilimi tespiti ……... 57
5. SONUÇ ve TAVSİYE 60
5.1 Sonuç 60
5.2 Öneri 60
5.3 Etik Hususlar 61
KAYNAKÇA…….. 61
APANDIS-1……..... 71
APANDIS-2 ..……..... 85

ŞEKİLLER DIZINI

Sayfa

Şekil 2.1 Antimikrobiyal ilaçların mekanizmaları 10
Şekil 2.2 A GöreESBL Sınıflandırması 13
Şekil 4.1 a, MacConkey agar plakasında *E. coli.,* b, (EMB) ortamında *E.coli*……. 41
Şekil 4.2 *Escherichia coli*'nin cinsiyete göre dağılımı..... 43
Şekil 4.3 Mueller-Hinton agar üzerinde *E.coli*-1'in kombinasyon diskleri testi..... 44
Şekil 4.4 Antibiyotik direncinin VITEK sistemine göre dağılımı 49
Şekil 4.5 İzole *E. coli* arasında ESBL genlerinin dağılımı 52
Şekil 4.6 - a- *E.coli* izolatlarında CTX-M geninin PCR ürününün jel elektroforezi, L = DNA moleküler boyut markörleri (100 bp), 1'den 19'a kadar izolatların sayısını temsil eder 52
Şekil 4.6 - b- *E.coli* izolatlarında CTX-M geninin PCR ürününün jel elektroforezi, L = DNA moleküler boyut markörleri (100 bp), 20 ila 29, izolatların sayısını temsil eder, NC; negatif kontrol, PC; Pozitif kontrolü. Koşul 81 volt altında; 50 dakika 53
Şekil 4.7 - A- *E. coli* izolatlarında TEM geninin PCR ürününün jel elektroforezi L = DNA moleküler boyut markörleri (100 bp), 1'den 19'a kadar izolatların sayısını temsil eder 53
Şekil 4.7 - B- *E.coli* izolatlarında TEM geninin PCR ürününün jel elektroforezi, L = DNA moleküler boyut markörleri (100 bp), 20 ila 29 + NC, PC izolatların sayısını temsil eder. Koşul 81 volt altında; 50 dakika 54
Şekil 4.8 - a- *E.coli* izolatlarında OXA geninin PCR ürününün jel elektroforezi, L = DNA moleküler boyut markörleri (100 bp), 1'den 19'a kadar izolatların sayısını temsil eder 54
Şekil 4.8 - b- *E. coli* izolatlarında OXA geninin PCR ürününün jel elektroforezi, L = DNA moleküler boyut markörleri (100 bp), 20 ila 29 izolatların sayısını temsil eder; NC; negatif kontrol, PC; Pozitif kontrolü. Koşul 81 volt altında; 50 dakika . 55

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 *E. coli* bakterilerinin Bilimsel Sınıflandırması 4
Çizelge 3.1 Ekipman ve Aparatlar..... 22
Çizelge 3.2 Reaktifler ve kimyasallar 24
Çizelge 3.3 Antibiotikler (Diskler) 24
Çizelge 3.4 DNA ekstraksiyonu için Presto ™ Mini gDNA Bakteri Kiti 26
Çizelge 3.5 Primer sıralama listesi 27
Çizelge 3.6 Master Mix'in Tanımı 27
Çizelge 3.7 PCR reaksiyon karışımı 37
Çizelge 3.8 (TME) geni için program 37
Çizelge 3.9 (CTX-M) geni için program 37
Çizelge 3.10 (OXA) Geni Için Program 38
Çizelge 4.1 *E. coli*'nin klasik testle tanımlanma sıklığı ve yüzdesi..... 41
Çizelge 4.2 Çalışılan grubun tanımlayıcı istatistiği 43
Çizelge 4.3 İzole E.coli'nin disk birleştirme testi ile antibiyotik duyarlılığı (DCT)..... 44
Çizelge 4.4. ESBL direnci *E. coli* için VITEK testi ile antibiyotik duyarlılık testi..... 47
Çizelge 4.5 VITEK sistemi ile antibiyotik dağılımı ve direnç yüzdesi 48
Çizelge 4.6 En çok ESBL, genotipik tespit için seçilen *E.coli* izolatları taşıdı 50
Çizelge 4.7 Seçilen 29 *E. coli* izolatı arasında ESBL genlerinin sayısı ve yüzdesi..... 51
Çizelge 4.8 TEM gen dizilimi..... 57
Çizelge 4.9 CTX-M gen dizilimi..... 58

SIMGELER DIZINI

AMR	Antimikrobiyal direnç
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CTX	Sefotaksimaz beta-laktamaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
E. coli	*Escherichia coli*
EAEC	Enteroagregatif *Escherichia coli*
EDTA	Etilen diamin tetra asetat
EHEC	Enterohemorajik *Escherichia coli*
EIEC	Enteroinvaziv *Escherichia coli*
EPEC	Enteropatojenik *Escherichia coli*
ETEC	Enterotoksijenik *Escherichia coli*
EUCAST	Avrupa Antimikrobik Duyarlılık Testleri Komitesi
ExPEC	Bağırsak dışı patojenik *E. coli*
ESBL	Genişletilmiş spektrumlu β-laktamaz
ESBL-E	Genişletilmiş spektrumlu β-laktamaz üreten Enterobacterales
ESBL-EC	Genişletilmiş spektrumlu β-laktamaz üreten *Escherichia coli*
LPS	Lipopolisakkarit
OXA	Oksasilinazlar tipi b-laktamaz
PBP	Penisilin bağlayıcı protein
PCR	Polimeraz zincirleme reaksiyonu
SHV	Sülfhidril değişken beta-laktamaz
TEM	Temoneira beta-laktamaz
UPEC	Üropatojenik *E. coli*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Giriş

Patojenik *Escherichia* coli'nin neden olduğu mikrobiyal direnç, dünya çapında önemli bir sorundur. Antibakteriyel ajanlar, özellikle beta-laktamlar, Enterobacteriaceae'ye karşı daha az etkili hale geliyor (Dia *et al.* 2016). Antimikrobiyal dirençli bakteriler arasında, *E. col*, idrar yolu enfeksiyonunun ortak bir nedenini düşünen Enterobacteriaceae ailesindeki oldukça endişeli bakterilerden biridir. Yaygın bir nozokomiyal ve toplum kaynaklı bakteriyel enfeksiyon olan idrar yolu enfeksiyonları (İYE) tüm cinsiyetlerde ve yaş gruplarında görülür (Alqasim *et al.* 2018), *E.coli*'nin İYE'lerin ana nedensel ajanı olduğu iyi bilinmektedir (Farajnia *et al.* 2009), ve üropatojenik *E. coli* (UPEC) grubu, toplumdan edinilen İYE'lerin yaklaşık % 90'ına neden olma kapasitesine sahiptir (Zhang and Foxman 2003, Kucheria ve ark. 2005). *E. coli*'nin çok sayıda antibiyotiğe karşı antibiyotik direnci şimdi gelişmekte ve evrimleşmektedir (Shrestha *et al.* 2019). *E. coli*, beta-laktamlar ve florokinolonlar dahil olmak üzere çok çeşitli farklı antimikrobiyal sınıflara karşı dirençlidir, bu da çoklu dirençli bir fenotip ve antimikrobiyal tedavilerde sınırlamalara neden olur (Schwaber *et al.* 2005, Morosini *et al.* 2006). Yeni üçüncü veya dördüncü nesil antibiyotiğe dirençli olanlar da dahil olmak üzere beta-laktamlara karşı önemli bir direnç mekanizması, antibiyotiklerin genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar tarafından yok edilmesinden kaynaklanmaktadır (ESBL'ler) (Feizabadi *et al.* 2010). ESBL'ler, penisilinler, aztreonam ve sefalosporinlerin β-laktam halkasını hidrolize etme kabiliyetine sahip bir beta-laktamaz dalıdır. Bununla birlikte, sıklıkla sefamisinlere ve karbapenemlere duyarlı kalırlar (imipenem and ertapenems) (Tissera and Lee 2013). ESBL'ler, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi β-laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilir ve genellikle çeşitli diğer genleri içeren büyük plazmidler üzerinde taşınırlar ve diğer antibiyotik sınıflarına karşı direnç oluştururlar. ESBL kodlayan genler, *E. coli* gibi iki veya daha fazla bakteri arasında kolayca transfer olabilen bakteriyel DNA, plazmitler veya transpozonlarda bulunur (Moghaddam *et al.* 2014, Niumsup *et al.* 2018). Tanımlanmış birkaç ESBL ailesi vardır, ancak ESBL'lerin çoğu

TEM, CTX-M, OXA ve SHV'nin dört büyük ailesine aittir (Pitout and Laupland 2008, Naseer and Sundsfjord 2011). TEM ilk olarak, kan örneğinden izole edilen Yunanistan'da Temoniera adlı bir hastadan izole edilen *E. coli*'de bildirilmiştir (Medeiros 1984). Bu beta-laktamaz türü o zamandan beri dünya çapında yayılmıştır ve penisilinleri ile birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilir ancak oksiimino (üçüncü kuşak) sefalosporinleri etkilemez (Stürenburg and Mack 2003). CTX-M, insan izolatlarında en yaygın ve halen artarak tespit edilen beta-laktamaz türüdür (Canton and Coque 2006). CTX adı, enzimin (sefotaksimaz) sefotaksim hidrolize etme kabiliyetinden türemiştir (Bradford *et al.* 1998, Oliver *et al.* 2001). CTX-M ilk olarak 1988'de Japonya'da tanımlandı, ardından FEC olarak adlandırılmıştır (Fujisawa *E. coli*). CTX-M enzimleri, Klyuvera türlerinden kromozom olarak kodlanmış beta-laktamazlardan türemiştir (Matsumoto *et al.* 1988). OXA tipi oksasilinazlar, bu beta-laktamaz türü Ambler sınıfı D ve fonksiyonel grup 2d'ye aittir ve oksasilin ve kloksasiline karşı yüksek hidrolitik etki gösterir ve klavulanik asit yoluyla beklenmedik bir eşzamanlı inhibisyon göstermektedir (Bush *et al.* 1995). OXA genellikle Psödomonas aeruginosa'da tespit edilir (Weldhagen *et al.* 2003), aynı zamanda *E. coli* dahil olmak üzere diğer Gram-negatif bakterilerde de (Paterson and Bonomo 2005). ESBL üreten *E. coli*, fenotipik veya genotipik yöntemlerle tespit edilebilir, bu tür dirençli suşların doğru tanımlanması için genotipik yöntemler gerekli görünmektedir.

1.2 Amaç

Bu çalışma, idrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan alındıanı idrar örneklerinden izole edilen genişletilmiş spektrumlu β-laktamaz (ESBL) pozitif *E. coli* suşlarının antibiyotik duyarlılık paternlerinin hem fenotipik hem de genotipik ESBL genlerinin profillerini belirlemeyi amaçlamaktadır. Ayrıca, epidemiyolojileri ve enfeksiyonlarıyla ilgili risk faktörleri hakkında uygulanabilir bilgiler sağlayabilen moleküler tekniklerle üç beta-laktamaz geninin (blaCTX-M, blaTEM ve blaOXA) prevalansını belirlemek için bölgemizde çalışıldı.

2. LİTERATÜR İNCELEMESİ

2.1 *Escherichia coli* (*E. coli*) Genel Bakış

Enterobacteriaceae ailesinin üyelerinden *Escherichia coli* bakterisi, fakültatif anaerobik bir bakteridir, gram negatif, basil, laktoz fermente edilir ve çoğu ramenoz ve Sorbitol için fermente edilerek büyümeleri için optimum sıcaklık olan glukoronidaz-3 üretir (36 -37° C) (Jawetz *et al.* 2016, Wanger *et al.* 2017). Katalaz testi için pozitif ve oksidaz testi için negatif, kırmızı metil testi için pozitif ve Vogase testi için negatif - Proskaue (Hemraj *et al.* 2013). *E. coli*'nin doğal yaşam alanı insan ve hayvanların bağırsaklarında bulunur ve ayrıca toprakta ve suda da sıklıkla bulunur (Tenaillon *et al.* 2010, Murray 2015). Diğer bazı bakteri türlerinde olduğu gibi, *E. coli* fırsatçı bir patojendir. Bu, insan mikrobiyal florasının doğal bir parçası olduğu anlamına gelir. Ancak bağırsak mukozasından idrar yolu, safra kesesi veya kan akımı gibi diğer organlara aktarıldığında, *E. coli* potansiyel olarak ölümcül enfeksiyonlara neden olabilir (Tenaillon *et al.* 2010). Hem zararsız kommensal suşlardan hem de bağırsak veya ekstra bağırsak hastalıklarına neden olabilen çeşitli patojenik formlardan oluşan çok sayıda bakteri türü vardır (Löhr *et al.* 2013, Jørgensen *et al.* 2016). Pek çok bakteri türü idrar yollarında enfeksiyona neden olabilir. Fakat gerçekte, dünyadaki idrar yolu enfeksiyonlarının yaklaşık (% 80 ila% 90'ı) insanlarda idrar yolu enfeksiyonlarına neden olan ekstraintestinal patojenik *E. coli* suşlarından kaynaklanmaktadır (Ardakani & Ranjbar 2016). Genelde patojenik *E. coli* iki ana gruba ayrılır: diyareajenik *E. coli* ve iki ana patojeni olan Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC), üropatojenik *E. coli* (UPEC) ve neonatal menenjit *E. coli* (NMEC) olarak ayrılır.

2.1.1 *E. coli*'nin Sınıflandırılması

E. coli, ilk olarak Alman bilim adamı (Theodore Escherich 1885) tarafından, doğumdan hemen sonra bağırsaklara endemik olan birlikte yaşayan bakteriler olarak bebeklerin dışkısındaki bağırsaklardaki doğal bakterileri araştırırken tanımlanmıştır. 1945'te bilim adamı Bray, İngiltere'de bebek ishalindin ana nedeninin Enteropatojenik *E.coli* olarak

adlandırılan bir *E. coli* bakteri türü olduğunu bulmuştur (EPEC) (Bray 1945). *Escherichia* cinsi, diğer *Enterobacteriaceae* familyasıyla, özellikle de beş tür içeren Shigella cinsi ile yakından ilişkilidir. *(E. fergosonii, E. Hermanii, E. Blattae, E. coli E. vunevis),* bazı biyokimyasal reaksiyonlarla kendi aralarında farklılık gösterir. Ancak, *E. coli* insan hastalıklarında en önemli ve yaygın olanıdır (Olowe *et al.* 2017). Bergey'in el kitabına göre bağırsak ailesi içinde sınıflandırılan *E. coli* Bilimsel sınıflandırma (Boone and Castenholz 2001).

Çizelge 2.1 *E. coli* bakterilerinin Bilimsel Sınıflandırması (Garrity 2005)

Bilimsel Sınıflandırma	
Alem	**Öbakteri**
Filum	**Proteobacteria**
Sınıf	**Gammaproteobacteria**
Grup	**Enterobacteriales**
Familya	**Enterobacteriaceae**
Tür	***Escherichia***
Cins	***Escherichia coli***

2.1.2 *E. coli* Türleri

İshale neden olan ishalik *E. coli* (DEC), özelliklerine, spesifik vahşet faktörlerine ve bu faktörlerin işleyişine göre altı türe ayrılır (Rivas *et al.* 2015, Malema *et al.* 2018).

1. Shiga-Toxin Üreten *Escherichia coli* (STEC) veya Enterohemorhagic *Escherichia coli* (EHEC).
2. Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC).
3. Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC) .
4. Enteroagregatif *Escherichia coli* (EAEC).
5. Enteroinvaziv *Escherichia coli* (EIEC).
6. Dağınık Yapışan *Escherichia coli* (DAEC).

2.1.3 Serotip

Serotipleme, 1940'lardan beri var olan ve o zamandan beri standart prosedürlerde geliştirilen *Escherichia coli'*nin bir sınıflandırma tekniği olarak kabul edilir. Üç yapının bir kombinasyonu, serotipleme sürecinin temelidir: kapsüler antijen (K), lipopolisakkarit (LPS) (O antijen) ve flagella (H) antijenflag. Sadece birkaç laboratuvar K tiplemesi yapabildiğinden, O: H serotiplemesi patojenik *E. coli'nin* karakterizasyonu için altın standart haline gelmiştir. O: H serotiplemesi, salgınların saptanmasında, epidemiyolojik sürveyans için, *E. coli*'nin taksonomik farklılaşmasında, türler içindeki patojenik serotiplerin saptanmasında ve klonal ve evrimsel çalışmalarda çok önemlidir.

2.1.4 Virülans faktörleri

E. coli, hastalıklara yatkınlığı artıran birçok virülans faktörüne sahiptir, bunlardan en önemlileri idrar yolu enfeksiyonlarıdır, bu faktörlerden biri de hemolizin enzimine sahip olmaları nedeniyle parçalanma şekline bağlı olan eritrositleri analiz etme yeteneğidir (Alfa - α, Beta-, Gama- *γ).* Diğer bir virülans faktörü, antijen-O (somatik antijen O) içeren lipopolisakkaridden (LPS) oluşan endotoksinler gibi yüzey yapıları, özellikle mesanenin astarı, ve ayrıca konağın bağışıklığının üstesinden gelmesini sağlar, için bakterilere ev sahipliği yapan hücrelere yerleşme yeteneği veren bakteri bulundurmasıdır. Bazıları, (kapsüler antijen K) içeren ve ayrıca hareketli türlerde hareket aracı olarak kullanılan flagella adı verilen diğer yüzey yapılarına sahip ve ayrıca flagellar antijen H üzerinde bu yapıları içeren bir polisakkarit kapsül üretme kabiliyetine sahiptir, bu antijenler bakterilere konağın bağışıklık sistemini yenme yeteneği verir. Bakteriler tarafından biyo-membranın (biyofilm) üretimini kolaylaştıran fiziksel ve kimyasal bir diziye sahip kıvrımlı liflere de sahiptir. Bu bakteriler ayrıca, dış zar veziküllerinde bulunan ve bakteriyel toksinler, enzimler ve yapışma faktörleri ile ilişkili olan ve konağın hücrelerine gönderilmesini kolaylaştıran sistem olarak işlev gören veziküllere sahiptir. Ayrıca, bakterilerin enfekte olma yeteneğini artıran dış zar proteinleri (OMP'ler), toksinler ve sekresyonlar da vardır (Terlizzi *et al.* 2017). Üç türden (S-fimbrial, P-fimbrial ve F-Fimbrial) ve tip (Tip l Pilli) Fimbriae veya Pilli, onlara bir biyomembran oluşturma yeteneği kazandırarak ve böylece antibiyotik direnci kazanma yeteneklerini artırarak

bakterilerin eve ekmek getiren kişinin dokularına yapışmasına yardımcı olan en önemli virülans faktörlerinden biridir (Neamati *et al.* 2015, Spaulding *et al.* 2017).

E. coli, diğer bakteri türlerini öldüren ve böylece bakterilerin korunmasına katkıda bulunan (kolicin) adı verilen bakteriyosine ve diğer bakteri türlerinin hücrelerinde DNA'yı inhibe eden toksinler olan siklomodülinlere sahiptir. Ayrıca sabit ısı toksinleri (EAEC) tarafından üretilen (Enteroaggregatif ısı - kararlı toksin 1 (EAST1), ısıya dayanıklı enterotoksin ve (ETEC) bakterisi tarafından üretilen Isıya dayanıksız enterotoksin, kırmı kan hücrelerine ve bağırsak hücrelerine toksik olan Plazmid kodlu toksin (PET), Zehir benzeri Shigella toksinleri 1 (Shigella enterotoksin SHET1) ve vakuolasyon ototransporter toksini (VAT) (VAT) içerir (Soltani et al., 2018). ayrıca bakterilere karbapenemlere ve betalaktamlara direnç veren karbapenemaz enzimlerine sahiptir, B-laktamalar, bakterilere β-laktam direnci veren sefalosporinleri ve penisilini, aminoglikozitlere dirençli bakteriler veren adeniltransferaz asetiltransferaz enzimlerini ve fosfotransferazı içerir (Zowawi *et al.* 2015).

2.1.5 *E. coli'nin* Patojenitesi

E.coli'nin patojeniteye neden olma yeteneği, *E.coli'nin* insanlara veya sağlıklı hayvanlara bağlanmasını sağlayan kombinasyon virülans faktörüne sahip olmasından kaynaklanmaktadır "Patotiplere" ait kombinasyon virülans faktörlerine sahip suş. İshal hastalığına neden olan, enterohaemorajik, patojenik (EPEC), enterotoksijenik (ETEC), enteroagregatif (EAEC/EAggEC), enteroinvazif (EIEC) ve yaygın olarak yapışık (DAEC) E.coli'ye neden olan daha yaygın altı E.coli patojenik türü. In addition, extraintestinal infections are caused by ExPEC, including uropathogenic *E.coli* (UPEC) and meningitis-associated *E.coli* (MNEC) (Söderlund 2015). Bu bakteriler, bağırsakların içinde ve dışında birçok hastalığa neden olabilir:

1. Enterik hastalıklar veya ishalli hastalıklar:

Yapışma anında bakteriler bağırsak toksinleri enterotoksinleri üretirler ve bu toksinlerden ikisi sulu ishal sulu zehirler ısıya neden olur - kararsız toksin (LT) toksin simbiyoz vibrio kolera ve sabit sıcaklık toksinler, ısıya dayanıklı toksin (ST). Shiga toksinleri adı verilen shigella benzeri toksinler kanlı ishale neden olurlar ve bağırsakların iç yüzeyine batırıldıktan sonra bakterilerin toksinlerine değil kanlı ishale neden olabilirler ve dizanteri denen bir hastalığa neden olabilirler (Levinson 2016).

2. Menenjit / Septisemi

Bebeklerde menenjit, (K1) adı verilen özel bir koruyucu antijene sahip *E. coli* bakterisinden kaynaklanabilir. Ayrıca kan zehirlenmesine LPS'den oluşan endotoksin içeren ve IgM antikorunun kaybı nedeniyle bebeklerde daha sık görülen *E. coli* bakterisi neden olur (Jaweetz *et al.* 2016, Soltani *et al.* 2018).

3. İdrar yolu enfeksiyonu

Üriner sistemdeki bakterilerin çoğalmasına bağlı olarak ortaya çıkan, üriner sistemin alt üriner kısmına (mesane ve uterus) ve oluşan üst üriner kısmına (üretra ve böbrek) saldıran idrar yolu bakteriyel enfeksiyonu idrar yolu enfeksiyonu olarak tanımlanmakradır.

Alt idrar yolundaki iltihaplanma sistit, üretrit ve deri ile ilişkili idrar yolu enfeksiyonuna yol açar. Böbrek enfeksiyonu, üretrit ve piyelonefrite yol açan üst üriner kısım enfeksiyonudur. *E. coli*, idrar yolu enfeksiyonları yoluyla başlıca bakteremi kaynağıdır (Forsyth *et al.* 2018, Foxman 2014).

2.1.6 *E. coli* Antimikrobiyal Direnç

Bakterilerin antibiyotiğe dirençli özelliği, dünyadaki en önemli sağlık ve ekonomik sorunlardan biridir ve araştırmacıları dirençli bakteri suşlarının üstesinden gelmek için yeni antikorları araştırmaya sevk eder. Dirençli bakterilerle enfeksiyon daha uzun tedaviye yol açar ve enfeksiyon riskini artırır. Kapsamlı ilaca Dirençli (XDR), çoklu ilaca dirençli (MDR) ve Pan - İlaç Direnci (PDR) dahil olmak üzere çeşitli antibiyotik direnci modelleri vardır, direnç türü (MDR), bakterilerin üçünden en az birine dirençli olduğu anlamına gelir. Antibiyotikler ve direnç tipi (XDR), bakterilerin alındıan antibiyotiklerin her ikisine veya tümüne dirençli olduğu anlamına gelirken, direnç tipi (PDR), bakterilerin tüm antibiyotiklere dirençli olduğu anlamına gelir (Basak *et al.* 2016). Bu direnç özelliği, ya genlerdeki mutasyonlarla (kromozomal mutasyonlar) ya da genetik materyalin bir bakteriden diğerine çeşitli şekillerde aktarılmasıyla elde edilir. Genetik materyalin hücreler ve plazmitler ve transpozonlar gibi doğrudan olanlar arasında veya transformasyonla iletildiği konjugasyon. Bakteriyel genom, ölü bakterilerden alındır veya transdüksiyon yoluyla, genetik bilgi bakteriyofajlarla bakteriyel hücreler arasında iletilir (Laird 2016). (ESBL) üreten *E. coli*, İYE enfeksiyonuna neden olan sorunlardan biri olarak kabul edilir, ancak florokinolonlarda ve aminoglikozid direncinde gözlenen bir artış, enfekte hastalar için sorunlu ve azaltılmış tedavi seçeneklerine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. ESBL üreten E.coli'nin neden olduğu yüksek İYE prevalansı, çevrede ve hastanelerde yapılan çeşitli çalışmalarla zaten tanımlanmıştır (Campos *et al.* 2018). Genel olarak, *E. coli*'nin direnç geliştirdiği beş ana teknik vardır, Birincisi, β-laktamazlar, hidrolize edici ve inaktive edici beta-laktam antibiyotikler gibi enzim kodlayan genler bakteriler tarafından taşınabilir. İkincisi, alternatif metabolik yollar antibiyotikler tarafından inhibe edilen yolları baypas edebilir. Üçüncüsü, membran porinlerinde yapılan değişiklikler geçirgenliğin azalmasına neden olur. Dördüncüsü, bakteriler antibiyotikleri hücre dışına aktif olarak taşımak için dışarı akış pompalarını eksprese edebilir ve son olarak, beşincisi, antibiyotik bağlanma bölgesi genlerinde spesifik hedefi veya fonksiyonunu değiştiren mutasyonlar meydana gelebilir (Mc Dermott *et al.* 2003, Ho *et al.* 2010). Bu mutasyon, daha önce yaklaşık % 70 tetrasiklin streptomisine, sülfizoksazole dirençli olan antibiyotiklere karşı direnci artırmıştır, ancak

mutasyonlardan ve dirençli plazmidlerin iletilmesinden sonra ampisilin, kanamisin ve tikarsiline dirençli hale gelmiştir (Afzal 2017, Shariff *et al.* 2013).

2.1.7 *E. coli*'nin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Direnç genlerinin aktarılmasından sonra antibiyotiklere dirençli mekanizmalar aşağıdaki gibidir:

1. Hedef değişikliği

Bu mekanizma, nükleik asitlerin yapımını etkiler, Siprofloksasin ve Rifamisin gibi anti-florokinolon bakterilerinin direncini arttırır, ayrıca ribozomlardaki etkisi protein dengesizliklerine neden olarak bakterilerin eritrosmiye ve rifamisine karşı direncinin artmasına neden olur (Kotsyuba *et al.* 2014).

2. Hücre zarı geçirgenliğinin değiştirilmesi

Hücre zarındaki proteinin değişen doğasının bir sonucu olarak, antibiyotik sistemin hareketini etkileyen ve zardaki taşıma sistemlerini geçemez hale getiren hücre zarının veya zar taşıma sistemlerinin deliklerinin değişmesine neden olur, ve bu değişikliklerin bir sonucu olarak bu mekanizma bakterilere anti-tetrasiklin ve siprofloksasin gibi kinolonlara ve gentamisin gibi bazı aminoglikozit türlerine ve ayrıca nitrofurantoin antibiyotiğine direnç kazandırır (Kapoor *et al.* 2017).

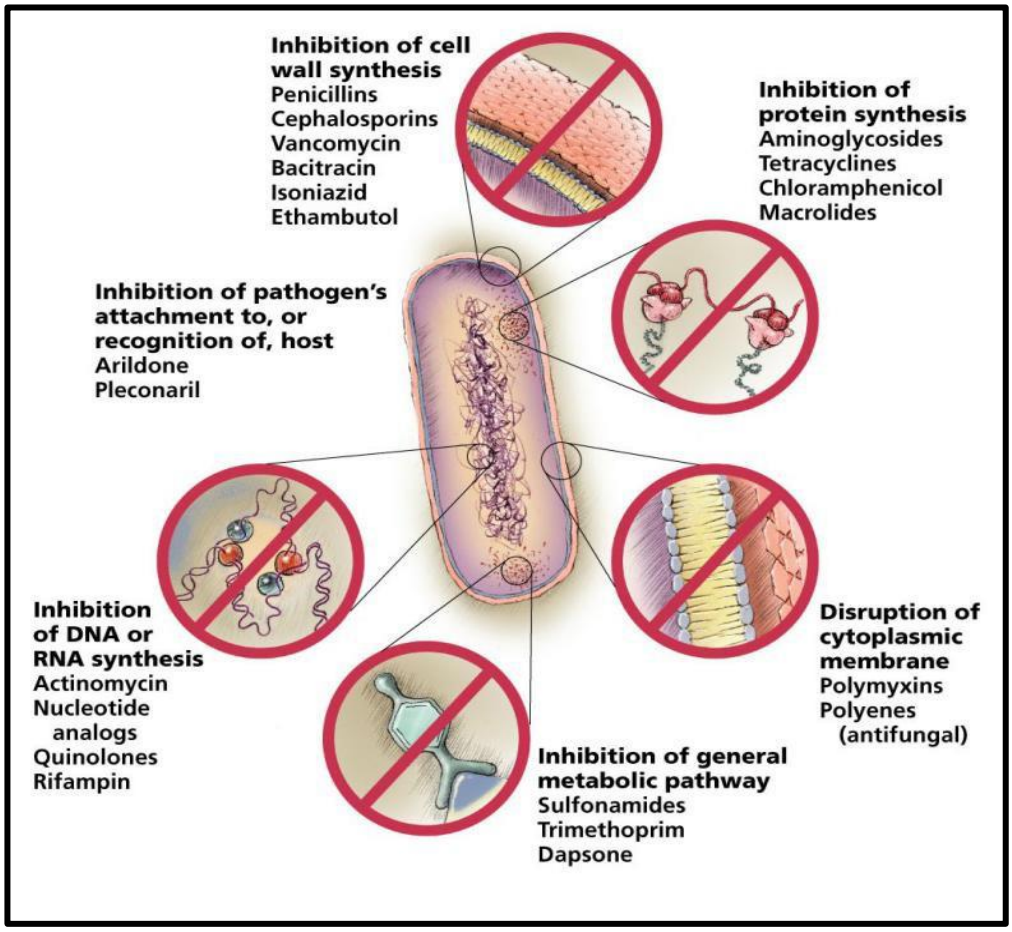
3. Enzim üretimi

Penisilinler ve sefalsporinlerde bulunan β-laktam halkası β-laktam tarafından tahrip edildiğinden, DNA duplikasyonunu engelleyen topoizomeraz enzimleri üreten kloramfenikol, glikopeptid ve kinolonların aminoglikozid antikorlarının yok edilmesinde

enzimlerin rolü de bu mekanizma hücresel duvarın yapısını etkiler ve bu antibiyotiklere dirençli bakterilerin elde edilmesiyle sonuçlanır (Kotsyuba *et al.* 2014).

4. Metabolik Yolların Değiştirilmesi

Bakteriler, hazır ortamdan aldıkları folik asidi kullanarak metabolik yollarını değiştirerek, trimetoprim ve sülfonamidlere direnç kazanmalarını sağlar (Kapoor *et al.* 2017). Bakterilerden zararlı maddeleri pompalayan ve yetersiz bir ortamda kalmalarına izin veren akış pompalarına sahip olmanın yanı sıra (Paltansing 2015).



Şekil 2.1 Antimikrobiyal ilaçların mekanizmaları (Gillor *et al.* 2004)

2.2 B-Laktamlar ve B-Laktamazlar

β-laktamlar geniş bir antibiyotik sınıfını temsil eder. Bu, moleküler yapılarında bir β-laktam halkası ile karakterize edilir. Penisilin en iyi bilinen β-laktamdır, ancak son 60 yılda bu grup antibiyotiklerin çeşitli yeni üyeleri keşfedilmiş ve geliştirilmiştir. Bugün bile, Fleming'in penisilini keşfetmesinden doksan yıl sonra,-laktamlar en önemli antibiyotik ilaçlarımızdır (Simonsen and Urdahl 2017). Farklı β-laktam antibiyotiklerde, β-laktam halkası diğer moleküllere bağlanır ve bu ek moleküllere göre ilaçları aşağıdaki alt gruplara ayırırız: penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktamlar. İlaçlar, bakteri hücre duvarındaki penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP'ler) bağlanarak hücre duvarı sentezini bozar. β-laktamlar bakterisidal antimikrobiyal ajanlar olarak kabul edilir.

2.2.1 B-Laktamlara Direnç

β-Laktamlar, penisilin, karbapenemler ve sefalosporin monobaktemlerini içeren antibiyotik grubu olarak, bu antibiyotikler bakteri hücre duvarına etki eder. Bu antibiyotikler, çapraz bağlanan hücre duvarı enzimleri karboksipeptidazları ve transpeptidazları hedef alır. Bu enzimler, bakteri hücre duvarının peptidoglikanını D-alal D-ala dipeptide çapraz bağlamaya yarayan penisilin bağlayıcı proteinleri (PBP'ler) bağlama kabiliyetine sahiptir (Livermore and Paterson 2006)

β-Laktam antibiyotikleri, duyarlı bakterileri öldürerek ve dirençli olanların hayatta kalmasına izin vererek Darwinci bir seçim uyguladı. Enterokoklarda olduğu gibi, beta-laktamlara direnç, doğası gereği duyarsız olan ve doğası gereği duyarsız (PBP'ler) olan belirli bir türe özgü olabilir. Alternatif olarak, spontan mutasyon veya DNA transferi yoluyla elde edilebilir. İşlevsel olarak, β-laktam direnci, β-laktamaz üretiminin, geçirimsizliğin, dışa akımın ve hedef modifikasyonunun bir sonucu olabilir. Bu modaliteler tek başlarına veya farklı kombinasyonlarda ortaya çıkabilir. Standart değişiklikler (PBP'ler) veya ek miktarda-laktam duyarlılığı elde edilmeleri, pnömokoklar ve MRSA (PBP'ler) gibi gram pozitif koklarda en yaygın direnç nedenleridir. Bununla

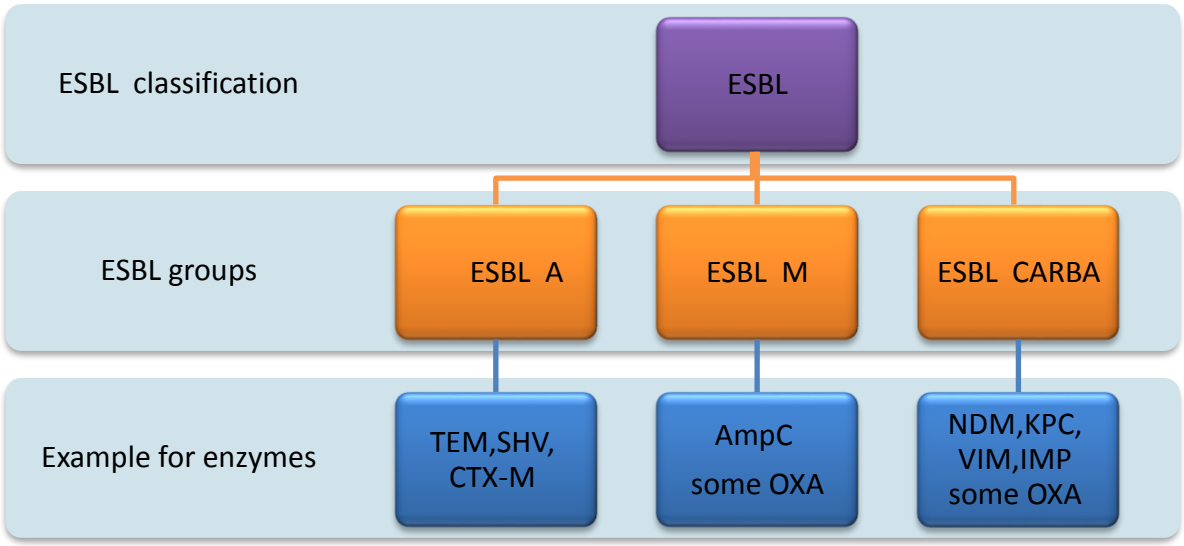
birlikte, gram-negatif bakterilerde direnç, genellikle, doğal olarak yukarı regüle edilmiş geçirimsizlik ve dışarı akma ile birlikte, endojen edildiilmiş β-laktamazların bir kombinasyonundan kaynaklanmaktadır (Livermore and Paterson 2006).

2.2.2 ESBL'nin tanımı ve sınıflandırılması

ESBL'ler, penisilinlere bakteri direnci sağlayabilen β-laktamazlardır; birinci, ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinler; ve bu antibiyotiklerin hidrolizi ile ve klavulanik asit gibi β-laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilen aztreonam (ancak sefamisin veya karbapenemler değil) (Paterson and Bonomo 2005).

Ambler moleküler sınıflandırması ve Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel sınıflandırması, β-laktamazlar için en yaygın kullanılan iki sınıflandırma sistemidir (Ambler *et al.* 1991, Bush *et al.* 1995, Rasmussen and Bush 1997). Ambler şeması β-laktamazları dört ana gruba ayırır (A'dan D'ye). Bu sınıflandırma şemasının temeli, fenotipik özelliklere değil, protein homolojisine (amino asit benzerliği) dayanır. A, C ve D sınıflarının serin β-laktamazları, Ambler sınıflandırma şemasında A sınıfının β-laktamazlarıdır. Buna karşılık, B sınıfı enzimler, metalo-β-laktamazlardır. OXA tipi enzimler (D sınıfı enzimler olan) haricinde, ESBL'ler moleküler sınıf A'dır. İşlevsel benzerliklere göre; Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırma şeması, β-laktamaz grupları (substrat ve inhibitör profili). Bu sınıflandırma sisteminde dört ana grup ve çok sayıda alt grup vardır. Bir teşhis laboratuvarında, bu sınıflandırma şeması, klinik olarak önemli β-laktamaz ve-laktam substratlarını dikkate aldığından, hekim veya mikrobiyolog için çok daha acil ilgi konusudur. Bu sınıflandırmanın içinde, ESBL'ler grup 2be veya grup 2d'ye (OXA-tipi) aittir, ikincisi grup 2be enzimlerinin temel özelliklerinin çoğunu paylaşır, ancak inhibitör dirençli olma açısından farklılık gösterir (Bush *et al.* 1995). 2be tanımı, tüm bu enzimlerin grup 2b β-laktamazlardan kaynaklandığını gösterir (a, TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 olarak); 2be'nin "e" si, β-laktamazların geniş bir spektruma sahip olduğunu belirtir. TEM-1, TEM-2 veya SHV-1 ile ilgili ESBL'ler progenitörlerinden bir amino asit kadar farklıdır. Bu sonuçlar, ESBL'lerin enzimatik işlevinde büyük bir değişikliğe yol açar, böylece artık üçüncü nesil sefalosporinleri veya aztreonamı hidrolize edebilirler (dolayısıyla ana

enzimlere göre aralık uzantısı). Klavulanik asit gibi β-laktamaz inhibitörleri tarafından inhibisyon ve sefamisinleri hidrolize edememe ESBL'leri, substratları olarak üçüncü nesil sefalosporinlere sahip olan ancak klavulanik asit tarafından inhibe edilmeyen AmpC tipi β-laktamazlardan (grup 1) ayırır. Stabil bir şekilde bastırılmış AmpC-tipi β-laktamazların aşırı üretilmiş mutantlarının toplanması, üçüncü kuşak sefalosporinlerin bu enzimleri içeren organizmalarla şiddetli enfeksiyonları tedavi etmek için kullanıldığında klinik başarısızlıkla ilişkilendirilmiştir (Chow *et al.* 1991, Kaye *et al.* 2001, Cosgrove *et al.* 2002). Genel olarak, dördüncü nesil sefepim olan sefalosporin, AmpC tipi β-laktamaz üreten organizmalara karşı klinik olarak faydalıdır (Sanders 1996) ancak ESBL üreten organizmaların tedavisinde daha az yararlı olabilir (Yuan *et al.* 1998). Ek olarak, Stenotrophomonas maltophilia gibi organizmalar tarafından üretilen metaloenzimler (grup 3) üçüncü nesil sefalosporinleri (ve karbapenemleri) hidrolize edebilir, ancak bir ağır metal şelatör olan ancak klavulanik asit olmayan etilen-diamin tetra-asetik asit (EDTA) tarafından inhibe edilir (Wachino *et al.* 2004).



Şekil 2.2 A GöreESBL Sınıflandırması (Giske *et al.* 2009)

2.2.3 Risk ESBL enfeksiyonu

ESBL üreten kolonizasyon veya enfeksiyon geliştirme riski yüksek olan hastalar, genellikle uzun süreli hastanede kalan kronik hasta hastalardır; ki bu kişilerde invazif tıbbi cihazlar (üriner kateterler, endotrakeal tüpler, santral venöz hatlar) uzun bir süre

mevcuttur (Paterson and Bonomo 2005). Bireysel çalışmalarda, nazogastrik tüplerin varlığı da dahil olmak üzere başka risk faktörleri bulunmuştur (Asensio *et al.* 2000). Gastrostomi veya jejunostomi tüpleri (Schiappa *et al.* 1996), veya arteriyel hatlar; total parenteral nütrisyon uygulaması (Pena *et al.* 1997). Yakın zamandaki ameliyat (de Champs *et al.* 1991). Hemodiyaliz (de Champs *et al.* 1991) dekübit ülserleri (Weldhagen and Prinsloo 2004), ve zayıf beslenme durumu (Mangeney *et al.* 2000). Antibiyotiklerin yoğun kullanımı aynı zamanda ESBL üreten bir organizmanın edinilmesi için bir risk faktörüdür (Ariffin *et al.* 2000). Çok sayıda çalışma, üçüncü nesil sefalosporin kullanımı ile ESBL üreten bir suşun edildiimi arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir (Ariffin *et al.* 2000, Pessoa-Silva *et al.* 2003). Bununla birlikte, belki de ESBL üreten bir organizmanın nozokomiyal edildiimi için en büyük risk faktörü, ESBL üreten organizmaları olan diğer hastalarla bir koğuşta veya odada konaklamadır (Livermore and Paterson 2006).

ESBL üreten organizmalarla, özellikle CTX-M üreticileriyle enfeksiyon veya kolonizasyon için risk faktörleri, yakın zamanda hastaneye yatış geçmişini içerir; penisilinler, sefalosporinler ve kinolonlarla tedavi; 65 yaş ve üstü; demans: ve diyabet (Paterson and Bonomo 2005). Kesin bir kanıt olmamasına rağmen, hayvancılıkta seftiofur gibi veterinerlik oksiimino sefalosporinlerin kullanımı, grup ESBL üreticileriyle olası bir kolonizasyon kaynağı olabilir (Livermore and Paterson 2006).

2.2.4 β-laktamazların Genetiği

Yeni β-laktamazların çoğunun yayılmasına plazmitler neden olur, ancak bu enzimleri kodlayan genler de bakteri kromozomunda bulunabilir. Bazı β-laktamazları kodlayan genler, transpozonlar tarafından taşınır (Hedges and Jacob 1974). Yeni β-laktamazların çoğu için genler integronlarda bulunur. Bunlar genellikle diğer antibiyotiklere direnç kazandıran genleri içerir. Bu nedenle, yeni-laktamazlar tipik olarak çeşitli antimikrobiyal ajanlara toleranslı organizmalar tarafından üretilir. Bazen, çeşitli bakteremi epizodları için tedavi edilen bir hastadan izole edilen bir organizmada, ESBL fenotipi ortaya çıkar (Rasheed *et al.* 1997). Ancak ESBL üreten bir plazmit veya suş, birçok hastaya çok daha

sık yayılır, böylece hastane salgınlarında genellikle bir tür ESBL baskındır. Sabit bir coğrafi dağılımın benzersiz TEM tipi ESBL çeşitlerine sahip olduğu görülmektedir. Dünya çapında en azından bazı SHV biçimleri bulunmasına rağmen, çok odaklı bir kökene sahip olduklarını düşündürür. Örneğin, TEM-3 Fransa'da yaygındır ve diğer birkaç Avrupa ülkesinde raporlar vardır, ancak Amerika Birleşik Devletleri'nde hiçbir rapor bulunmazken, SHV-5 ve SHV-12 dünya çapında tespit edilmiştir. TEM-1 ve TEM-2-laktamazları kodlayan genler, bazı TEM tipi ESBL'leri kodlayan genler gibi transpozonlar tarafından taşınır (Heritage *et al.* 1992).

Çoğu *K. pneumonia* suşunda, SHV-1'i kodlayan gen kromozom üzerinde bulunur (Chaves *et al.* 2001, Haeggman *et al.* 1997). SHV genleri ayrıca iletilebilir plazmitlerde de oluşur; Örneğin, klebsiella kromozomundan görünüşte yakalanmış 7.5 kb'lik bir DNA bloğunda bulunmuştur (Preston *et al.* 2004). Kalan b-laktamaz formlarını kodlayan genlerin sıklıkla integronlara eklendiği, ancak başka yerlerden kaynaklandığı bulunmuştur. Örneğin, (kluyvera) 'nın kromozomunda, CTX-M tipi enzimlerin genleri, nadiren patojenik ortak organizmaların bir cinsi olarak bulunur. CTX-M grubu, daha sınırlı bir aktivite aralığına sahip bir progenitörden evrimleşmek yerine, b-laktamaz genlerinin bu kadar geniş bir çevresel rezervuardan plazmid edildiimi yoluyla birçok yerde ortaya çıkmış gibi görünmektedir. Integronlar ayrıca AmpC-tipi p-laktamazların plazmid edildiimine de katılırlar (Bonnet 2004). Bu plazmid aracılı enzimlerin çoğu, belirli türlerin kromozomal AmpC enzimleriyle ilişkili olabilir: bu nedenle ACC-1, Hafnia alvei tarafından üretilen enzim ile ilgilidir; ACT-1 ve MIR-1 enterobacter türlerinin enzimlerine; bazı CMY enzimlerinin yanı sıra sitrobacter türlerinin enzimlerine LAT-1 ve LAT-3; diğer CMY enzimleri ve FOX ve MOX aileleri aeromonas türlerinin enzimlerine; ve *Morganella morganii* enzimine DHA-1 (Philippon *et al.* 2002). IMP ve VIM ailelerindeki karbapenemazlar da integronlarda mevcuttur, ancak genlerinin kökeni henüz bilinmemektedir.

2.2.5 ESBL Enfeksiyonunu Tedavi Etmek

ESBL üreten organizmalar, birkaç oksiimino-β-laktama maruz kalma açısından farklılık gösterir ve bazılarına direnç göstermelerine rağmen diğerlerine karşı duyarlı görünebilirler. TEM ve SHV-tipi ESBL üreten organizmalar için, sefepime ve piperasilin / tazobaktama in vitro duyarlılık gibi görünen çok yaygındır, ancak her iki ilaç da aşı boyutu (10)^5'ten (10)^7'a arttığı için azaltılmış duyarlılıkla bir aşı etkisi gösterir. Organizmalara (Jacoby *et al.* 1997, Thomson and Moland 2001). Tipik bir inokülum kullanılmasına rağmen, belirli CTX-M tipi ve OXA tipi ESBL'leri olan suşlar, testte sefepime daha dirençlidir (Bonnet, 2004). Yalnızca ESBL üreten suşlar, in vitro sefamisinlere ve karbapenemlere karşı savunmasızdır ve bu ajanlarla çok az aşılama etkisi gösterir veya hiç göstermez (Jett *et al.* 1995). (AmpC) oluşturan suşlar normalde oksiimino-β-laktamlara ve sefamisinlere dirençlidir ve karbapenemlere yatkındır; Bununla birlikte, azalmış porin ekspresyonu, böyle bir karbapeneme dirençli suş da yaratabilir (Martínez-Martínez *et al.* 1999). IMP-, VIM- ve OXA-tipi karbapenemaz suşları genellikle aztreonamine karşı savunmasız kalır. (Nordmann and Poirel 2002). β-Laktam olmayan antibiyotiklere direnç, bu enzimlerden herhangi birini oluşturan suşlarda çok yaygındır, öyle ki,-laktam dışı tedavi için alternatif seçenekler doğrudan duyarlılık testi ile belirlenmek ister. Florokinolonlara ve amino-glikozitlere direnç özellikle yüksektir (G. A. Jacoby and Carreras 1990). Araştırmalar, ESBL oluşturan Enterobacteriaceae'nin *E. coli* olarak ürettiği enfeksiyonların, enfeksiyonun başlangıcında uygun antibiyotik tedavisine girişmedeki gecikmelerle ilişkili olduğunu ve böylece hastanede kalış süresini uzattığını ve bu da hastanede tıbbi masrafların artmasına neden olduğunu gösterdi (Rodríguez-Baño *et al.* 2018).

2.2.6 ESBL Direncinin Tespiti

Bakterilerin fenotipik olarak ESBL'ye karşı direncini araştırmak için birkaç tarama ve doğrulama testi uygulanmıştır. Bu testlerin uygulanması genellikle izole edilmiş bakteriler üzerinde bakteri izolasyonunu takiben yapılır ve antibiyotik duyarlılık testine tabi tutulur (Ben-Ami *et al.* 2006). ESBL tespitinde iki önemli adım vardır. İlk adım,

izolatların direncini veya azalmış duyarlılığı saptayan direnç veya azalmış duyarlılığı belirleyen bir sefalosporin gösterge tarama testidir, bu nedenle bu yöntem ESBL taşıması muhtemel izolatları tespit eder. İkinci adım oksiimino sefalosporin ve klavulanat arasındaki sinerjiyi kontrol eder ve diğer nedenler için dirençli izolatlardan alındıan ESBL izolatlarını tanır.

2.2.6.1 ESBL Tarama Yöntemleri

2.2.6.1.1 Disk Difüzyon Yöntemi

E.coli'nin ESBL üretimini taramak için CLISI, disk difüzyon yöntemini önermiştir. (Ceftazidime, Cefpodoxime, Aztreonam, Cefotaxime veya Ceftriaxone) antibiyotiklerine karşı ölçüye özgü inhibisyon bölgesine bağlı olarak izolatlar tarafından ESBL üretimini incelemek için disk difüzyon yöntemi prensibi. Bu antibiyotiklere karşı yüksek bölge inhibisyonu, ESBL üretimini gösterir. Aslında bu antibiyotiklerin birden fazla kullanılması, ESBL üretimini belirlemek için bu yöntemin doğruluğunu arttırır (Institute 2017).

Bakterilerin sefpodoksim antibiyotiğe duyarlılığının araştırmacının ESBL üreten ve üretmeyen K. pneumoniae ve *E. coli* bakterileri arasında ayrım yapmasını sağladığı görülmüştür. İlk olarak, CLSI, ESBL üretimini belirlemek için uygun bir test olarak 10-µg sefpodoksim disk konsantrasyonu altında 22 mm'den daha az bir bölge inhibisyonu önermiştir. 22 mm'den küçük bir inhibisyon bölgesi kullanan sefpodoksim tarama testinin, E.coli izolatları için ESBL üretiminin direnç durumunu incelemek için kullanıldığında özgüllükten yoksun olduğu kaydedildi. Bu nedenle, CLSI izolatlar için sefpodoksimin inhibisyon bölgesini ≤17 mm olarak değiştirmiştir ve bu izolat türleri ESBL üretimini belirlemek için diğer testlerle yeniden onaylanmalıdır (Institute 2017).

2.2.6.1.2 Seyreltme Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Seyreltme yöntemleri prensibi altında CLSI tarafından önerilen klebsiellae ve *E. coli*'nin ESBL üretimini taramak için (1 µg / ml) konsantrasyonda seftazidim, sefotaksim, seftriakson veya aztreonam antibiyotikler kullanılabilir. Test izolatları için sefalosporin için MIC skoru ≥2 µg / ml ESBL üretiminden şüphelidir ve bu izolatlar başka bir fenotipik testle yeniden onaylanmalıdır (Institute 2012). Başlangıçta sefpodoksim için önerilen tarama kriteri, potansiyel ESBL üreticileri olan izolatların sefpodoksim MIC değerinin ≥2 µg / ml olmasıydı.

2.2.6.2 ESBL Üretimi için Doğrulayıcı Testler

2.2.6.2.1 Fenotipleme Yöntemleri

2.2.6.2.1.1 Kombinasyon diskleri (Sefalosporin / klavulanat)

Klebsiellae ve *E. coli*, Salmonella türleri ve *P. Mirabilis* izolatlarında ESBL'lerin fenotipik olarak varlığını doğrulamak için CLSI, seftazidim (30 µg) sefotaksim (30 µg) diskler kullanan veya veya klavulanatsız (10 µg) diski önerir. CLSI, disk testlerinin birleşik gelişim içeren Mueller-Hinton agar üzerinde gerçekleştirilmesini öneriyor. ESBL üretiminin fenotipik doğrulaması, sefalosporin disklerinden herhangi birinin zon çapları ile ilgili sefalosporin / klavulanat disklerinin zon çapları arasında of 5 mm'den büyük veya eşit bir fark olarak kabul edilir (Wayne 2010).

2.2.6.2.1.2 Beslenme Ortamı Mikro Seyreltme

ESBL üretimi beslenme ortamı mikro-seyreltme yöntemi için izolatların test edilmesinin fenotipik doğrulaması için tavsiye edilir. Bu testlerde, beslenme ortamı mikro-seyreltme testlerinde seftazidim (0.25 ila 128 g/ml), seftazidim artı klavulanik asit (0.25/4 ila 128/4 g / ml), sefotaksim (0.25 ila 64 g / ml) ve sefotaksim artı klavulanik asit (0.25/4 ila 64/4 g/ml) tavsiye edilir (Queenan *et al.* 2004). Fenotipik doğrulama, tek başına test edildiğinde MIC ile karşılaştırıldığında klavulanik asit varlığında her iki sefalosporinin minimum inhibitör konsantrasyonunda (MİK) ≥3 iki kat seri seyreltme düşüşü olarak kabul edilir.

2.2.6.2.1.3 Çift Disk Difüzyon (Sinerji) Testi

Bu yöntemin ilkesi Fransız araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır (Jarlier *et al.* 1988, Brun-Buisson *et al.* 1987) aşılanmış agar plakasında amoksisilin / klavulanat diski (sırasıyla 20 g / 10 g) ve sefotaksim diski (30 g) ile yerleştirildiğinde sefotaksim ve klavulanat arasındaki sinerjiye bağlıdır (merkezden merkeze). Sefalosporin inhibisyon bölgesinin kenarının augmentin diske net bir şekilde genişlemesi, ESBL üretimi için pozitif olarak yorumlanır. ESBL üretimini tanımlamak için bu yöntemin hassasiyeti % 79 ile % 97 arasında ve özgüllükleri % 94 ile % 100 arasında değişmektedir (Randegger *et al.* 2001). Teknik olarak bu test basittir, ancak sonucun yorumu oldukça özneldir. İzolatların ESBL'sinin aktivitesi çok düşük olduğunda, bu testin duyarlılığı azalabilir. Özellikle *P. mirabilis* izolatları için sefalosporin ve aztreonam diskleri etrafında geniş inhibisyon bölgesine yol açan (Revathi *et al.* 1997).

2.2.6.2.1.4 VITEK ESBL Testi

Geleneksel VITEK kartlarını kullanan laboratuvarlar, MİK'ler ≤ 8 g / ml olduğunda ESBL üreten organizmaları sefalosporinlere duyarlı olarak hatalı şekilde bildirme riskiyle karşı karşıyadır (Steward *et al.* 2000). Artık test izolatlarının ESBL üretimini tespit etmek için özel bir kart FDA tarafından onaylanmıştır. (BioMerieux VITEKVITEK, Hazelton,

Missouri) şirketi tarafından üretilen VITEK ESBL kartı, sefotaksim ve seftazidim antibiyotiklerini tek başına (0.5 µg/mL) ve klavulanik asit ile kombinasyon alındıde (4 µg/mL) kullanır. Büyüme kontrol kuyusu belirlenen bir eşiğe ulaştığında (4-15 saatlik inkübasyon) kuyunun sonucunun analizi otomatik olarak yapılır.

2.2.6.2.1.5 E-Testi

ESBL'ler için E-Test AB Biodisk (Solna, İsveç), bir ucu bir seftazidim gradyanı (MIC test aralığı 0.5 ila 32 µg/ml) ve diğerinde seftazidim gradyanı artı sabit klavulanat (4 µg/ml) bir konsantrasyon içeren plastik ilaç emdirilmiş şeritler üretir. Bu testin ESBL üretimini değerlendirmek için duyarlılığı % 87 ile % 100 arasında değişirken, özgüllük% 95 ile% 100 arasında değişmektedir (Stürenburg *et al.* 2004).

2.2.6.3 ESBL Genlerinin Moleküler Tespiti

Ss-laktamaz genlerini erken tespit etmek için DNA probları TEM ve SHV enzimlerinin tanımlanması için tasarlanmıştır. Bir enzim ailesine ait ß-laktamazın varlığını tanımlamak için kullanılan en kolay ve en popüler moleküler yöntem, oligonükleotid primerleri ile Polimeraz zincir reaksiyonudur (PCR) (Wu *et al.* 2001). Ve ESBL Tespiti için birkaç yöntem vardır.

2.2.6.3.1 Oligotipleme Yöntemi

Bu yöntemde, katı hibridizasyon koşulları altında nokta mutasyonlarını tanımlamak için tasarlanmış oligonükleotid probları kullanılmıştır. Daha sonra, Mabilat ve Courvalin, blaTEM geni içinde altı pozisyondaki mutasyonları tespit etmek için ek oligonükleotid probları geliştirdi. Oligotyping yöntemini kullanarak, bir dizi klinik izolat içinde birkaç yeni TEM varyantı tespit edilebilir. TEM β-laktamaz tespiti için oligotipleme testlerinde kullanılan yeni problar, bir radyoizotop veya biyotin ile etiketlenmiştir (Ouellette *et al.* 1988).

2.2.6.3.2 PCR Teknikleri

Bir enzim ailesine ait bir β-laktamazın varlığını tespit etmek için kullanılan en yaygın moleküler teknikler, bir β-laktamaz genine özgü oligonükleotid primerleri ile PCR'dir. Bu primerler genellikle farklı nokta mutasyonlarının meydana geldiği anlaşılmayan bölgelere tavlanacak şekilde seçilir. PCR tekniklerinin dezavantajları, TEM veya SHV'nin farklı varyantları arasında ayrım yapamaz (Bradford 2001).

2.2.6.3.3 Nükleotid Dizileme

Test izolatları için spesifik β-laktamaz geninin saptanması için, nükleotid sekanslama uygun teknikler olmaya devam etmektedir. Ancak bu teknikler, dizideki gerçek farklılıklar yerine, geleneksel dizileme otoradyograflarını okumadaki zorlanma ve sıkıştırmalarla açıklanabilen, bazı SHV β-laktamaz geni için diziler arasında değişken sonuçlar verebilir (Bradford 2001).

3. Malzemeler ve Yöntemler

3.1 Çalışma Tasarımı (Çalışma Protokolü)

Bu çalışma, ESBL üreten *E. Coli*'nin fenotipik ve genotipik özelliklerini analiz etti:

a) AL-Anbar/Irak hastanelerine başvuran idrar yolu enfeksiyonu (İYE) hastalarından *E.coli* suşlarının izolasyonu.

b) İzole *E. coli*'nin genişletilmiş spektrumlu β-laktamaz (ESBL) antibiyotik grubuna karşı antibiyotik duyarlılık profilinin belirlenmesi ve disk difüzyon yöntemi ve VITEK tekniği ile doğrulanması.

c) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi ile (bla-CTX-M, bla-TEM ve bla-OXA) geniş spektrumlu β-laktamaz (ESBL) antibiyotik grubu genlerine karşı izoalli *E. coli*'nin antibiyotiğe dirençli profilinin belirlenmesi.

3.2 Malzemeler

3.2.1 İle Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Aparatlar

Çizelge 3.1 Ekipman ve Aparatlar

Ekipman ve Aparatlar	Firma	Ülke
Otoklav	MELAG	Almanya
Santrifüj PLC Serisi	Gemmy Industrial Corp.	Tayvan
Soğutmalı Mikro-santrifüj	Hermle	Almanya
Dondurucu	Hicool	Çin
Gaz Brülörü	Locally provided	
Jel Elektroforez Aparatı	Cleaver Scientific Ltd	Birleşik Krallık
Inkübator	MEMMERT	Almanya
Mikropipetler (farklı boyut)	Eppendorf	Almanya

Mikroskop	Genex	Hindistan
Mikrodalga	Gosonic	Çin
PCR Thermal Cycler	Bio Rad	ABD
Buzdolabı	Concord	Lübnan
Hassas Elektronik Terazi	Precisa	İsviçre
Termometre	TDR	Romanya
HOD	FISHER-HAMILTON	ABD
Vortex Karıştırıcı	STUART	İngiltere
VITEK 2 Sistem cihazı	Bio mérieux	Fransa
McF	Bio mérieux	Fransa
Su banyosu	HUMAN	Almanya
Su Damıtma	GFL	Almanya
Konik Şişeler	Almanya	Almanya
Kapak fişleri Cam	MMK	Çin
Tek Kullanımlık Petri Yemekleri	AFCO	Ürdün
Forseps	Almanya	Almanya
Cam Slaytlar	Beromed	Almanya
Vidalı Kapaklı Cam Tüp	Germany	Almanya
Kıvrım	Himedia	Hindistan
Mikro tüpler (Eppendorf) (1.5ml ve 0.2ml)	AFCO	Ürdün
Düz Borular	AFCO	Ürdün
Tipler (Farklı boyut)	AFCO	Ürdün
İdrar Örneği kabı	AFCO	Ürdün

3.2.2 Reaktifler ve Kimyasal

Çalışmada kullanılan tüm reaktifler ve kimyasallar Çizelge 3.2 'de listelenmiştir**.**

Çizelge 3.2 Reaktifler ve kimyasallar

Reaktifler ve Kimyasallar	Firma	Ülke
Mutlak etanol	HAYMAN	İngiltere
Agaroz jeli	Thomas baker	Hindistan
Nükleazsız su	Bioneer	Kore
Gliserol	GCC	İngiltere
DiamondTM (Nükleik Asit Boyama)	Promega	ABD
10X TBE arabellek	Hi–media	Hindistan
100bp DNA Merdiveni	Solis BioDyne	Tartu, Estonya
Kanlı agar tabanı	Hi–media	Hindistan
Beyin kalp infüzyon suyu	Hi–media	Hindistan
Besin suyu	Liofilchem	İtalya
Eozin metilen mavisi agar	Hi–media	Hindistan
MacConkey agar	Hi–media	Hindistan
Mueller Hinton agar	Hi–media	Hindistan

3.2.3 ESBL Disk

Çalışmada kullanılan ESBL antimikrobiyal diskler Çizelge 3.5 'de listelenmiştir

Çizelge 3.3 Antibiotikler (Diskler)

Antibiotik (Diskler)	Konsantrasyon	Sembol	Firma	Ülke
Sefotaksim	30 µg	CTX	Bioanalyse	Türkiye
Sefotaksim / klavulanik asit	40 µg	CTC		
Seftazidim	30µg	CAZ		
Seftazidim / klavulanik asit	40µg	CAC		
Sefepim	30µg	FEP		
Sefepim / klavulanik asit	40µg	FEC		

3.2.4 VITEK® 2 Sistemi

VITEK sistemi, VITEK2 GN Kit (Biomérieux/ Fransa) tarafından gram negatif bakterileri kimliklendirmek için kullanılan yakın zamanda otomatikleştirilmiş bir cihazdır.

3.2.4.1 VITEK® 2 Sisteminin Prensibi

VITEK 2, büyümeye dayalı teknolojiyi kullanan otomatik bir mikrobiyoloji sistemidir, Bu format daha çok klinik mikrobiyoloji laboratuvarına odaklanır ve daha yüksek hacimli laboratuvarlar için daha yüksek otomasyon seviyeleri ve kapasite sağlar. Ayrıca antimikrobiyal duyarlılık testi için otomatik pipetleme ve seyreltme seçeneği de sunmaktadır (Bradford 2001).

Reaktif kartlarının her biri ayrı bir test substratı içerebilen (64 çukurcuk) vardır. Substratlar, inhibe edici maddelerin varlığında asitleştirme, alkalileştirme, enzim hidrolizi ve büyüme gibi çeşitli metabolik aktiviteleri ölçer. Kartın her iki tarafında bulunan optik olarak şeffaf bir film, organizma-substrat katkıları ile teması önleyen sızdırmaz bir kap korurken uygun düzeyde oksijen geçişine izin verir. Her kartta aşılama için kullanılan önceden yerleştirilmiş bir transfer tüpü vardır. Kartlarda ürün türü, lot numarası, son kullanma tarihi ve kartın sisteme yüklenmesinden önce veya sonra numuneye bağlanabilen benzersiz bir tanımlayıcı hakkında bilgi içeren barkodlar bulunur.

3.2.4.2 Süspansiyon Hazırlığı

Saf kültürden yeterli sayıda koloniyi aktarmak ve mikroorganizmayı 12 x 75 mm şeffaf plastik (polistiren) test tüpünde 3,0 mL steril alındı içinde (sulu % 0.45 ila % 0.50 NaCl, pH 4.5 ila 7.0) süspanse etmek için steril bir çubuk kullanılır. Bulanıklık buna göre ayarlanır ve DensiChek^{TM} adı verilen bir bulanıklık ölçer kullanılarak ölçülür. McFarland Bulanıklık Aralığı (0.48-0.56) ile belirlenen bulanıklıkların askıya alındıması.

3.2.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Malzemeleri

3.2.5.1 DNA ekstraksiyonu için Presto ™ Mini gDNA Bakteri Kiti

Presto TM Mini gDNA Bakteri Kitinin (Geneaid Biotech Ltd / Tayvan) içeriği Çizelge 3.4 'de listelenmiştir.

Çizelge 3.4 DNA ekstraksiyonu için Presto ™ Mini gDNA Bakteri Kiti

Bileşen	GBB004	GBB100	GBB101	GBB300	GBB301
Gram+ Buffer	2 ml	30 ml	30 ml	75 ml	75 ml
GT Buffer	1.5 ml	30 ml	30 ml	75 ml	75 ml
GB Buffer	2 ml	40 ml	40 ml	75 ml	75 ml
W1 Buffer	2 ml	45 ml	45 ml	130 ml	130 ml
Wash Buffer[1] (Etanol ekleyin)	1 ml (4 ml)	25 ml (100 ml)	25 ml (100 ml)	50 ml (200 ml)	50 ml (200 ml)
Lizozim[2]	8 mg	110 mg	N/A	250 mg	N/A
Proteinaz K[3] (ddH_2O ekleyin)	1 mg (0.1 ml)	11 mg x 2 (1.1 ml)	11 mg x 2 (1.1 ml)	65 mg (6.5 ml)	65 mg (6.5 ml)
Elüsyon Buffer	1 ml	30 ml	30 ml	75 ml	75 ml
GD Sütunlar	4	100	100	300	300
2 ml Toplama Tüpleri	8	200	200	600	600

Yıkanmış buffer'a mutlak etanol ilave edildikten sonra birkaç saniye çalkalanarak karıştırıldı. Şişedeki kutuyu kontrol edildi. Etanol buharlaşmasını önlemek için her kullanımdan sonra şişeyi sıkıca kapattığınızdan emin olun. Lizozim, uzun süreler boyunca -20ºC'de saklandı. ddH2O, Proteinaz K'ya eklenmiştir ve ardından, Proteinaz K'nin tamamen çözüldüğünden emin olmak için vortekslenmiştir. Şişedeki kutuyu kontrol edildi. Tamamen çözüldüğünde karışımı aşağı doğru döndürmek için birkaç saniye santrifüjleyin. Uzun süreler boyunca, ddH2O ve Proteinase K karışımı 4ºC'de

saklanmalıdır. Ortamdaki CO_2 hızla asitleşmeye neden olabileceğinden yalnızca taze ddH_2O kullanın.

3.2.5.2 Primerler

Entegre DNA (Sentebiolab Biyoteknoloji Şirketi / Türkiye tarafından sağlanan oligonükleotid primerler) ESBL gen primerleri kullanılarak yapılan PCR, suşları tanımlamak için kullanılmıştır. Sekanslara sahip üç primer Çizelge 3.5 'da listelenmiştir.

Çizelge 3.5 Primer sıralama listesi

Genler	**Primer Sıralaması (5' to 3')**	**Ürün Boyutu bp**	**KAYNIKLER**
TEM F TEM R	TCCTTGAGAGTTTTCGCCCC TGACTCCCCGTCGTGTAGAT	610bp	Design with this study
CTX-M F CTX-M R	AAGCACGTCAATGGGACGAT GTTGGTGGTGCCATAGCCA	450bp	Design with this study
OXA F OXA R	TTGCACTTGATAGTGGTGTGA AGTGAGTTGTCAAGCCAAAAAGT	no band	Design with this study

3.2.5.3 PCR Yeşil Ana Karışım

Bu çalışmada kullanılan Ana Karışım Çizelge 3.6 'de tanımlanmıştır

Çizelge 3.6 Master Mix'in Tanımı

Materyal	**Açıklama**	**Firma**	**Ülke**
PCR Yeşil Ana Karışım	Bir reaksiyon tamponu (pH 8.5), 400µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP ve 3mM MgCl2 içinde sağlanan 2X *Taq* DNA polimeraz	Promega	ABD

3.3 Yöntemler

3.3.1 Sterilizasyon Yöntemleri

Ortam, tamponlar ve çözeltiler otoklav ile (121° C) ve basınçta (15 psi) 15 dakika süreyle sterilize edildi (Collee *et al.* 1996).

3.3.2 Agar ve Kültür Ortamının Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan çok sayıda agar ve kültür besiyeri türü.

3.3.2.1 BHI Broth (Brain Heart Infusion Broth)

1000 ml distile suda 37.0 gram süspanse edildi. Şişelere veya tüplere koyun ve (15 psi) basınçta (121 ° C) 15 dakika otoklavlayarak sterilize edildi (Sahm *et al.* 2002).

3.3.2.2 MacConkey Agar

1000 ml saflaştırılmış / damıtılmış su içinde (51.53) gram susuz ortamı süspanse edildi. Ortamı tamamen çözmek için kaynatıldı. 15 psi basınçta (121° C) 15 dakika süreyle otoklavlayarak sterilize edildi (45-50° C)'ye kadar soğutuldu. Steril Petri plakalarına dökmeden önce iyice karıştırıldı (Sahm *et al.* 2002).

3.3.2.3 Mueller Hinton Agar

1000 ml saflaştırılmış / damıtılmış suda (38.0) gram süspanse edildi. Ortamı tamamen çözmek için kaynatıldı. 15 psi basınçta (121° C) 15 dakika otoklavlayarak sterilize edin. 45-50 ° C'ye oğutuldu. İyice karıştırın ve steril Petri plakalarına dökün (Sahm *et al.* 2002).

3.3.2.4 Besin Suyu

1 L damıtılmış suda (13.0) gram askıya alındı. Tüplere dağıtın ve (15 psi) basınçta (121° C) 15 dakika otoklavlayarak sterilize edildi (Sahm *et al.* 2002).

3.3.2.5 Eozin Metilen Mavisi Agar

1000 ml saflaştırılmış / damıtılmış suda (40.0) gram süspanse edin. Ortamı tamamen çözmek için kaynatın. (15 psi) basınçta (121° C) 15 dakika otoklavlayarak sterilize edin. 45-50 ° C'ye soğutuldu. İyice karıştırın ve steril Petri plakalarına döküldü (Sahm *et al.* 2002).

3.3.3 Bakım Ortamı (İzolatların Saklanması)

Bu besiyeri, % 20 gliserol içeren bir bazal besiyeri olarak beyin kalp infüzyon suyundan oluşmaktadır. Bu besiyeri, bakteri izolatlarını uzun süre saklamak için -20ºC'de derin dondurucuda korumak için kullanılmıştır (Thomas 2008).

3.3.4 Jel Elektroforez Bufferları

3.3.4.1 Tris Borat EDTA Tamponu (TBE 10X)

Bu buffer 108 g Tris bazı, 55 g borik asit, 40ml 0.5M EDTA, 800ml DW içinde çözülerek hazırlandı, pH 7.8'e ayarlandı ve hacim 1000ml otoklavlanana kadar tamamlandı ve 4° C'de, elektroforezde kullanılana kadar, saklandı.

3.3.4.2 Tris Borate EDTA Buffer (TBE 1X)

Bu çözelti, 100 ml stok TBE 10X karıştırılarak hazırlandı ve hacim DW ile 1000 ml'ye tamamlandı ve elektroforezde kullanılana kadar 4° C'de saklandı (Russell and Sambrook 2001).

3.3.5 Numune Koleksiyonu

15/7/2020 - 1/11/2020 tarihleri arasında AL Ramadi Eğitim Hastanesi ve Haditha Hastanesine yatırılan hastalardan alınan toplam 65 klinik örnek idrar toplanmıştır. Hastalardan hastaneye kabulde idrar örnekleri steril bir kapta. Bir döngü dolusu santrifüjlenmemiş idrar numunesi, MacConkey agar üzerinde kültürlendi.

3.3.6 *E. coli'nin* İzolasyonu ve Tanımlanması

Benson'un Mikrobiyolojik Uygulamaları tarafından önerilen teşhis prosedürlerine göre, 30 yılı aşkın süredir mikrobiyoloji laboratuvar kılavuzlarının altın standardı olmuştur (Alfred and Heidi 2015), çalışılan hastalarla ilişkili *E. coli* izolasyonu ve tanımlanması yapıldı. Örnekler aseptik koşullar altında toplanmış ve 37ºC'de 24 saat inkübe edilmiş MacConkey agar üzerinde sürme yöntemi ile eklenmiştir.

3.3.6.1 Koloni Morfolojisi

Toplanan tüm örnekler MacConkey agar üzerinde inoküle edildi. MacConkey agar üzerinde pembe colure, laktoz fermente eden koloniler veren koloni, birincil olarak *E.coli* olarak seçildi ve ayrıca VITEK sistemi tarafından onaylandı (Jawetz 2004).

3.3.6.2 Biyokimyasal Test

3.3.6.2.1 Indol testi

Bu test, bakteri kolonilerinin pepton suyu içeren test tüpüne aktarılmasıyla gerçekleştirilir, Ardından 24 saat inkübe edildi. 37° c sıcaklıkta kovac reaktifinden 2-1 damla eklenir. Ortada kırmızı bir halkanın görülmesi, testin olumlu sonucunun bir işaretidir (Forbes *et al.* 2007).

3.3.6.2.2 Metil Kırmızısı Testi

Bu test, bakteri kolonilerinin Metil kırmızısı (MR-VP) içeren test tüpüne aktarılmasıyla gerçekleştirilir, Sonra 37° C'de 24 saat inkübe edildi. Sonra her bir tüpe 4-5 damla metil red reent ekleyin, ortam renginin kırmızıya dönüşmesi pozitif testin bir işaretidir (Hemraj *et al.* 2013).

3.3.6.2.3 Voges- Proskauer Testi

Metil kırmızısı - Voges- Proskauer (MR-VP) içeren tüpler bakteri kolonileri ile inoküle edildi, Sonra 24 saat 37° C'de inkübe edildi, her tüpe 10 damla alfa - naftol ekleyin, ardından 5 damla KOH, ardından tüpleri ekleyin İyice çalkalandıktan sonra 30 dakika sonra sonucu kırmızı renkle pozitif olarak kaydetti (Alfred and Heidi 2015).

3.3.6.2.4 Citrate Testi

MacConkey agar üzerinde kültürlenen ve gece boyunca 37° C'de inkübe edilen bakteri kolonileriyle Simmons sitrat agarını inoküle edildi. Organizmanın sitrat kullanma yeteneği varsa, besiyeri rengini yeşilden maviye dönmektedir (Alfred and Heidi 2015).

3.3.6.3 VITEK 2 Sistemi

3.3.6.3.1 Prosedür

Tüm adımlar, üreticinin talimatlarına göre yapıldı (Biomerieux, France).

1. Yeterli sayıda saf kültür kolonisi, steril pamuklu çubuk veya aplikatör çubuğu kullanılarak aktarıldı ve mikroorganizma, 12 x 75 mm'de 3.0 mL steril alındı (sulu % 0.45 ila % 0.50 NaCl, pH 4.5 ila 7,0) şeffaf plastik (polistiren) test tüpü içinde süspanse edildi.
2. Turbidete, McFarland Bulanıklık Aralığı (0.48 – 0.56) ile uygun şekilde ayarlandı ve DensiChek™ adı verilen bir turbidite ölçer kullanılarak ölçüldü.
3. Tanımlama kartları, entegre bir vakum aparatı kullanılarak mikroorganizma süspansiyonları ile aşılanmıştır. Mikroorganizma süspansiyonunu içeren bir test tüpü özel bir rafa (kaset) yerleştirildi ve kimlik kartı, transfer tüpü ilgili süspansiyon tüpüne takılırken komşu yuvaya yerleştirildi.
4. Uygulanan vakum uygulandı ve istasyona yeniden hava verildikten sonra organizma süspansiyonu, transfer tüpünden tüm test kuyularını dolduran mikro kanallara zorlandı.
5. Aşılanan kartlar, karusel inkübatörüne yüklenmeden önce transfer tüpünü kesen ve kartı kapatan bir mekanizma geçirildi. Atlıkarınca inkübatörü 30 karta kadar alabilir. Tüm kart türleri çevrimiçi olarak 35.5 + 1.0ºC'de inkübe edildi. Her kart 15 dakikada bir karusel inkübatöründen çıkarıldı, reaksiyon okumaları için optik sisteme taşındı ve ardından bir sonraki okuma zamanına kadar inkübatöre geri gönderildi. Veriler, tüm inkübasyon süresi boyunca 15 dakikalık aralıklarla toplandı.
6. Sonraki adımların tümü cihazlar tarafından gerçekleştirildi, cihaz inkübasyon sıcaklığını, kartların optik okumasını kontrol eder ve analiz için test verilerini sürekli olarak izler ve bilgisayara aktarıldı. Test döngüsü tamamlandığında, sistem kartları otomatik olarak bir atık konteynerine atıldı.

3.3.7 İzole *E. coli*'nin ESBL Direncinin Fenotip Tanımlaması

E. coli izolatları aşağıdaki yöntemlerle antibiyotiklere karşı yapılmıştır.

3.3.7.1 Kombinasyon Disk Testi (CDT)

Tek başına sefalosporin (sefotaksim, seftazidim, sefepim) ve klavulanik asit ile kombinasyon halinde içeren her test diskleri için uygulanır. Klavulanik asit ile kombine sefalosporin diski etrafındaki inhibisyon bölgesi, tek başına sefalosporin ile disk etrafındaki bölge ile karşılaştırıldı. Tüm *E.coli* izolatları kinolon direnci için ilk tarama olarak (CDT) kullanılarak test edildi. Bu test, Çizelge 3.3 'de gösterilen antibiyotik disklerine karşı yapılmıştır. ESBL diski. *E. coli'nin* saf büyümesinden bakteri süspansiyonları hazırlandı. Süspansiyonun yoğunluğu (0.5) McFarland standartlarına göre ayarlandı. Muller-Hinton agar besiyeri, süspansiyonlara batırılmış steril çubukla aşılanmıştır. Eküvyon, besiyerinin tüm yüzeyine birkaç kez sürme yöntemi ile eklenmiştir. İnhibisyon bölgelerinin uygun şekilde ölçülmesine izin vermek için ayrı diskler arasında yeterli boşluk sağlanarak her plakaya steril forseps ile antibiyotik diskler uygulandı. Kültürler, aerobik koşullar altında (18 saat) boyunca (35 ± 2° C'de) inkübe edildi. Her inhibisyon bölgesinin çapı bir çift kumpas ile ölçülmüş ve milimetre cinsinden kaydedilmiştir. Sonuçlar Clinical Laboratories Standards Institute'a göre yorumlandı (CLSI) (Institute 2017).

3.3.8 *E. coli*'nin ESBL Direncinin Genotipleme Tanımlaması

ESBL direncinin genotipleme tanımlaması için aşağıdaki prosedür takip edildi.

3.3.8.1 Genomik DNA Ekstraksiyonu ve Saflaştırma Yöntemi

Genomik DNA Ekstraksiyonu, VITEK-2 ve kombinasyon testi ile teyit edilen *E. coli* izolatı için Presto TM Mini gDNA Bakteri Kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Prosedür, kullanım kılavuzunda ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Protokolün ana adımları şunlardır.

3.3.8.1.1 Numune Hazırlama

i. Bakteriyel hücreler (1 x 109'a kadar) gece boyunca kültürden (besleyici su) 1.5 ml'lik bir mikro santrifüj tüpüne aktarıldı..
ii. 14.000 x g'de 1 dakika santrifüjleyin, ardından süpernatan atıldı.
iii. 180 µl GT Tamponu eklendi, ardından hücre pelletini vorteksle yeniden süspanse edildi.
iv. 20 ul Proteinaz K eklendi (ddH2O eklendiğinden emin oluruz).
v. (60ºC'de) en az 10 dakika inkübe edildi.
vi. İnkübasyon sırasında tüpü her 3 dakikada bir tersine çevirdik.

3.3.8.1.2 Liziz

i. Numuneye 200 ul GB Tamponu eklenmiş ve 10 saniye boyunca vorteks ile karıştırılmıştır..
ii. Örnek lizatının temizlendiğinden emin olmak için 70ºC'de en az (10-15) dakika inkübe edilir.
iii. İnkübasyon sırasında, tüp her 3 dakikada bir ters çevrildi.
iv. Gerekli Elüsyon Tamponunu (numune başına 200 µl) 70ºC'ye (adım 5 DNA Elüsyonu için) önceden ısıtıldı.

3.3.8.1.3 DNA Bağlanması

i. Numune lizatına 200 ul mutlak etanol ilave edildi ve kuvvetlice çalkalanarak hemen karıştırıldı.
ii. 2 ml'lik Toplama Tüpüne bir GD Kolonu yerleştirildi.
iii. GD Column'a aktarılan karışım (çözünmeyen çökelti dahil) daha sonra 14.000 x g'de 2 dakika santrifüjlendi.
iv. Akışı içeren 2 ml Toplama Tüpü atıldı, ardından GD Kolonunu yeni bir 2 ml Toplama Tüpüne yerleştirin.

3.3.8.1.4 Yıkama

i. GD Sütununa 400 ul W1 Buffer eklendi.
ii. Sonra (14.000 x g'de 30 saniye) santrifüjleyin ve ardından akışı atılde.
iii. GD Kolonu (2 ml) toplama Tüpüne geri yerleştirildi.
iv. Daha sonra GD Kolonuna (600 µl) Yıkama Tamponu eklendi.
v. 2 ml toplama tüpüne geri yerleştirilen GD kolonu (14.000 x g'de 30 saniye) santrifüjle.
vi. Ve Kolon matrisini kurutmak için (14,000 x g) de 3 dakika boyunca tekrar santrifüjlendi.

3.3.8.1.5 Elüsyon

i. Kurutulmuş GD Kolonu, temizlenmiş (1.5 ml) bir mikro santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
ii. 100 µl önceden ısıtılmış Elüsyon Tamponu1 eklendi, TE Tamponu sütun matrisinin merkezine yerleştirildi.
iii. Elüsyon Tamponunun tamamen emilmesine izin vermek için en az (3 dakika) bekletildi. Ardından saflaştırılmış DNA'yı elüe etmek için (30 saniye boyunca 14.000 x g) santrifüjleyin.

3.3.8.2 DNA Ürünlerinin Agaroz Jel ile Analizi

Her bir E.coli (CTX, TEM ve OXA) gen fragmanının amplikonu jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. Agaroz jel % 1.0 konsantrasyonda hazırlanmış ve etidyum bromür ile boyanmıştır. Daha sonra her amplikondan 8 ul seçilen kuyucuğa yüklendi. Doğru *E. coli* amplikon boyutunu tespit etmek için jelin ilk kuyucuğuna bir DNA markörü yüklendi. PCR ürünleri 81 voltta 45 dakika elektroforeze tabi tutuldu ve jel UV aydınlatıcı altında görselleştirildi.

3.3.8.3 ESBL direnç geninin amplifikasyonu

ESBL direnç geninin tespiti için 3 tip gen pozisyonu seçildi, TEM, CTX ve OXA blastı ve yukarıdaki prosedür takip edildi.

3.3.8.3.1 Primerlerin Hazırlanması

Üreticinin talimatlarına bağlı olarak oligonükleotid primerleri hazırlandı.
Öncelikle primer tüpler santrifüjlendi, liyofilize ürün steril serbest nükleaz su ile çözülerek, vortekslenerek ve kısaca aşağı döndürülerek her bir primer için stok primer solüsyonu (100µM) hazırlandı ve daha sonra -20ºC'de saklandı.

İkinci olarak, 10µl stok primer solüsyonu ve 90µl serbest nükleaz suyu karıştırılarak her bir primer için çalışma primer solüsyonu (10µM) hazırlandı, iyice karıştırıldı ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyon için kullanılana kadar -20ºC'de saklandı.

3.3.8.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Amplifikasyonu

3.3.8.3.2.1 PCR Karışımı Hazırlama

PCR reaksiyon karışımı, 12,5 µl yeşil ana karışım (bakteriyel olarak türetilmiş Taq DNA polimeraz, dNTP'ler, MgCl2 ve DNA şablonlarının PCR ile verimli amplifikasyonu için optimum konsantrasyonda reaksiyon tamponu içerir), 7.5 µl Serbest nükleaz su, her biri 1 µl ileri ve ters primerler, 3 µl şablon DNA. PCR tüpleri, gen için spesifik programa göre amplifikasyon reaksiyonunu başlatmak için termal döngüleyiciye aktarıldı (Prabhu *et al.* 2010). Her gen için PCR reaksiyon karışımı (25 ul), Çizelge 3.7 'de açıklanan karışımdan oluşmuştur.

Çizelge 3.7 PCR reaksiyon karışımı

Malzeme	**Miktar**
Ana miks	12.5 µl
Nükleazsız water	7.5 µl
Primer ileri	1µl
Primer ters	l µl
DNA şablonları	3µl
Toplam	25µl

3.3.8.3.2.2 PCR Termal Döngüleyici Programları

3.3.8.3.2.2.1 (TME) gen tespiti için PCR amplifikasyon programı (Prabhu *et al.* 2010)

Çizelge 3.8 (TME) geni için program

Evre		**Adımlar**	**Sıcaklık (ºC)**	**Zaman (dk)**	**Döngü sayısı**
İlk		İlk Denatürasyon	95ºC	3 dk	1
İkinci	I	Denatürasyon	95 ºC	1 dk	35
	II	Tavlama	54 ºC	1 dk	
	III	Uzantı	72 ºC	5 dk	
Üçüncü		Son Uzantı	72 ºC	10 dk	1

3.3.8.3.2.2.2 (CTX-M) gen tespiti için PCR amplifikasyon programı (Prabhu *et al.* 2010)

Çizelge 3.9 (CTX-M) geni için program

Evre		**Adımlar**	**Sıcaklık (ºC)**	**Zaman (dk)**	**Döngü sayısı**
İlk		İlk Denatürasyon	95 ºC	3 dk	1
İkinci	I	Denatürasyon	95 ºC	1 dk	35
	II	Tavlama	54 ºC	1 dk	
	III	Uzantı	72 ºC	5 dk	
Üçüncü		Son Uzantı	72 ºC	10 dk	1

3.3.8.3.2.2.3 (OXA) gen tespiti için PCR amplifikasyon programı (Prabhu *et al.* 2010)

Çizelge 3.10 (OXA) Geni Için Program

Evre		**Adımlar**	**Sıcaklık (ºC)**	**Zaman (dk)**	**Döngü sayısı**
İlk		İlk Denatürasyon	95 ºC	3 dk	1
İkinci	I	Denatürasyon	95 ºC	1 dk	35
	II	Tavlama	52 ºC	1 dk	
	III	Uzantı	72 ºC	5 dk	
Üçüncü		Son Uzantı	72 ºC	10 dk	1

3.3.8.3.2.3 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel ile Analizi

% 1 agaroz konsantrasyonu, DNA saflaştırılmasından sonra ve PCR tespitinden sonra elektroforezde kullanıldı. Bu agaroz jel, 0.4 g agaroz tozunun, hazırlanan 40 ml TBE tamponu (1X) (pH 8) içinde çözülmesi ile hazırlanmıştır. Karışım mikrodalgaya kondu, kaynayana ve berraklaşana kadar bırakıldı, 58˚C'ye soğumaya bırakıldı ve Diamond^{TM} (Nükleik Asit Staining) eklendi. Jel tepsisinin uçları bordürlerle kapatılmıştır. Tarak, DNA örneklerini yüklemek için kullanılan kuyucukların yapılması için tepsinin bir ucuna sabitlendi. Agaroz yavaşça tepsiye döküldü ve oda sıcaklığında 30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Ardından, tarak ve kenarlıklar tepsiden nazikçe çıkarıldı. Agaroz jel, jel yüzeyini kaplayan bir seviyede TBE tamponu (1X) ile doldurulmuş elektroforez odasında sabitlendi.

3.3.8.3.2.4 Agaroz Jelde DNA Şablonunun Yüklenmesi ve Çalıştırılması

Agaroz jel elektroforezi, tarafından tarif edildiği gibi yapıldı. PCR ürünleri aşağıdaki gibi% 1 agaroz jeli üzerinde yürütüldü:

1. Agaroz jeli, 1 g agaroz tozunun 100 ml TBE tamponunda çözülmesi ve eritilmesi ile hazırlanmıştır, çözelti, tüm kristaller agaroz içinde çözülene kadar 2 dakika boyunca mikrodalgada ısıtıldı.
2. Karışım 58^{o}C'ye soğumaya bırakılmış, 2 ul RedSafeTM karıştırılarak eklenmiştir.
3. Bundan sonra, peteğe Jel içine vuruldu ve yaklaşık (30 dakika) katılaşmaya ek olarak soğumaya bırakıldı, Daha sonra, jel çöktükten sonra tam olarak tarak çıkarıldı ve tank daha sonra, akan tampon içeren elektroforez sistemine yerleştirildi. 1 x TBE. Jeli yaklaşık 1-2 mm örtmek için tampon döküdü.
4. 10 µl'lik PCR ürünü her kuyucuğa pipetlendi ve PCR ürünlerinin boyutunu tahmin etmek için moleküler işaretleyici olarak kullanmak üzere ilk oyuğa 5 µl (100 bp merdiven) eklendi.
5. Elektrik akımı 1 saat süreyle 100 Volt ve 70 amp olarak ayarlandı.

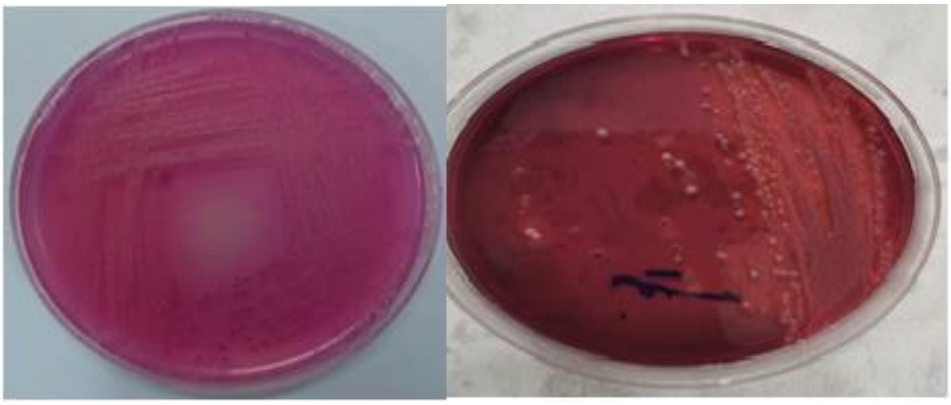
4 Sonuç ve Tartışma

Genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz klinik olarak önemlidir, çünkü birçok şiddetli enfeksiyon hastasına birinci basamak ajanlar olarak verilen sefalosporin antibiyotiklerini yok ederler. ESBL üreticilerinin sefalosporinlerle neden olduğu ciddi enfeksiyonların gecikmiş tanınması ve uygun olmayan tedavisi, artan mortalite ile ilişkilendirilmiştir (Wani *et al.* 2009). Geçtiğimiz on yıl içinde, gram-negatif basiller, özellikle *E. coli* üreten ESBL'ler, dünya çapında hem hastanelerde hem de toplumdan edinilen enfeksiyonlarda ciddi patojenler olarak ortaya çıkmıştır. Son çalışmalar, septisemi gibi ESBL üreten organizmalarla enfeksiyonu olan hastaların, ESBL olmayan izolatlara göre anlamlı olarak daha yüksek ölüm oranına sahip olduğunu ortaya koymuştur (Mehrgan and Rahbar, 2008). Bu çalışmada, klinik olarak *E. coli* izolatlarının incelenen ESBL fenotipleri ve genotipleri. Bu çalışma, ESBL üretme yeteneği ile üropatojenik *E. coli*'nin antibiyotik direnci ve moleküler özellikleri hakkında bilgi sağlamıştır. Dönem için Irak / Al-anbar vilayetindeki Ramadi Eğitim Hastanesi ve Haditha Genel Hastanesine başvuran ağır idrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan seksen idrar örneği toplandı (15/7/2020 - 1/11/2020).

4.1 *E. coli* İzolatlarının Tanımlanması

4.1.1 Klasik Tanımlama Testi

Birincil, idrar örneklerinden *E. coli*'nin tanımlanması için, pembe koloni laktoz fermentör bakteri olarak yetiştirilen MacConkey agar üzerinde kültürlenmiş gibi klasik tanımlama testi, keskin kenarlı dışbükey, dairesel, pürüzsüz, kırmızı / pembe koloniler oluştururken, *E. coli,* Eosin Metilen Mavisi (EMB) üzerinde parlak yeşildi. Sırasıyla (IMVIC, +, +, -, -) sonuçları veren *E. coli*'nin tanımlanması için IMVIC testi gibi biyokimyasal testler de bağımlıydı. Bu kriterlere bağlı olarak, bu çalışma *E. coli* izolatlarından (28/65) toplanabilir (Çizelge 4.1). Bu tutarlıdır ve *E. coli* özelliklerinin tanımlanmasıyla uyumludur (Jawetz *et al.* 2016).



Şekil 4.1 a, MacConkey agar plakasında *E. coli.,* b, (EMB) ortamında *E.coli*

4.1.2 VITEK® 2 SYSTEM ile Onaylayıcı Tanımlama

E. coli'nin VITEK® 2 System ile tanımlanması, % 87 ila% 99 arasında düzenlenmiş yüksek doğruluk sağlar, bu nedenle (37/65), ek (1) 'de düzenlendiği gibi bu sistemle tanımlayabilir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 *E.coli*'nin klasik testle tanımlanma sıklığı ve yüzdesi

No	Testin adı	N(65)	%
1	Koloni morfolojisi	28	43.08
2	VITEK® 2 SİSTEMİ	37	56.92
Toplam		65	100

4.2 Cinsiyet dağılımı *E. coli*

Bu çalışma göstermiştir ki *E.coli*'ye bağlı (U.T.I) kadın grubunda 42'den (% 64.6) 23'e (% 35.4) fazla bulunmuştur. İstatistiksel olarak bu farklılıklar anlamlı değildi (p-değeri 0.25) Çizelge ve Şekil (4.2). Bu çalışmanın sonucu, Bağdat kentinde (Al Mefregi BKA 2016) tarafından belgelenen ve *E. coli*'nin kadınlarda (% 81.8) İYE'ye (% 18.2) neden olduğunu kaydeden araştırmayla hemfikirdir. Ayrıca bu çalışma, *E. coli* izolasyon yüzdesinin erkeklere (% 10) kıyasla kadınlarda (% 90) yüksek olduğunu fark eden (Sabri ve Kareem 2020) tarafından belgelenen çalışma ile uyumlu hale getirilmiştir. *E. coli*'nin kadınlarda erkeklere göre neden olduğu bu daha yüksek İYE sıklığı, kadın üretra kısalığı

ve üretral meatusun perianal bölgesinin vajina ve anüse yakınlığı ve vajinal mikrofloradaki değişimler gibi çeşitli nedenlerden kaynaklanmaktadır. İYE'ye yol açabilecek koliformlarla vajinal kolonizasyonu teşvik etmede kritik bir rol oynar (Omigie *et al.* 2009). Bu sonuç aynı zamanda (Lo *et al.* 2013, Odongo *et al.* 2020), kadınlarda (% 11.5) erkeklere (% 8.3), (% 78.932'ye karşı % 21.07) tarafından belgelenen makalelerle de uyumluydu. Karşı tarafla, Tawfiq (2004) ile yapılan bu çalışma, bakteri yetiştiriciliğinin erkeklerde (% 54.5) ve kadınlarda (% 45.5) olumlu sonuçlar verdiğini gösterdi (Tawfiq 2004). Kadınlarda İYE, aşağıdaki gibi çeşitli risk faktörlerinden etkilenmiştir; medeni durum, çocuk sayısı, ameliyat öyküsü ve doğum yöntemleri ve diğer faktörler (Alsamarai and Ali 2016).

4.3 Yaş dağılımı *E. coli*

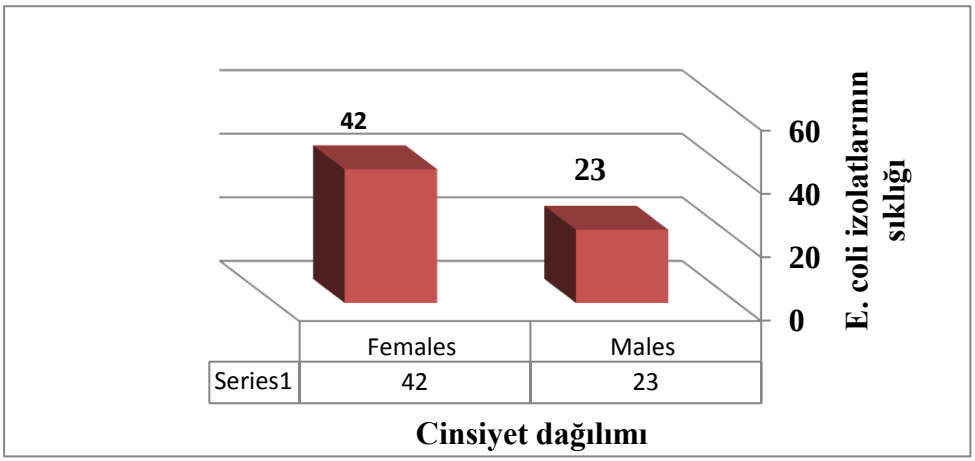
Bu çalışma, kadın grubunda *E.coli*'ye bağlı (İYE) vakalarının en çok (11-30) yaş grubu (% 50) toplam çalışma vakalarından 21 (% 50) altında olduğunu göstermiştir. Erkek grubu, 23 vakanın toplam çalışma vakasından 9 yaşının (% 39.1) altında (31-50) yaş grubunda (% 39.1) Ecoli ile enfekte olmuştur. İstatistiksel olarak bu farklılıklar, tablo (4.2) 'de gösterildiği gibi kayda değer değildi (0.17). Sonuçlarımız, *E. coli*'nin neden olduğu İYE ile yaşla (> 35 yaş) bildiren (% 30.51) çalışmalarla uyumluydu (by Mustafa M. Shaker 2016). Etiyopya'da *E. coli*'nin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonu (% 20.6) ile yaş (36 - 45) olduğunu bildiren başka bir çalışma (Gizachew *et al.* 2019). Bu sonuç aynı zamanda Nijerya'da *E. coli*'nin neden olduğu İYE ile yaşla (> 45) yıl bildiren (% 22.4) çalışma ile de uyumluydu (Motayo *et al.* 2012). Elde ettiğimiz sonuç, 51-70 yaş altı erkeklerde *E. coli* izolasyonunun daha az olduğunu gösterdi; bu, *E. coli* izolasyon oranlarının ≥ 60 yaşındaki erkeklerde (% 52.2) daha düşük olduğunu belgeleyen (Gebremariam *et al.* 2019) tarafından belgelenen makalelerle uyumluydu.

Çizelge 4.2 Çalışılan grubun tanımlayıcı istatistiği

Yaş grubu		Cinsiyet		Toplam	P-değeri
		Erkek	Kadın		
(11-30) yaş	N	5	21	26	*0.173 (N.S)
	%	21.7	50.0%	40.0%	
(31-50) yaş	N	9	11	20	
	%	39.1%	26.2%	30.8%	
(51-70) yaş	N	7	8	15	

	%	30.4%	19.0%	23.1%	
> 70	N	2	2	4	
	%	8.7%	4.8%	6.2%	
Toplam	N	23	42	65	
	%	100.0%	100.0%	100.0%	
Cinsiyet	N	23	42	65	**0.25
	%	35.4%	64.6%	100%	
Yaş (Yıl)	M+SD	44.9±16.2	36.4±17.3	T-test (1.97)	*** (0.54) N.S

* Chi-sequare, N.S; önemli olmayan; t testi, ** Binom testi

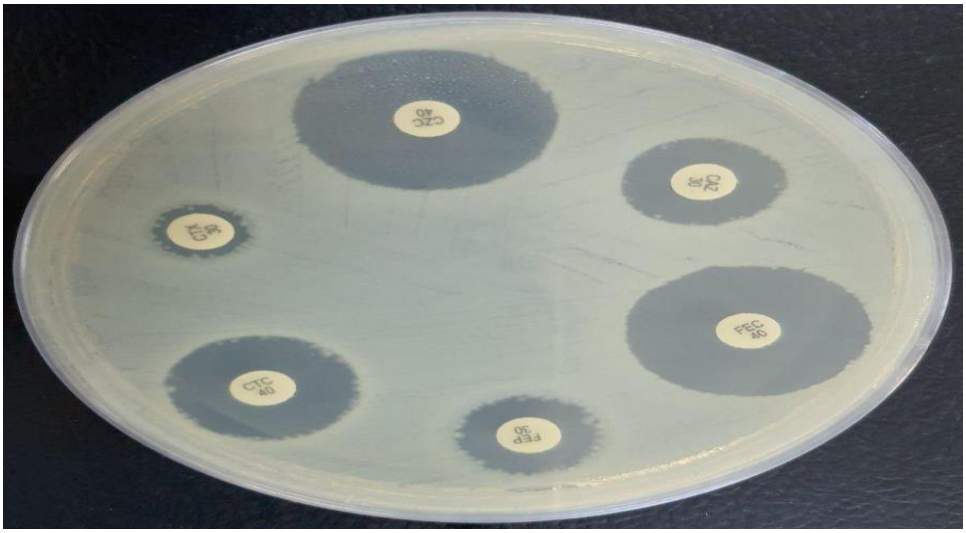


Şekil 4.2 *Escherichia coli*'nin cinsiyete göre dağılımı

4.4 Fenotipleme Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

4.4.1 Birleşik Diskler Testi (CDT) İle Belirleme

Fenotipik olarak (65) *E. coli* izolatları, CLSI'nin önerdiği gibi seftazidim, seftazidim / klavulanat, sefotaksim, sefotaksim / klavulanat ve sefepim, sefepim / klavulanat antibiyotikleri ile kombinasyon disk testi (CDT) kullanılarak üretilen ESBL'ler için test edilmiştir (Wayne PA. 2010). Bu çalışmanın sonucu, 52 (% 80) kodlu E.coli izolatının ESBL pozitif olduğunu ortaya çıkardı, bu da klavulanik asit ile inhibisyon zonu çapının skorunun, klavulanik asit olmadan 5 mm daha fazla artmasıyla gösterilirken, sadece 13 (% 20) *E.coli* izolatının *E. coli* izolatları ESBL negatifti; bu, Çizelge ve Şekil (4.3) 'te gösterildiği gibi klavulanik asit ile inhibisyon alanı skorunun <5 mm azalması ile gösterilmiştir..



Şekil 4.3 Mueller-Hinton agar üzerinde *E.coli*-1'in kombinasyon diskleri testi

Çizelge 4.3 İzole *E.coli*'nin disk birleştirme testi ile antibiyotik duyarlılığı (DCT)

N0	**Kod**	**CTX 30**	**CTC 40**	**FEP 30**	**FEC 40**	**CAZ 30**	**CZC 40**	*** Yorumlama**
1	*E. coli*-1	9	18	13	23	15	24	Pozitif
2	*E. coli*-2	8	18	14	24	15	24	Pozitif
3	*E. coli*-3	13	19	20	25	21	27	Pozitif
4	*E. coli*-4	22	24	30	32	28	31	Negatif
5	*E. coli*-5	0	11	9	18	8	22	Pozitif
6	*E. coli*-6	17	19	24	27	26	28	Negatif
7	*E. coli*-7	6	15	12	22	13	24	Pozitif
8	*E. coli*-8	8	18	14	24	15	26	Pozitif
9	*E. coli*-9	7	17	12	23	13	25	Pozitif
10	*E. coli*-10	0	15	14	25	14	29	Pozitif
11	*E. coli*-11	0	0	0	8	0	0	Negatif
12	*E. coli*-12	7	16	15	24	12	25	Pozitif
13	*E. coli*-13	10	20	12	26	20	27	Pozitif
14	*E. coli*-14	0	9	0	18	0	19	Pozitif
15	*E .coli*-15	9	16	15	23	15	24	Pozitif
16	*E .coli* -16	16	29	25	31	25	31	Pozitif
17	*E .coli* -17	8	15	12	22	13	23	Pozitif
18	*E .coli* -18	0	0	0	0	0	0	Negatif
19	*E .coli* -19	22	22	30	31	21	21	Negatif
20	*E .coli* -20	23	27	25	28	26	29	Negatif
21	*E .coli* -21	15	29	30	32	28	30	Negatif
22	*E .coli* -22	0	14	12	21	10	23	Pozitif
23	*E .coli* -23	8	16	16	25	14	24	Pozitif
24	*E .coli* -24	12	19	18	25	21	27	Pozitif
25	*E .coli* -25	7	15	12	23	12	25	Pozitif
25	*E .coli* -26	8	17	18	25	16	26	Pozitif

27	*E .coli* -27	10	18	17	27	16	27	Pozitif
28	*E .coli* -28	0	11	0	18	0	19	Pozitif
29	*E .coli* -29	9	15	9	24	15	24	Pozitif
30	*E .coli* -30	0	13	11	22	10	19	Pozitif
31	*E .coli* -31	0	18	13	25	16	26	Pozitif
32	*E .coli* -32	0	0	0	8	0	0	Negatif
33	*E .coli* -33	10	17	10	26	16	25	Pozitif
34	*E .coli* -34	0	9	12	23	12	27	Pozitif
35	*E .coli* -35	7	17	15	24	17	25	Pozitif
36	*E .coli* -36	8	16	15	24	16	24	Pozitif
37	*E .coli* -37	27	28	27	29	21	23	Negatif
38	*E .coli* -38	9	17	17	25	17	27	Pozitif
39	*E .coli* -39	0	15	14	22	14	23	Pozitif
40	*E .coli* -40	9	12	9	15	15	19	Pozitif
41	*E .coli* -41	0	13	10	23	11	20	Pozitif
42	*E .coli* -42	27	25	27	28	25	25	Negatif
43	*E .coli* -43	15	29	30	30	26	28	Negatif
44	*E .coli* -44	11	18	16	25	17	26	Pozitif
45	*E .coli* -45	0	12	0	20	0	23	Pozitif
46	*E .coli* -46	0	17	13	24	0	10	Pozitif
47	*E .coli* -47	27	29	27	29	25	26	Negatif
48	*E .coli* -48	7	20	16	27	17	26	Pozitif
49	*E .coli* -49	0	14	11	23	10	24	Pozitif
50	*E .coli* -50	0	14	10	20	7	22	Pozitif
51	*E .coli* -51	0	16	11	22	14	24	Pozitif
52	*E .coli* -52	0	14	11	20	0	22	Pozitif
53	*E .coli* -53	0	15	9	23	10	24	Pozitif
54	*E .coli* -54	0	13	10	20	8	22	Pozitif
55	*E .coli* -55	0	16	13	23	9	24	Pozitif
56	*E .coli* -56	9	19	16	24	19	25	Pozitif
57	*E .coli* -57	10	20	15	25	12	27	Pozitif
58	*E .coli* -58	0	11	0	19	0	19	Pozitif
59	*E .coli* -59	7	17	12	23	14	25	Pozitif
60	*E .coli* -60	9	16	14	24	15	25	Pozitif
61	*E .coli* -61	9	18	16	25	12	26	Pozitif
62	*E .coli* -62	7	15	12	23	11	23	Pozitif
63	*E .coli* -63	29	29	31	30	26	29	Negatif
64	*E .coli* -64	11	19	18	28	18	26	Pozitif
65	*E .coli* -65	0	12	10	20	0	21	Pozitif

CTX 30; Sefotaksim; CTC 40; Sefotaksim / Klavulanik Asit; FEP 30; Sefepim; FEC40; Sefepim / Klavulanik Asit; CAZ 30; Seftazidim; CZC 40; Seftazidim / Klavulanik Asit.

Birleşik disk testinin (CDT) gerçekleştirilmesinin kolay olduğu ve yorumlanmasının basit olduğu bulunmuştur. Bu yöntem için duyarlılık ve özgüllük ilk olarak sırasıyla % 96 ve % 100 olarak bildirilmiştir (Linscott and Brown 2005).

4.4.2 VITEK® 2 SYSTEM İle Onaylayıcı Belirleme

Birçok çalışma, otomatik sistemlerin ESBL üreten Enterobacteriaceae'yi tespit etme yeteneğini değerlendirmiştir (Patricia A Bradford, 2001). Bu çalışmanın sonucu, (37/65) ESBL üreten *E.coli*'nin 52'si (CDT) ile teyit edildiği, aynı zamanda tabloda gösterildiği gibi Ticarcillin (TIC), Ticarcillin / Clavulanic asit (Ti / CA), Piperacillin (PIP), Piperacillin / Tazobactam (TZP), Ceftazidime (CZA), FEP Cefepime (FEP), Aztreonam (AZT) and Imipenem (IMP) içeren 8 tip antibiyotik altında ESBL üretimini de onaylayan VITEK® 2 SYSTEM ile teyit edildi. Bu çalışmanın sonucu, Çizelge (4.4) 'de gösterildiği gibi duyarlılığın değişkenlik aralığını gösterdi. *E. coli*, Ticarcillin'e (% 91), Piperacillin'e (% 91), Ceftazidime'ye (% 91) Cefepime'ye ve (% 12.13) Imipenem'e yüksek direnç oranı gösterdi. İzole *E. coli*, Piperacillin / tazobactam'a duyarlılık gösterirken (% 69.69). Çizelge (4.4) ve Şekil (4.4). Duyarlılık yüzdesine göre kategorik olduğunda yalnızca *E. coli* kodlu 4/14 *E. coli*, *E. coli*-11, *E. coli*-28, *E. coli*-29, *E.coli*-32, (4.5) tablosunda gösterildiği gibi, çoklu ilaç direnci (MDR) gözlemledi. ESBL üreten E.coli'nin belirlenmesi için CDT'nin duyarlılık ve özgüllük skorunun VITEK'den sırasıyla % 84.5, % 94.4, % 93.9, % 97.0 daha yüksek olduğu belgelenmiştir (Wiegand *et al.* 2007).

Çizelge 4.4. ESBL direnci *E. coli* için VITEK testi ile antibiyotik duyarlılık testi

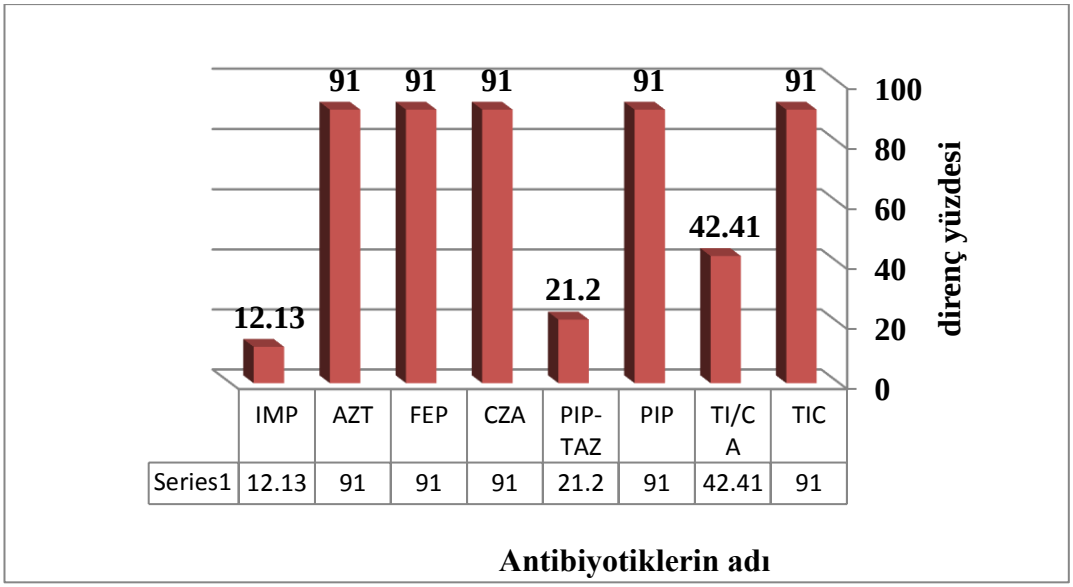
Code of sample	TIC	Ti/CA	PIP	TZP	CZA	FEP	AZT	IMP
E.coli-1	R	S	R	S	R	*R	R	S
E.coli-2	R	R	R	S	R	R	R	S
E.coli-3	R	S	R	S	*R	*R	*R	S
E.coli-4	R	S	R	S	*R	*R	*R	S
E.coli-5	R	R	R	I	R	R	R	S
E.coli-6	R	I	*R	S	*R	*R	*R	S
E.coli-7	R	R	R	I	R	R	R	S
E.coli-8	-	-	-	S	R	R	-	-
E.coli-9	R	R	R	I	R	R	R	S
E.coli-10	S	S	S	S	S	S	S	S
E.coli-11	R	R	R	R	R	R	R	R
E.coli-12	R	S	R	S	R	R	R	S
E.coli-13	R	S	R	S	*R	*R	R	S
E.coli-14	R	R	R	R	R	R	R	S
E.coli-15	R	S	R	S	R	*R	R	S
E.coli-16	R	S	R	S	*R	*R	*R	S
E.coli-17	R	R	R	S	R	R	R	S
E.coli-18	R	R	R	R	R	R	R	R
E.coli-19	R	S	R	S	*R	*R	*R	S
E.coli-20	R	S	R	S	*R	*R	*R	S
E.coli-21	S	S	S	S	S	S	S	S
E.coli-22	R	R	R	S	R	R	R	S
E.coli-23	-	-	-	S	R	*R	-	-
E.coli-24				S	*R	*R		
E.coli-25	R	R	R	S	R	*R	R	S
E.coli-26				S	R	R		
E.coli-27	R	S	R	S	R	*R	R	S
E.coli-28	R	R	R	R	R	R	R	R
E.coli-29	R	R	R	S	R	R	R	S
E.coli-30	R	R	R	S	R	R	R	S
E.coli-31	R	S	R	S	R	*R	R	S
E.coli-32	R	R	R	R	R	R	R	R
E.coli-33	R	I	R	R	R	R	R	S
E.coli-34	R	S	R	S	R	R	R	S
E.coli-35	R	S	R	*R	R	*R	R	S
E.coli-36	R	S	R	S	*R	*R	*R	S
E.coli-37	S	S	S	S	S	S	S	S

TIC, Ticarcillin; Ti/CA, Ticarcillin/ Klavulanik acid; PIP, Piperasilin; TZP, Piperasilin / Tazobaktam; CZA, Seftazidim; FEP, Sefepim; AZT, Aztreonam, IMP, Imipenem.

Çizelge 4.5 VITEK sistemi ile antibiyotik dağılımı ve direnç yüzdesi

Antibiyotik	**(R)**	**(S)**	**(I)**
Ticarcillin	30/33 (91%)	3/33 (9%)	0/33 (0 %)
Ti / CA	14/33 (42.41%)	17/33 (51.5%)	2/33 (6.09%)
Piperasilin	30/33 (91%)	3/33 (9%)	0/33 (0 %)
PIP/ Tazobaktam	7/33 (21.21%)	23/33 (69.69%)	3/33 (9.1%)
Seftazidim	30/33 (91%)	3/33 (9%)	0/33 (0 %)
Sefepim	30/33 (91%)	3/33(9%)	0/33 (0 %)
Aztreonam	30/33 (91%)	3/33 (9%)	0/33 (0 %)
Imipenem	4/33 (12.13%)	29/33 (87.87 %)	0/33 (0 %)

Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, *Escherichia coli* dahil Enterobacteriaceae, kritik öncelikli antibiyotiğe dirençli bakteriler arasındadır. Çoklu ilaca dirençli (MDR) Escherichia coli, ortaya çıkan antimikrobiyal direnç (AMR) nedeniyle (DSÖ) tarafından öncelikli bir patojen olarak listelenmiştir (Rodrigo-Troyano and Sibila 2017, Shrivastava *et al.* 2018). Ortalama direnç oranının Uropatojenik Escherichia coli (UPEC) olduğu aşağıdaki gibi yayınlandı: sefotaksim (77%), seftriakson (70%), siprofloksasin (45.47 %) ve imipenem, (6.06%) (Isolates 2020). Bunun sonucu, izole edilmiş üropatojenik *E. coli*'nin seftazidime (% 100) yüksek direnç gösterdiğini belgeleyen (Issac), (Odongo ve diğerleri 2020) ile anlaşma oldu. Sonucumuz, *E. coli* izolatlarının aztreonama (92%), amoksisilin + klavulanik asit (% 86), seftriakson (% 87.5), piperasilin (% 87), seftazidim (% 77) ve imipenem (% 63) direnç gösterdiğine dair önceki raporların bulguları ile de desteklenmiştir (Al-Hasnawy *et al.* 2018). Önceki bir dizi çalışma, bir *E. coli* üreten ESBL'lerin yüksek prevalansını göstermiştir (Ch 2014). Bu çalışmada elde edilen yüksek ESBL üreten bir izolat insidansı, muhtemelen büyük miktarda üçüncü nesil sefalosporin tüketimine, kendi kendine ilaç tedavisine ve Iraklı hastalar ve doktorlar tarafından antimikrobiyallerin kapsamlı profilaktik kötüye kullanımına bağlıydı.



Şekil 4.4 Antibiyotik direncinin VITEK sistemine göre dağılımı

4.5 ESBL Üreten *E. coli* İzolatlarının Genotipik Olarak Tespiti

Antimikrobiyal dirençler, sağlık hizmetleri alanında dünya çapında artan ve önemli bir sorundur. ESBL'ler, çoğunlukla gram negatif bakteriler tarafından üretilen ve β-laktam antibiyotiklere direnç sağlayan önemli bir β-laktamaz enzimi grubunu temsil eder, bu nedenle bu enzimlerin tespiti, optimal hasta bakımı için çok önemlidir (Al-Hasnawy *et al.* 2018). Beta-laktamlara direnç, birçok mekanizmaya atfedildi ve bunlardan biri, enzimlerin, özellikle blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, blaOXA, bla PER and blaVIM'in modifiye edilmesinin üretimidir (Collee *et al.* 1996, Shanthi *et al.* 2018, Ch 2014).

Bakteriyel izolatların ESBL fenotipi, genotipleme sonuçlarıyla ilişkilendirildi. Bu nedenle, bu çalışma seçildi (29/65) Çizelge (4.5). ESBL üreten *E.coli* izolatları ve ESBL gen üretimi için analizler (bla TEM-D1, bla-CTX-D1, bla-OXA-D1) PCR ile tespit edildi. Genotipik olarak, *E.coli* izolatlarının 29/29 (% 100.0) ve 29/29 (% 100.0) izolatları sırasıyla blaTEM ve blaCTX genlerini barındırırken, fenotipik olarak ESBL üreten *E.coli* izolatları bla-OXA 0/29 (% 0.0) Çizelge (4.6) 'de ve Şekil (4.4, 4.5, ve 4.6) düzenlendiğigibi.

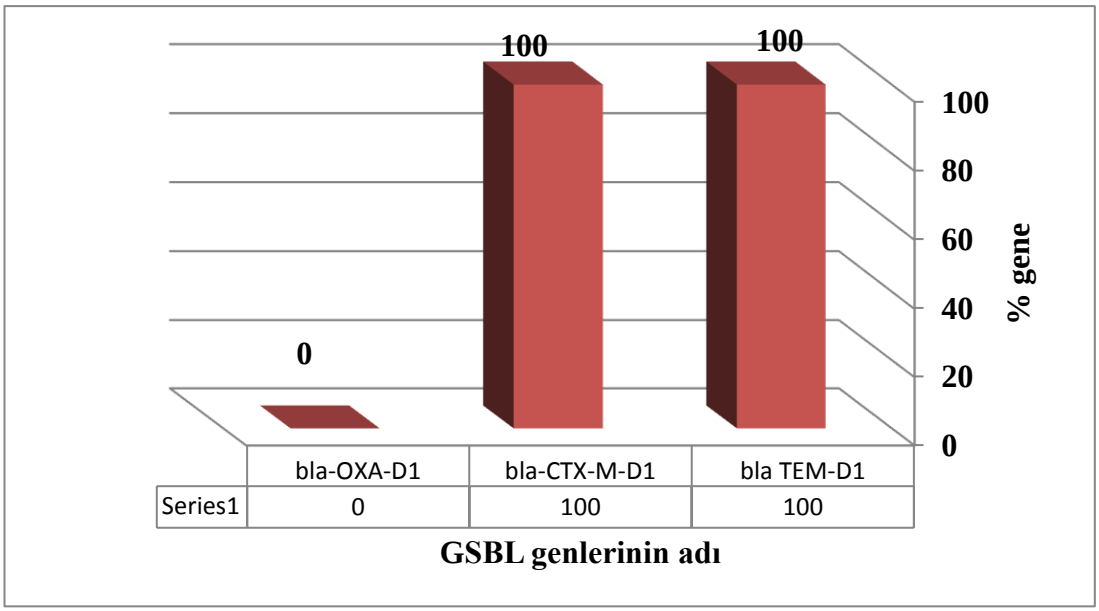
Çizelge 4.6 En çok ESBL, genotipik tespit için seçilen *E.coli* izolatları

No	Kod	CTX 30	CTC 40	FEP 30	FEC 40	CZC 40	CAZ 30	Int.
1	*E .coli* -1	9	18	13	23	15	24	Pozitif
2	*E .coli* -5	0	11	9	18	8	22	Pozitif
3	*E .coli* -10	0	15	14	25	14	29	Pozitif
4	*E .coli* -11	0	0	0	0	0	0	Pozitif
5	*E .coli* -12	7	16	15	24	12	25	Pozitif
6	*E .coli* -14	0	9	R	18	0	19	Pozitif
7	*E .coli* -15	9	16	15	23	15	24	Pozitif
8	*E .coli* -22	0	14	12	21	10	23	Pozitif
9	*E .coli* -25	7	15	12	23	12	25	Pozitif
10	*E .coli* -28	0	11	0	18	0	19	Pozitif
11	*E .coli* -29	9	15	9	24	15	24	Pozitif
12	*E .coli* -30	0	13	11	22	10	19	Pozitif
13	*E .coli* -31	0	18	13	25	16	26	Pozitif
14	*E .coli* -32	0	0	0	8	0	0	Pozitif
15	*E .coli* -34	0	9	12	23	12	27	Pozitif
16	*E .coli* -38	9	17	17	25	14	23	Pozitif
17	*E .coli* -39	0	15	14	22	14	23	Pozitif
18	*E .coli* -41	0	13	10	23	11	20	Pozitif
19	*E .coli* -45	0	12	0	20	0	23	Pozitif
20	*E .coli* -46	0	17	13	24	0	10	Pozitif
21	*E .coli* -49	0	14	11	23	10	24	Pozitif
22	*E .coli* -50	0	14	10	20	7	22	Pozitif
23	*E .coli* -51	0	16	11	22	14	24	Pozitif
24	*E .coli* -52	0	14	11	20	0	22	Pozitif
25	*E .coli* -53	0	15	9	23	10	24	Pozitif
26	*E .coli* -55	0	16	13	23	9	24	Pozitif
27	*E .coli* -57	10	20	15	25	12	27	Pozitif
28	*E .coli* -58	0	11	0	19	0	19	Pozitif
29	*E .coli* -65	0	12	10	20	0	21	Pozitif

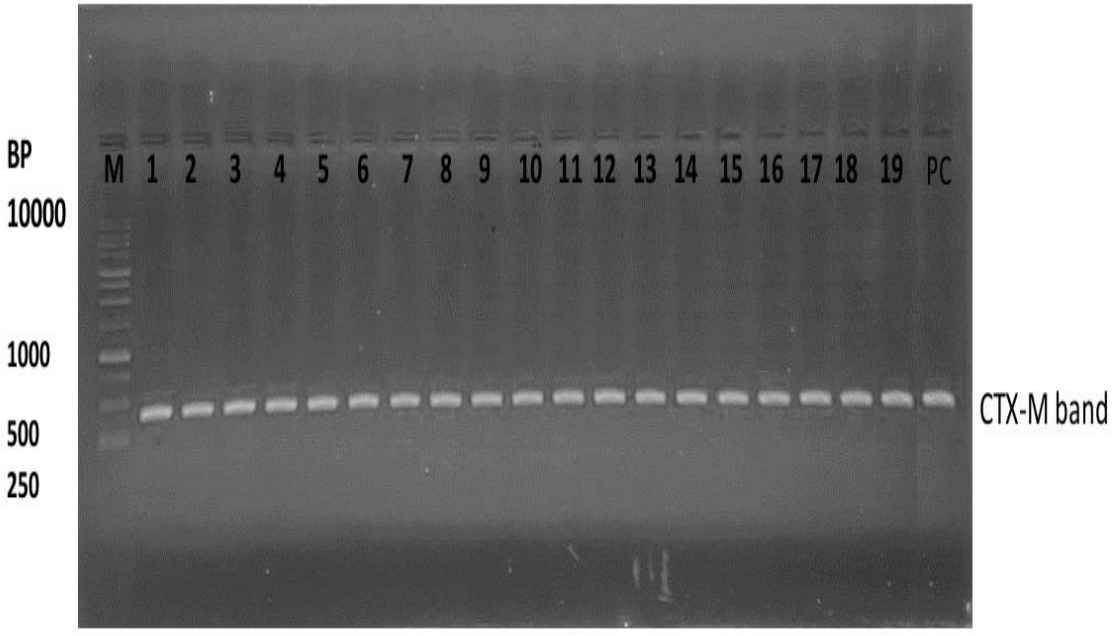
CTX 30; Sefotaksim; CTC 40; Sefotaksim / Klavulanik Asit; FEP 30; Sefepim; FEC40; Sefepim / Klavulanik Asit; CAZ 30; Seftazidim; CZC 40; Seftazidim / Klavulanik Asit, Int., Yorumlama.

Çizelge 4.7 Seçilen 29 *E. coli* izolatı arasında ESBL genlerinin sayısı ve yüzdesi

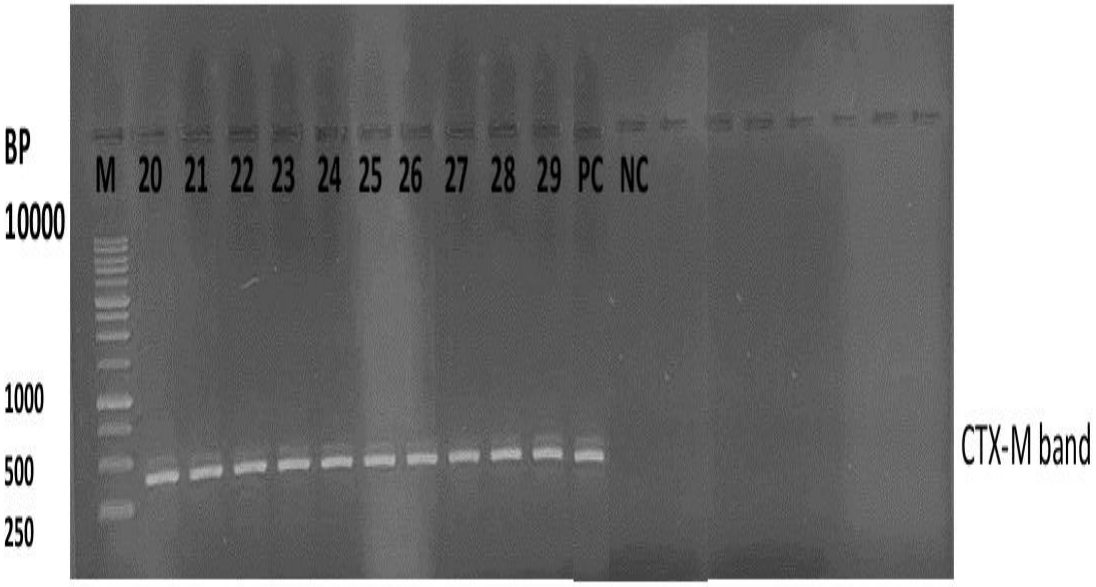
No	*E.coli* Kodu	*bla TEM-*	*bla-CTX-*	*bla-OXA-*
1	*E .coli* -1	+ve	+ve	- ve
2	*E .coli* -5	+ve	+ve	- ve
3	*E .coli* -10	+ve	+ve	- ve
4	*E .coli* -11	+ve	+ve	- ve
5	*E .coli* -12	+ve	+ve	- ve
6	*E .coli* -14	+ve	+ve	- ve
7	*E .coli* -15	+ve	+ve	- ve
8	*E .coli* -22	+ve	+ve	- ve
9	*E .coli* -25	+ve	+ve	- ve
10	*E .coli* -28	+ve	+ve	- ve
11	*E .coli* -29	+ve	+ve	- ve
12	*E .coli* -30	+ve	+ve	- ve
13	*E .coli* -31	+ve	+ve	- ve
14	*E .coli* -32	+ve	+ve	- ve
15	*E .coli* -34	+ve	+ve	- ve
16	*E .coli* -38	+ve	+ve	- ve
17	*E .coli* -39	+ve	+ve	- ve
18	*E .coli* -41	+ve	+ve	- ve
19	*E .coli* -45	+ve	+ve	- ve
20	*E .coli* -46	+ve	+ve	- ve
21	*E .coli* -49	+ve	+ve	- ve
22	*E .coli* -50	+ve	+ve	- ve
23	*E .coli* -51	+ve	+ve	- ve
24	*E .coli* -52	+ve	+ve	- ve
25	*E .coli* -53	+ve	+ve	- ve
26	*E .coli* -55	+ve	+ve	- ve
27	*E .coli* -57	+ve	+ve	- ve
28	*E .coli* -58	+ve	+ve	- ve
29	*E .coli* 65	+ve	+ve	- ve
Toplam	**N**	(29/29)	(29/29)	(0/29)
	%	(100%)	(100%)	(% 0.0)



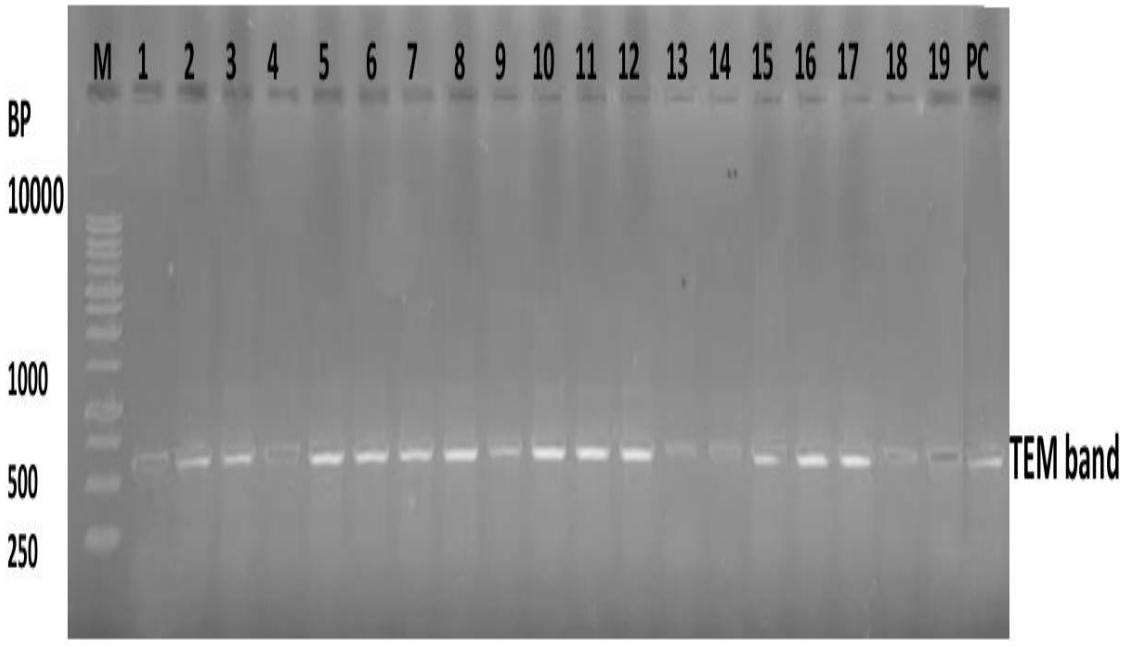
Şekil 4.5 İzole *E. coli* arasında ESBL genlerinin dağılımı



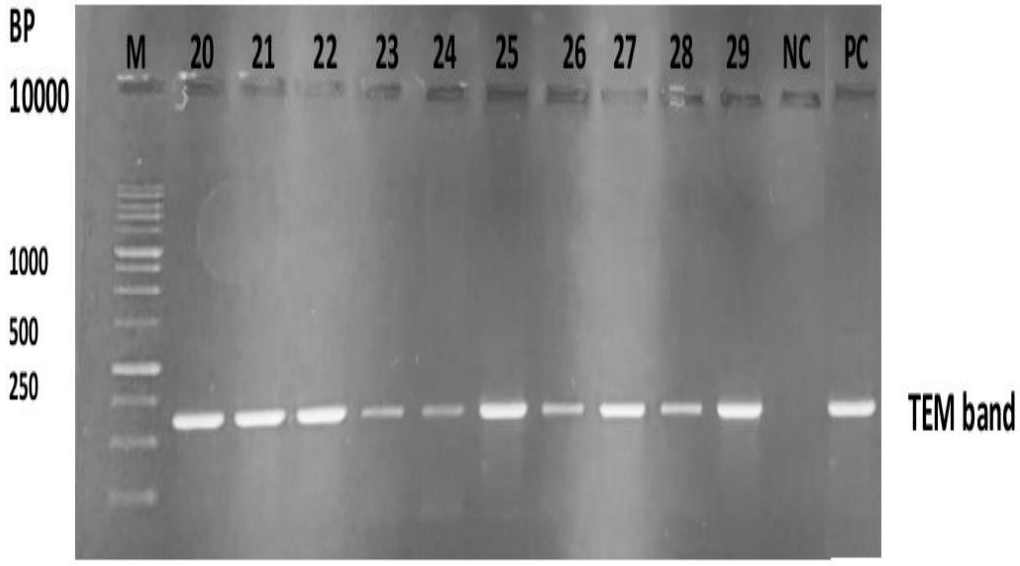
Şekil 4.6 - a- *E.coli* izolatlarında CTX-M geninin PCR ürününün jel elektroforezi, L = DNA moleküler boyut markörleri (100 bp), 1'den 19'a kadar izolatların sayısını temsil eder



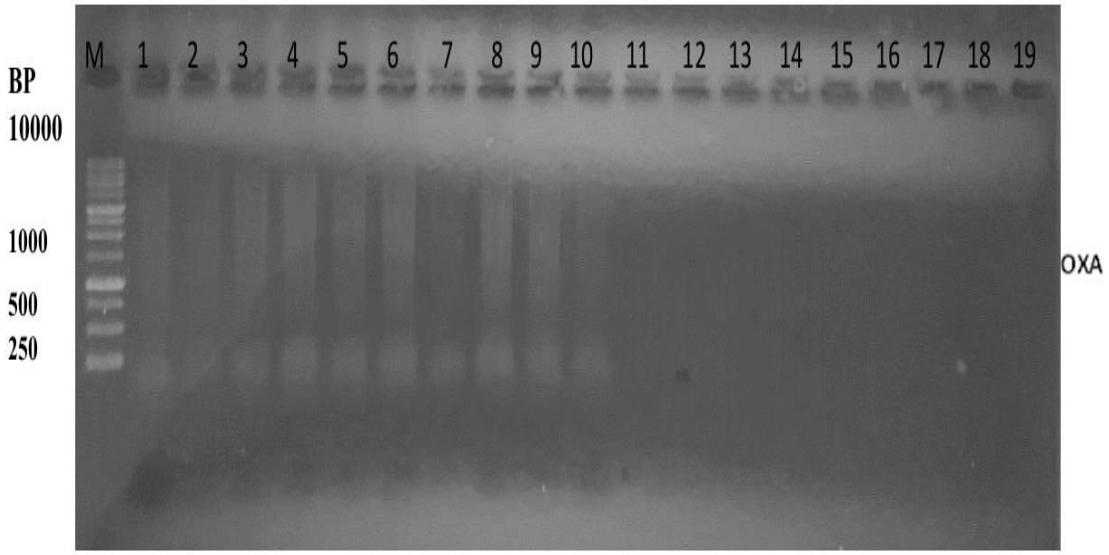
Şekil 4.6 - b- *E.coli* izolatlarında CTX-M geninin PCR ürününün jel elektroforezi, L = DNA moleküler boyut markörleri (100 bp), 20 ila 29, izolatların sayısını temsil eder, NC; negatif kontrol, PC; pozitif kontrol. Koşul 81 volt altında; 50 dakika



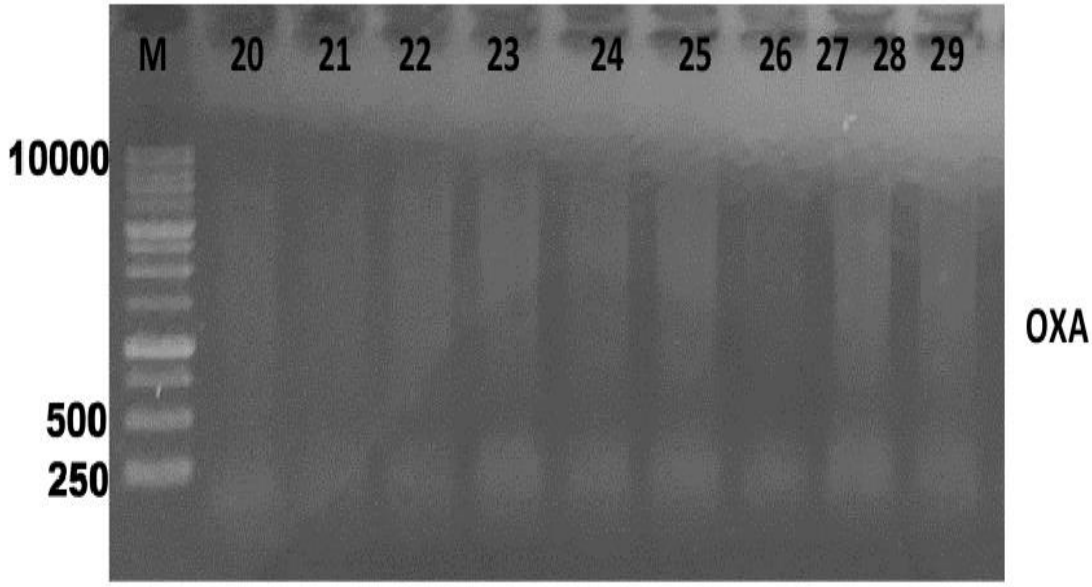
Şekil 4.7 - a- *E. coli* izolatlarında TEM geninin PCR ürününün jel elektroforezi L = DNA moleküler boyut markörleri (100 bp), 1'den 19'a kadar izolatların sayısını



Şekil 4.7 - b- *E.coli* izolatlarında TEM geninin PCR ürününün jel elektroforezi, L = DNA moleküler boyut markörleri (100 bp), 20 ila 29 + NC, PC izolatların sayısını temsil eder. Koşul 81 volt altında; 50 dakika



Şekil 4.8 - a- *E.coli* izolatlarında OXA geninin PCR ürününün jel elektroforezi, L = DNA moleküler boyut markörleri (100 bp), 1'den 19'a kadar izolatların sayısını temsil eder



Şekil 4.8 - b- *E. coli* izolatlarında OXA geninin PCR ürününün jel elektroforezi, L = DNA moleküler boyut markörleri (100 bp), 20 ila 29 izolatların sayısını temsil eder; NC; negatif kontrol, PC; Pozitif kontrolü. Koşul 81 volt altında; 50 dakika

Bel şehrinde yerel olarak yapılan bazı araştırmalarda (Al-Mayahie and Al Kuriashy 2016) araştırmacı, idrardan izole edilen *E.coli* arasında en sık görülen ESBL geni CTX-M-tipinin % 70,3'ü olduğunu belgelemiştir, Diğer taraftan bulgumuz, izole *E. coli*'nin hiçbirinin TEM β-laktamaz geni üretmediğini belgeleyen aynı araştırmacı ile tutarsızdır. ESBL'ler bla-OXA geni ile ilgili olarak, bulgumuz, *E.coli* arasındaki tüm OXA-tipi ESBL geninin CTX-M ile birlikte üretildiğini belgeleyen (Al-Mayahie and Al Kuriashy 2016) ile de uyuşmuyor. TEM β-laktamazlar dünya çapında yayılmıştır ve birçok Enterobacteriaceae'de bulunur. Bunun nedeni, bakteriler arasında yayılmasını teşvik eden yüksek derecede hareketli genetik unsurlar üzerindeki varlığı ve ilaç direncine aracılık eden ilk genlerden biri ve birinci ve ikinci nesil sefalosporinlere duyarlılığın azalması olabilir. Bulgumuz, yüksek prevalan bla-CTX-M genleri kaydetti, bu Abdul-Aziz *et al.* (2018), bla CTX-M genini belgeleyen (% 93.9) en yaygın ESBL genotipiydi (Alqasim *et al.* 2018). Nijerya'da yapılan çalışmada, *E. coli*'nin 17 (% 32.7) bla-TEM için Pozitif olduğu, 35 (% 67.3) bla-CTX-M için pozitif olduğu tespit edildi (Ugbo *et al.* 2020). Nepal'de yapılan başka bir çalışmada, MDR E.coli izolatları arasında benzer bulgu bla-TEM (% 83.8), bla-CTX-M (% 66.1) bulunmuştur (Pandit *et al.* 2020). OXA genini

taşımayan *E. coli* ile ilgili olarak, çalışmamız izole hiçbir *E. coli*'nin OXA genini taşıyamayacağını belgeleyen Habeeb *et al.*, 2013 ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Birden fazla türde ESBL enzimi üreten bakteri prevalansının insan hijyeni üzerinde daha fazla etkisi olduğu düşünülmektedir (Erlandsson, 2007). blaCTX-M genleri, plazmit aracılı ESBL'lerin son ailesidir; bazıları transpozonların bir parçasıydı veya integronlarda gen kasetlerini oluşturuyor (Livermore *et al.* 2007). PCR, fenotipik saptama yönteminden daha hızlı olduğu için (Chiangjong, 2006), fenotip yöntemleriyle belirlenmesi zor olan zayıf veya ifade edilmemiş (sessiz) genlerin varlığını saptamaya ek olarak ESBL tespiti için etkili bir yöntem olarak kabul edilir; PCR, enfeksiyonun erken bir prediktörü olarak numuneleri doğrudan test etmek için de kullanılabilir (Diekema *et al.* 2004).

4.6. ESBL geninin dizilimi tespiti

Bu çalışmada, *E. coli* izolatlarını CTX-M ve TEM genlerinden izole eden iki tür genetik onaylı ESBL geni dizileme analizi için gönderilmiştir. *E. coli* izolatlarından sorumlu iki genin sonucu, NCBI / BLAST sonucu ile karşılaştırıldı.

Çizelge 4.8 TEM gen dizilimi

Açıklama	Bilimsel ad	Maksimum puan	Toplam puan	Sorgu kapağı	E Değer	Tanıma yüzdesi	Acc. Len	Katılım
E.coli strain 29 beta laktamz (TEM-1)genleri tam CD'ler	*E.coli*	1066	1066	97%	0.0	99.49%	908	CP055257.1
E.coli suşu EA13 plazmid pTA13-1. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	182585	CP069713.1
E.coli suşu EA2 plazmid pTA2-1. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	120379	CP069711.1
E.coli strain ECY44plasmid pECY4-3 tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	105203	CP069704.1
E.coli suşu EA7plasmid pTA7-1. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	77243	CP069708.1
E.coli suşu FDAARGOS-1266 plazmid isimsiz1. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	127965	CP069590.1
E.coli suşu FDAARGOS-1248 plazmid isimsiz1. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	50632	CP069543.1
E.coli suşu FDAARGOS-1248 kromozomu. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	4919415	CP069542.1
E.coli suşu H98 genom derlemesi izole. plazmid: pZPK-H98	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	98473	LR999867.1

E.coli suşu H29 genom tertibatlarını izole edin. plazmid: pZPK-H29	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	98481	LR999865.1
E.coli suşu ESBL3227 plazmid pESBL3156-IncX4. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	147002	MW390534.1
E.coli suşu ESBL3156 plazmid pESBL3156-IncX4. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	44057	MW390525.1
E.coli suşu ESBL2082 plazmid pESBL2082-IncX4. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	43732	MW390518.1
E.coli suşu XH992 plazmid pXH992-2. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	91319	CP019395.1
E.coli suşu RUT3575 plazmid p3575-NDM-5. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	93625	CP048012.1

Çizelge 4.9 CTX-M gen dizilimi

Açıklama	Bilimsel ad	Maksimum puan	Toplam puan	Sorgu kapağı	E Değer	Tanıma yüzdesi	Acc. Len	Katılım
E.coli strain 29 beta laktamz (TEM-1)genleri tam CD'ler	*E.coli*	1066	1066	97%	0.0	99.49%	908	CP055257.1
E.coli suşu EA13 plazmid pTA13-1. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	182585	CP069713.1
E.coli suşu EA2 plazmid pTA2-1. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	120379	CP069711.1
E.coli strain ECY44plasmid pECY4-3 tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	105203	CP069704.1
E.coli suşu EA7plasmid pTA7-1. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	77243	CP069708.1

E.coli suşu FDAARGOS-1266 plazmid isimsiz1. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	127965	CP069590.1
E.coli suşu FDAARGOS-1248 plazmid isimsiz1. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	50632	CP069543.1
E.coli suşu FDAARGOS-1248 kromozomu. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	4919415	CP069542.1
E.coli suşu H98 genom derlemesi izole. plazmid: pZPK-H98	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	98473	LR999867.1
E.coli suşu H29 genom tertibatlarını izole edin. plazmid: pZPK-H29	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	98481	LR999865.1
E.coli suşu ESBL3227 plazmid pESBL3156-IncX4. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	147002	MW390534.1
E.coli suşu ESBL3156 plazmid pESBL3156-IncX4. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	44057	MW390525.1
E.coli suşu ESBL2082 plazmid pESBL2082-IncX4. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	43732	MW390518.1
E.coli suşu XH992 plazmid pXH992-2. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	91319	CP019395.1
E.coli suşu RUT3575 plazmid p3575-NDM-5. tam sıra	*E.coli*	1064	1064	95%	0.0	100.00%	93625	CP048012.1

5. SONUÇ ve TAVSİYE

5.1 Sonuç

E. coli izolatları çoğunlukla idrar örneğinden izole edilmiştir, kadınlarda erkek gruba göre daha yaygındır. Üropatojenik *E. coli,* üçüncü on yılda daha fazla kadın enfekte etti.
ESBL grubunun direnç gösterdiği *E. coli* izolatları için CDT testi en güvenilir test. Bu çalışmada ayrıca ESBL üreten *E. coli* izolatlarında ESBL genleri, blaCTX-M, blaTEM ve gözlenmeyen blaOXA geni de kaydedilmiştir.

Bakteriyel patojenlerin klonal çeşitliliğini ve epidemiyolojik kimliklerini deşifre etmek için gelecekteki çalışmaların biyoinformatiği kapsaması zorunludur. Bu, hastalık oluşumunun, bakteriyel patojenlerin kökenlerinin ve kaynaklarının izlenmesine ve çoklu ilaca dirençli bakteriyel patojenlerin yayılmasının azaltılmasına büyük ölçüde yardımcı olacaktır.

5.2 Öneri

Fenotipik ve genotipleme modeliyle ilgili daha fazla ayrıntı vermeyi amaçlayan üropatojenik *E. coli*'nin daha fazla örneklem büyüklüğünü incelemek. Bakteriler arasındaki genetik çeşitliliği incelemek için farklı ortamlardan daha fazla İzolat *E. coli* örneği incelemek.

Iraklı hastada antimikrobiyal dirençten sorumlu olan *E. coli*'nin diğer antibiyotik direnç genlerini inceleyin. Bu nedenle, fenotipik yöntem kullanılarak ESBL'nin (CDT) rutin klinik tespiti klinik ortamda tanıtılmalıdır çünkü moleküler yöntemler, bakteriler tarafından ESBL üretimi nedeniyle ilaç direncini kontrol etmek için pahalıdır.

5.3 Etik Hususlar

Tüm izolatlar rutin örnekleme sırasında toplandı. Hastalar projenin amacı hakkında bilgilendirildi ve bana numune alma izni verdiler. Hastanın verileri anonim olarak tutulmuştur. Etik komite tarafından onay, ekte belge ile Irak Sağlık Bakanlığı / Anbar Sağlık Müdürlüğü / Haditha Genel Hastanesi tarafından yapılmıştır (2).

KAYNAKÇA

Afzal, A. M. S. (2017). Antibiotic Resistance Pattern of Escherichia coli and Klebsiella Species in Pakistan: A Brief Overview. J Microb. Biochem. Technol. 9(6): 277-279.

Al-Hasnawy, H. H., Saleh, R. H., & Hadi, B. H. (2018). Existence ofaESBL genes in Escherichia coli and Acinetobacter baumannii isolated from different clinical specimens. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *10*(5), 1112–1117.

Al-Mayahie, S., & Al Kuriashy, J. J. H. (2016). Distribution of ESBLs among Escherichia coli isolates from outpatients with recurrent UTIs and their antimicrobial resistance. *The Journal of Infection in Developing Countries*, *10*(06), 575–583.

Al-Saadi, Z. H. A., & Abdullah, R. M. (n.d.). *PHENOTYPIC AND MOLECULAR DETECTION OF ESCHERICHIA COLI EFFLUX PUMPS FROM UTI PATIENTS*.

Alfred, B., & Heidi, S. (2015). *Microbiological Application*. McGraw Hill Education.

Alqasim, A., Abu Jaffal, A., & Alyousef, A. A. (2018). Prevalence of multidrug resistance and extended-spectrum β-lactamase carriage of clinical uropathogenic Escherichia coli isolates in Riyadh, Saudi Arabia. *International Journal of Microbiology*, *2018*.

Alsamarai, A. G. M., & Ali, S. (2016). Urinary tract infection in Female in Kirkuk city, Iraq: Causative agents and antibiogram. *WJPPS*, *5*, 261–273.

Ambler, R. P., Coulson, A. F. W., Frère, J.-M., Ghuysen, J.-M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R. C., Tiraby, G., & Waley, S. G. (1991). A standard numbering scheme for the class A β-lactamases. *Biochemical Journal*, *276*(1), 269–270.

Ardakani, M. A., & Ranjbar, R. (2016). Molecular typing of uropathogenic *E. coli* strains by the ERIC-PCR method. *Electronic Physician*, *8*(4), 2291.

Ariffin, H., Navaratnam, P., Mohamed, M., Arasu, A., Abdullah, W. A., Lee, C. L., & Peng, L. H. (2000). Ceftazidime-resistant Klebsiella pneumoniae bloodstream infection in children with febrile neutropenia. *International Journal of Infectious Diseases*, *4*(1), 21–25.

Asensio, A., Oliver, A., González-Diego, P., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C., Ros, P., Cobo, J., Palacios, M., Lasheras, D., & Cantón, R. (2000). Outbreak of a multiresistant Klebsiella pneumoniae strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clinical Infectious Diseases*, *30*(1), 55–60.

Basima Khalid Abed Al–Mefregi. Effect of Iron Oxide Nanoparticles on Protease Enzyme Activity in Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infection. 2016. Al–Mustansiriyah University / College of Science.

Bedenic, B., Randegger, C., Boras, A., & Haechler, H. (2001). Comparison of five different methods for detection of SHV extended-spectrum β-lactamases. *Journal of Chemotherapy*, *13*(1), 24–33.

Ben-Ami, R., Schwaber, M. J., Navon-Venezia, S., Schwartz, D., Giladi, M., Chmelnitsky, I., Leavitt, A., & Carmeli, Y. (2006). Influx of extended-spectrum β-lactamase—producing Enterobacteriaceae into the hospital. *Clinical Infectious Diseases*, *42*(7), 925–934.

Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum β-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(1), 1–14.

Boone, D. R., & Castenholz, R. W. (2001). *Bergey's Manual¦ of Systematic Bacteriology*.

Bradford, P A. (n.d.). *Extended-spectrum betalactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. ClinMicrobiol Rev 2001; 14: 933-51*.

Bradford, Patricia A. (2001). Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, *14*(4), 933–951.

Bradford, Patricia A, Yang, Y., Sahm, D., Grope, I., Gardovska, D., & Storch, G. (1998). CTX-M-5, a Novel Cefotaxime-Hydrolyzing β-Lactamase from an Outbreak of Salmonella typhimuriumin Latvia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *42*(8), 1980–1984.

Bray, J. (1945). Isolation of Antigenically Homogeneous Strains of Bact. coli neapolitanum from Summer Diarrhoea of Infants. *Journal of Pathology and Bacteriology*, *57*(2), 239–247.

Brun-Buisson, C., Philippon, A., Ansquer, M., Legrand, P., Montravers, F., & Duval, J. (1987). Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant Klebsiella pneumoniae. *The Lancet*, *330*(8554), 302–306.

Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(6), 1211.

Campos, A. C. C., Andrade, N. L., Ferdous, M., Chlebowicz, M. A., Santos, C. C., Correal, J. C. D., Lo Ten Foe, J. R., Rosa, A. C. P., Damasco, P. V, & Friedrich, A. W. (2018). Comprehensive molecular characterization of Escherichia coli isolates from urine samples of hospitalized patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 243.

Canton, R., & Coque, T. M. (2006). *The CTX-M β-lactamase pandemic Cur Opin Microbiol Oct; 9 (5): 466-75 Epub 2006 Aug 30 Disponible en: http://www sciencedirect com/science/article*. B6VS2-4KSD8CX-5/2/ad4198527fe4d2363030b83e21f3b5cf.

Ch, Z. I. A.-A. M. B. (2014). The prevalence and antimicrobial sensitivity of ESBL Escherichia Coli. in clinical isolates. *Al-Kindy College Medical Journal*, *10*(2).

Chaves, J., Ladona, M. G., Segura, C., Coira, A., Reig, R., & Ampurdanés, C. (2001). SHV-1 β-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in Klebsiella pneumoniae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(10), 2856–2861.

Chiangjong, W. (2006). *Study of Extended-spectrum Beta-lactamase (ESBL)-producing Klebsiella Pneumoniae: Genotypic and Phenotypic Characteristics*. Mahidol University.

Chow, J. W., Fine, M. J., Shlaes, D. M., Quinn, J. P., Hooper, D. C., Johnson, M. P., Ramphal, R., Wagener, M. M., Miyashiro, D. K., & Yu, V. L. (1991). Enterobacter bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Annals of Internal Medicine*, *115*(8), 585–590.

Collee, J. G., Mackie, T. J., & McCartney, J. E. (1996). *Mackie & McCartney practical medical microbiology*. Harcourt Health Sciences.

Cosgrove, S. E., Kaye, K. S., Eliopoulous, G. M., & Carmeli, Y. (2002). Health and economic outcomes of the emergence of third-generation cephalosporin resistance in Enterobacter species. *Archives of Internal Medicine*, *162*(2), 185–190.

de Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Poupart, M.-C., Dumas, M.-P., & Sirot, J. (1991). Concomitant dissemination of three extended-spectrum β-lactamases among different Enterobacteriaceae isolated in a French hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *27*(4), 441–457.

Dia, M. L., Ngom, B., Diagne, R., Ka, R., Lo, S., Cisse, M. F., Arlet, G., & Sow, A. I. (2016). Molecular detection of CTX-M-15-type β-lactamases in Escherichia coli strains from Senegal. *New Microbes and New Infections*, *9*, 45–46.

Diekema, D. J., BootsMiller, B. J., Vaughn, T. E., Woolson, R. F., Yankey, J. W., Ernst, E. J., Flach, S. D., Ward, M. M., Franciscus, C. L. J., & Pfaller, M. A. (2004). Antimicrobial resistance trends and outbreak frequency in United States hospitals. *Clinical Infectious Diseases*, *38*(1), 78–85.

Erlandsson, M. (2007). *Surveillance of antibiotic consumption and antibiotic resistance in Swedish intensive care units*. Institutionen för molekylär och klinisk medicin.

Farajnia, S., Alikhani, M. Y., Ghotaslou, R., Naghili, B., & Nakhlband, A. (2009). Causative agents and antimicrobial susceptibilities of urinary tract infections in the northwest of Iran. *International Journal of Infectious Diseases*, *13*(2), 140–144.

Feizabadi, M. M., Mahamadi-Yeganeh, S., Mirsalehian, A., Mirafshar, S.-M., Mahboobi, M., Nili, F., & Yadegarinia, D. (2010). Genetic characterization of ESBL producing strains of Klebsiella pneumoniae from Tehran hospitals. *The Journal of Infection in Developing Countries*, *4*(10), 609–615.

Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2007). *Diagnostic microbiology*. Mosby St Louis.

Forsyth, V. S., Armbruster, C. E., Smith, S. N., Pirani, A., Springman, A. C., Walters, M. S., Nielubowicz, G. R., Himpsl, S. D., Snitkin, E. S., & Mobley, H. L. T. (2018). Rapid growth of uropathogenic Escherichia coli during human urinary tract infection. *MBio*, *9*(2).

Foxman, B. (2013). Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious Disease Clinics of North America*, *28*(1), 1–13.

Garrity, G. M. (2005). Systematic bacteriology. *The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Bergey's Manual Trust, Department of Microbiology and Molecular Genetics, 2*.

Gebremariam, G., Legese, H., Woldu, Y., Araya, T., Hagos, K., & GebreyesusWasihun, A. (2019). Bacteriological profile, risk factors and antimicrobial susceptibility patterns of symptomatic urinary tract infection among students of Mekelle University, northern Ethiopia. *BMC Infectious Diseases*, *19*(1), 1–11.

Gillor, O., Kirkup, B. C., & Riley, M. A. (2004). Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Advances in Applied Microbiology*, *54*, 129–146.

Gizachew, Z., Kassa, T., Beyene, G., Howe, R., & Yeshitela, B. (2019). Multi-drug resistant bacteria and associated factors among urinary tract infection suspectedreproductive aged women in jimma university specialized hospital, Southwest Ethiopia. *Ethiopian Medical Journal*.

Habeeb, M. A., Sarwar, Y., Ali, A., Salman, M., & Haque, A. (2013). Rapid emergence of ESBL producers in E. coli causing urinary and wound infections in Pakistan. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, *29*(2), 540.

Haeggman, S., Löfdahl, S., & Burman, L. G. (1997). An allelic variant of the chromosomal gene for class A beta-lactamase K2, specific for Klebsiella pneumoniae, is the ancestor of SHV-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*(12), 2705–2709.

Hedges, R. W., & Jacob, A. E. (1974). Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Molecular and General Genetics MGG*, *132*(1), 31–40.

Hemraj, V., Diksha, S., & Avneet, G. (2013). A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare J Life Sci*, *1*(1), 1–7.

Heritage, J., Hawkey, P. M., Todd, N., & Lewis, I. J. (1992). Transposition of the gene encoding a TEM-12 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *36*(9), 1981–1986.

Ho, J., Tambyah, P. A., & Paterson, D. L. (2010). Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *23*(6), 546–553.

Institute, C. and L. S. (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. In *CLSI document M07-A9* (Vol. 32). Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA.

Institute, C. and L. S. (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In *CLSI supplement M100*. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA.

Isolates, A. R. among I. L. E. coli. (2020). Antibiotic Resistance among Iraqi Local E. coli Isolates. In *E. Coli Infections-Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment*. IntechOpen.

Jacoby, G. A., & Carreras, I. (1990). Activities of beta-lactam antibiotics against Escherichia coli strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *34*(5), 858–862.

Jacoby, G., Han, P., & Tran, J. (1997). Comparative in vitro activities of carbapenem L-749,345 and other antimicrobials against multiresistant gram-negative clinical pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*(8), 1830–1831.

Jarlier, V., Nicolas, M.-H., Fournier, G., & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β-lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Clinical Infectious Diseases*, *10*(4), 867–878.

JAWETZ, M. A., BROOKS, G.F., BUTEL, J.S. AND MORSE, S.A. 2004. *Medical Microbiology*, scientific research

Jawetz, E.; Melnick, J. A. and Adelberg, E. A. (2016). Review of Medical Microbiology 27thed. McGraw-Hill education , Inc : 851pp.

Jett, B. D., Ritchie, D. J., Reichley, R., Bailey, T. C., & Sahm, D. F. (1995). In vitro activities of various beta-lactam antimicrobial agents against clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella spp. resistant to oxyimino cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(5), 1187–1190.

Jørgensen, S. B., Bojer, M. S., Boll, E. J., Martin, Y., Helmersen, K., Skogstad, M., & Struve, C. (2016). Heat-resistant, extended-spectrum β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in endoscope-mediated outbreak. *Journal of Hospital Infection*, *93*(1), 57–62.

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, *33*(3), 300.

Kaye, K. S., Cosgrove, S., Harris, A., Eliopoulos, G. M., & Carmeli, Y. (2001). Risk Factors for Emergence of Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporins among Enterobacterspp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(9), 2628–2630.

Kotsyuba, K. R., Voronkova, O. S., Vinnikov, A. I., & Shevchenko, T. M. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance of Enterobacteriaceae family representatives. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, *1*(5).

Kucheria, R., Dasguptaa, P., Sacks, S., Khan, M., & Sheerin, N. (2005). Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgraduate Medical Journal*, *81*(952), 83.

Laird, E. D. (2016). *Characterization of Antibiotic Resistance Profiles of Surface Water Bacteria in an Urbanizing Watershed*.

Linscott, A. J., & Brown, W. J. (2005). Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(3), 1081–1085.

Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G. M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T. M., Kern-Zdanowicz, I., & Luzzaro, F. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *59*(2), 165–174.

Livermore, D. M., & Paterson, D. L. (2006). *Pocket guide to extended-spectrum β-lactamases in resistance*. Current Medicine Group.

Lo, D. S., Shieh, H. H., Ragazzi, S. L. B., Koch, V. H. K., Martinez, M. B., & Gilio, A. E. (2013). Community-acquired urinary tract infection: age and gender-dependent etiology. *Brazilian Journal of Nephrology*, *35*(2), 93–98.

Löhr, I. H., Rettedal, S., Natås, O. B., Naseer, U., Øymar, K., & Sundsfjord, A. (2013). Long-term faecal carriage in infants and intra-household transmission of CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae following a nosocomial outbreak. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*(5), 1043–1048.

Malema, M. S., Abia, A. L. K., Tandlich, R., Zuma, B., Mwenge Kahinda, J.-M., & Ubomba-Jaswa, E. (2018). Antibiotic-resistant pathogenic Escherichia coli isolated from rooftop rainwater-harvesting tanks in the eastern cape, South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(5), 892.

Mangeney, N., Niel, P., Paul, G., Faubert, E., Hue, S., Dupeyron, C., Louarn, F., & Leluan, G. (2000). A 5-year epidemiological study of extended-spectrum ββ-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates in a medium-and long-stay neurological unit. *Journal of Applied Microbiology*, *88*(3), 504–511.

Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Hernández-Allés, S., Alvarez-Díaz, D., Suárez, A. I., Tran, J., Benedí, V. J., & Jacoby, G. A. (1999). Roles of β-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against Klebsiella pneumoniae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *43*(7), 1669–1673.

Matsumoto, Y., Ikeda, F., Kamimura, T., Yokota, Y., & Mine, Y. (1988). Novel plasmid-mediated beta-lactamase from Escherichia coli that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *32*(8), 1243–1246.

Mc Dermott, P. F., Walker, R. D., & White, D. G. (2003). Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *International Journal of Toxicology*, *22*(2), 135–143.

MEDEIROS, A. A. (1984). β-Lactamases. *British Medical Bulletin*, *40*(1), 18–27.

Mehrgan, H., & Rahbar, M. (2008). Prevalence of extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *31*(2), 147–151.

Moghaddam, M. N., Beidokhti, M. H., Jamehdar, S. A., & Ghahraman, M. (2014). Genetic properties of blaCTX-M and blaPER β-lactamase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae by polymerase chain reaction. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *17*(5), 378.

Morosini, M.-I., García-Castillo, M., Coque, T. M., Valverde, A., Novais, A., Loza, E., Baquero, F., & Cantón, R. (2006). Antibiotic coresistance in extended-spectrum-β-lactamase-producing Enterobacteriaceae and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(8), 2695–2699.

Motayo, B. O., Ogiogwa, I. J., Okerentugba, P. O., Innocent-Adiele, H. C., Nwanze, J. C., Onoh, C. C., & Okonko, I. O. (2012). Antimicrobial resistance profile of extra-intestinal Escherichia coli infections in a South Western Nigerian City. *Blood*, *27*, 0–8.

Murray, P. R. (2015). The clinician and the microbiology laboratory. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 191.

Shaker M.M. 2016. Molecular study of quinolone resistance genes in clinical isolates of Escherichia coli in Baghdad province . Middle Technical University , College of Health and Medical Technology/Baghdad. 2016.

Naseer, U., & Sundsfjord, A. (2011). The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and Escherichia coli clones. *Microbial Drug Resistance*, *17*(1), 83–97.

Neamati, F., Firoozeh, F., Saffari, M., & Zibaei, M. (2015). Virulence genes and antimicrobial resistance pattern in uropathogenic Escherichia coli isolated from hospitalized patients in Kashan, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *8*(2).

Niumsup, P. R., Tansawai, U., Na-Udom, A., Jantapalaboon, D., Assawatheptawee, K., Kiddee, A., Romgaew, T., Lamlertthon, S., & Walsh, T. R. (2018). Prevalence and risk factors for intestinal carriage of CTX-M-type ESBLs in Enterobacteriaceae from a Thai community. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *37*(1), 69–75.

Nordmann, P., & Poirel, L. (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection*, *8*(6), 321–331.

Odongo, I., Ssemambo, R., & Kungu, J. M. (2020). Prevalence of Escherichia Coli and its antimicrobial susceptibility profiles among patients with UTI at Mulago Hospital, Kampala, Uganda. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, *2020*.

Oliver, A., Pérez-Díaz, J. C., Coque, T. M., Baquero, F., & Cantón, R. (2001). Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing β-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(2), 616–620.

Olowe, B., Oluyege, J., Famurewa, O., Ogunniran, A., & Adelegan, O. (2017). Molecular identification of Escherichia coli and new emerging enteropathogen, Escherichia fergusonii, from drinking water sources in Ado-Ekiti, Ekiti State, Nigeria. *J. Microbiol. Res*, *7*, 45–54.

Omigie, O., Okoror, L., Umolu, P., & Ikuuh, G. (2009). Increasing resistance to quinolones: A four-year prospective study of urinary tract infection pathogens. *International Journal of General Medicine*, *2*, 171.

Ouellette, M., Paul, G. C., Philippon, A. M., & Roy, P. H. (1988). Oligonucleotide probes (TEM-1, OXA-1) versus isoelectric focusing in beta-lactamase characterization of 114 resistant strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *32*(3), 397–399.

Paltansing, S. (2015). *Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae: characterization and detection*.

Pandit, R., Awal, B., Shrestha, S. S., Joshi, G., Rijal, B. P., & Parajuli, N. P. (2020). Extended-spectrum β-lactamase (ESBL) genotypes among multidrug-resistant uropathogenic Escherichia coli clinical isolates from a teaching hospital of Nepal. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, *2020*.

Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum β-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, *18*(4), 657–686.

Pena, C., Pujol, M., Ricart, A., Ardanuy, C., Ayats, J., Linares, J., Garrigosa, F., Ariza, J., & Gudiol, F. (1997). Risk factors for faecal carriage of Klebsiella pneumoniae producing extended spectrum β-lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, *35*(1), 9–16.

Pessoa-Silva, C. L., Moreira, B. M., Almeida, V. C., Flannery, B., Lins, M. C. A., Sampaio, J. L. M., Teixeira, L. M., Miranda, L. E. V., Riley, L. W., & Gerberding, J. L. (2003). Extended-spectrum β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in a neonatal intensive care unit: risk factors for infection and colonization. *Journal of Hospital Infection*, *53*(3), 198–206.

Philippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type β-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(1), 1–11.

Pitout, J. D. D., & Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, *8*(3), 159–166.

Prabhu, V., Isloor, S., Balu, M., Suryanarayana, V. V. S., & Rathnamma, D. (2010). *Genotyping by ERIC-PCR of Escherichia coli isolated from bovine mastitis cases*.

Preston, K. E., Venezia, R. A., & Stellrecht, K. A. (2004). The SHV-5 extended-spectrum β-lactamase gene of pACM1 is located on the remnant of a compound transposon. *Plasmid*, *51*(1), 48–53.

Queenan, A. M., Foleno, B., Gownley, C., Wira, E., & Bush, K. (2004). Effects of inoculum and β-lactamase activity in AmpC-and extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(1), 269–275.

Rasheed, J. K., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., Steward, C., Hill, B., Medeiros, A. A., & Tenover, F. C. (1997). Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of Escherichia coli during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*(3), 647–653.

Rasmussen, B. A., & Bush, K. (1997). Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*(2), 223.

Revathi, G., Singh, S., & Simrita, S. (1997). Detection of expanded spectrum cephalosporin resistance due to inducible lactamases in hospital isolates. *Indian Journal of Medical Microbiology*, *15*(3), 113.

Rivas, L., Mellor, G. E., Gobius, K., & Fegan, N. (2015). *Detection and typing strategies for pathogenic Escherichia coli*. Springer.

Rodrigo-Troyano, A., & Sibila, O. (2017). The respiratory threat posed by multidrug resistant G ram-negative bacteria. *Respirology*, *22*(7), 1288–1299.

Rodríguez-Baño, J., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Machuca, I., & Pascual, A. (2018). Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(2).

Sabri, T. S., & Kareem, A. A. (2020). Genotyping Diversity of Echerichia coli isolated from UTI in Iraqi Patients. *Medico Legal Update*, *20*(1), 1421–1427.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual, 854 Cold Spring Harbor Laboratory Press. *New York*, *855*.

Sanders, C. C. (1996). In vitro activity of fourth generation cephalosporins against enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)*, *8*, 57–62.

Schiappa, D. A., Hayden, M. K., Matushek, M. G., Hashemi, F. N., Sullivan, J., Smith, K. Y., Miyashiro, D., Quinn, J. P., Weinstein, R. A., & Trenholme, G. M. (1996). Ceftazidime-resistant Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli bloodstream infection: a case-control and molecular epidemiologic investigation. *Journal of Infectious Diseases*, *174*(3), 529–536.

Schwaber, M. J., Navon-Venezia, S., Schwartz, D., & Carmeli, Y. (2005). High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum-β-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(5), 2137–2139.

SAHM, D. F., WEISSFELD, A. & TREVINO, E. 2002. Baily and Scott's diagnostic microbiology. *Mosby, St. Louis*.

Shanthi, B., Selvi, R., & Madhumathy, A. (2018). Antimicrobial susceptibility pattern of Escherichia coli from patients with urinary tract infections in a tertiary care hospital. *Int J Curr Microbiol App Sci*, *7*(01), 289–294.

Shrestha, R., Khanal, S., Poudel, P., Khadayat, K., Ghaju, S., Bhandari, A., Lekhak, S., Pant, N. D., Sharma, M., & Marasini, B. P. (2019). Extended spectrum β-lactamase producing uropathogenic Escherichia coli and the correlation of biofilm with antibiotics resistance in Nepal. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *18*(1), 1–6.

Shrivastava, S. R., Shrivastava, P. S., & Ramasamy, J. (2018). World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Journal of Medical Society*, *32*(1), 76.

Simonsen, G. S., & Urdahl, A. M. (2017). *NORM/NORM-VET 2016-Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*.

Söderlund, R. (2015). *Molecular epidemiology of verotoxigenic Escherichia coli O157: H7* (Vol. 2015, Issue 110).

Soltani, S., Emamie, A. D., Dastranj, M., Farahani, A., Davoodabadi, A., & Mohajeri, P. (2018). Role of toxins of uropathogenic Escherichia coli in development of urinary tract infection. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 1–11.

Spaulding, C. N., Klein, R. D., Ruer, S., Kau, A. L., Schreiber, H. L., Cusumano, Z. T., Dodson, K. W., Pinkner, J. S., Fremont, D. H., & Janetka, J. W. (2017). Selective depletion of uropathogenic E. coli from the gut by a FimH antagonist. *Nature*, *546*(7659), 528–532.

Steward, C. D., Wallace, D., Hubert, S. K., Lawton, R., Fridkin, S. K., Gaynes, R. P., McGowan Jr, J. E., & Tenover, F. C. (2000). Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of project ICARE laboratories. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *38*(1), 59–67.

Stürenburg, E., & Mack, D. (2003). Extended-spectrum β-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *Journal of Infection*, *47*(4), 273–295.

Stürenburg, E., Sobottka, I., Noor, D., Laufs, R., & Mack, D. (2004). Evaluation of a new cefepime–clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum β-lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *54*(1), 134–138.

Tawfiq, S. M. (2004). *Isolation and characterization the bacteria cause urinary tract infection in pediatrics under three years and determination in their resistance toward some modern antibiotic*. M. Sc. thesis. College of Science, University of Al-Mustansirya. Iraq.

Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(3), 207–217.

Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1566.

Thomas, L. (2008). *Genetic methods for Rapid Detection of Medically Important Nosocomial Bactera*. University of Sydney.

Thomson, K. S., & Moland, E. S. (2001). Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(12), 3548–3554.

Tissera, S., & Lee, S. M. (2013). Isolation of extended spectrum β-lactamase (ESBL) producing bacteria from urban surface waters in Malaysia. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, *20*(3), 14.

Ugbo, E. N., Anyamene, C. O., Moses, I. B., Ariom, T. O., Agumah, N. B., Chukwunwejim, C. R., Egbule, C. U., Emioye, A. A., Okata-Nwali, O. D., & Aneke, C. J. (2020). Isolation and molecular characteristics of extended spectrum beta-lactamase-producing uropathogenic Escherichia coli isolated from hospital attendees in Ebonyi State, Abakaliki. *African Journal of Biotechnology*, *19*(11), 829–835.

Wachino, J., Doi, Y., Yamane, K., Shibata, N., Yagi, T., Kubota, T., Ito, H., & Arakawa, Y. (2004). Nosocomial spread of ceftazidime-resistant Klebsiella pneumoniae strains producing a novel class A β-lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(6), 1960–1967.

Wanger, A.; Chavez, V.; Huang, R. S. P.; Wahed, A.; Actor, J. K. and Dasgupta, A. (2017). Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology. Elsevier Inc. All Rights Reserved. 300pp.

Wani, K. A., Thakur, M. A., Fayaz, A. S., Fomdia, B., Gulnaz, B., & Maroof, P. (2009). Extended spectrum B-lactamase mediated resistance in Escherichia coli in a tertiary care hospital. *International Journal of Health Sciences*, *3*(2), 155.

Wayne, P. A. (2010). Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. *CLSI Document M100-S20*.

Weldhagen, G. F., Poirel, L., & Nordmann, P. (2003). Ambler class A extended-spectrum β-lactamases in Pseudomonas aeruginosa: novel developments and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(8), 2385–2392.

Weldhagen, G. F., & Prinsloo, A. (2004). Molecular detection of GES-2 extended spectrum β-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in Pretoria, South Africa. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *24*(1), 35–38.

Wiegand, I., Geiss, H. K., Mack, D., Stürenburg, E., & Seifert, H. (2007). Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(4), 1167–1174.

Wu, T., Siu, L., Su, L., … T. L.-J. of, & 2001, U. (n.d.). Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1 β-lactamases lead to false identification of ESBL-producing Klebsiella pneumoniae. *Academic.Oup.Com*. Retrieved December 22, 2020, from https://academic.oup.com/jac/article-abstract/47/6/755/756184

Yuan, M., Aucken, H., Hall, L. M., Pitt, T. L., & Livermore, D. M. (1998). Epidemiological typing of klebsiellae with extended-spectrum beta-lactamases from European intensive care units. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *41*(5), 527–539.

Zhang, L., & Foxman, B. (2003). Molecular epidemiology of Escherichia coli mediated urinary tract infections. *Front Biosci*, *8*, e235–e244.

Zowawi, H. M., Harris, P. N. A., Roberts, M. J., Tambyah, P. A., Schembri, M. A., Pezzani, M. D., Williamson, D. A., & Paterson, D. L. (2015). The emerging threat of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in urology. *Nature Reviews Urology*, *12*(10), 570.

APPENDIX-1

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed Sep 12, 2020 20:56 CDT

Patient Name: Najlaa farid, .
Location:
Lab ID: 24

Patient ID: Research2
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: Urine **Collected:**

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	4.85 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	95% Probability **Bionumber:**	**Escherichia coli** 0405610574526210		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 8.27 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	<= 2	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Gentamicin	<= 1	S
Piperacillin	>= 128	R	Tobramycin	8	I
Piperacillin/Tazobactam	8	S	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	16	R	Pefloxacin		
Cefepime	>= 64	R	Minocycline	>= 16	R
Aztreonam	>= 64	R	Colistin		
Imipenem	<= 0.25	S	Rifampicin		
Meropenem	<= 0.25	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	<= 20	S

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Inconsistent



Page 1 of 1

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Sep 12, 2020 20:56 CDT

Patient Name: Eman Husien, .
Location:
Lab ID: 23

Patient ID: Research
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: Urine

Collected:

Comments:	

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 8.28 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	<= 2	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	16	S	Gentamicin	<= 1	S
Piperacillin	>= 128	R	Tobramycin	<= 1	S
Piperacillin/Tazobactam	<= 4	S	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	16	R	Pefloxacin		
Cefepime	8	*R	Minocycline	<= 1	S
Aztreonam	>= 64	R	Colistin		
Imipenem	<= 0.25	S	Rifampicin		
Meropenem	<= 0.25	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings		
Confidence:	Consistent	
Phenotypes flagged for review:	BETA-LACTAMS	EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Sep 19, 2020 21:08 CDT

Patient Name: Saadia hasan, .
Location:
Lab ID: 31

Patient ID: Reasearch9
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: Urine

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	5.00 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	95% Probability	**Escherichia coli**		
	Bionumber:	0405610570526210		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 13.05 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	16	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Gentamicin	8	I
Piperacillin	>= 128	R	Tobramycin	>= 16	R
Piperacillin/Tazobactam	64	I	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	>= 64	R	Pefloxacin		
Cefepime	>= 64	R	Minocycline	>= 16	R
Aztreonam	>= 64	R	Colistin		
Imipenem	<= 0.25	S	Rifampicin		
Meropenem	<= 0.25	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings		
Confidence:	Consistent	
Phenotypes flagged for review:	BETA-LACTAMS	EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE
	AMINOGLYCOSIDES	RESISTANT GEN TOB NET AMI



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Sep 19, 2020 21:08 CDT

Patient Name: Hamad awied, .
Location:
Lab ID: 30

Patient ID: Reasearch8
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: Urine

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	4.77 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	97% Probability **Bionumber:**	**Escherichia coli** 0405611570527211		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 8.18 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
ESBL	POS	+	Imipenem	<= 0.25	S
Ampicillin	>= 32	R	Amikacin	<= 2	S
Piperacillin/Tazobactam	<= 4	S	Gentamicin	<= 1	S
Cefazolin	>= 64	R	Ciprofloxacin	>= 4	R
Cefoxitin	16	I	Levofloxacin	>= 8	R
Ceftazidime	16	R	Tigecycline	<= 0.5	S
Ceftriaxone	>= 64	R	Nitrofurantoin	<= 16	S
Cefepime	>= 64	R	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R
Ertapenem	<= 0.5	S			

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings		
Confidence:	Consistent	
Phenotypes flagged for review:	BETA-LACTAMS	EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Sep 19, 2020 21:08 CDT

Patient Name: Walid khalid, .
Location:
Lab ID: 29

Patient ID: Reasearch7
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: Urine

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	4.78 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	94% Probability	**Escherichia coli**		
	Bionumber:	0405610570526210		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 15.03 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	16	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Gentamicin	>= 16	R
Piperacillin	>= 128	R	Tobramycin	>= 16	R
Piperacillin/Tazobactam	64	I	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	>= 64	R	Pefloxacin		
Cefepime	>= 64	R	Minocycline	>= 16	R
Aztreonam	>= 64	R	Colistin		
Imipenem	<= 0.25	S	Rifampicin		
Meropenem	<= 0.25	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings		
Confidence:	Consistent	
Phenotypes flagged for review:	BETA-LACTAMS	EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE
	AMINOGLYCOSIDES	RESISTANT GEN TOB NET AMI



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Sep 19, 2020 21:07 CDT

Patient Name: Wadhiha abied, .
Location:
Lab ID: 28

Patient ID: Research6
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: Urine

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	5.78 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	97% Probability	**Escherichia coli**		
	Bionumber:	0405610570566610		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 9.43 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	4	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	32	I	Gentamicin	>= 16	R
Piperacillin	32	*R	Tobramycin	>= 16	R
Piperacillin/Tazobactam	8	S	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	<= 1	*R	Pefloxacin		
Cefepime	<= 1	*R	Minocycline	4	S
Aztreonam	<= 1	*R	Colistin		
Imipenem	<= 0.25	S	Rifampicin		
Meropenem	<= 0.25	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings		
Confidence:	Consistent	
Phenotypes flagged for review:	BETA-LACTAMS	ESBL (CTX-M LIKE)



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Sep 19, 2020 21:07 CDT

Patient Name: Sajoda ibrahim, .
Location:
Lab ID: 27

Patient ID: Reasearch5
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: Urine

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	9.95 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	90% Probability **Bionumber:**	**Escherichia coli** 0405611550526210		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 11.90 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	16	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Gentamicin	>= 16	R
Piperacillin	>= 128	R	Tobramycin	>= 16	R
Piperacillin/Tazobactam	64	I	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	>= 64	R	Pefloxacin		
Cefepime	>= 64	R	Minocycline	8	I
Aztreonam	>= 64	R	Colistin		
Imipenem	<= 0.25	S	Rifampicin		
Meropenem	<= 0.25	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings		
Confidence:	Consistent	
Phenotypes flagged for review:	BETA-LACTAMS	EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE
	AMINOGLYCOSIDES	RESISTANT GEN TOB NET AMI



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Sep 12, 2020 20:57 CDT

Patient Name: Alharith saad, .
Location:
Lab ID: 26

Patient ID: Research4
Physician:
Isolate Number: 2

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: Urine

Collected:

Comments:	

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 10.20 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	<= 2	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	16	S	Gentamicin	<= 1	S
Piperacillin	>= 128	R	Tobramycin	<= 1	S
Piperacillin/Tazobactam	<= 4	S	Ciprofloxacin	<= 0.25	S
Ceftazidime	<= 1	*R	Pefloxacin		
Cefepime	<= 1	*R	Minocycline	<= 1	S
Aztreonam	<= 1	*R	Colistin		
Imipenem	<= 0.25	S	Rifampicin		
Meropenem	<= 0.25	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	<= 20	S

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings		
Confidence:	Consistent	
Phenotypes flagged for review:	BETA-LACTAMS	ESBL (CTX-M LIKE)



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Sep 19, 2020 21:09 CDT

Patient Name: Awaad jasim, .
Location:
Lab ID: 37

Patient ID: Reasearch15
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: Urine

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	3.92 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	99% Probability **Bionumber:**	**Escherichia coli** 0405610550006610		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 10.50 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	>= 64	R
Ticarcillin/Clavulanic Acid	16	S	Gentamicin	>= 16	R
Piperacillin	>= 128	R	Tobramycin	>= 16	R
Piperacillin/Tazobactam	<= 4	S	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	16	R	Pefloxacin		
Cefepime	8	*R	Minocycline	>= 16	R
Aztreonam	16	R	Colistin		
Imipenem	<= 0.25	S	Rifampicin		
Meropenem	<= 0.25	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings		
Confidence:	Consistent	
Phenotypes flagged for review:	BETA-LACTAMS	EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE
	AMINOGLYCOSIDES	RESISTANT GEN TOB NET AMI



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Sep 19, 2020 21:09 CDT

Patient Name: Rajaa khalil, .
Location:
Lab ID: 36

Patient ID: Reaserch14
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: Urine

Collected:

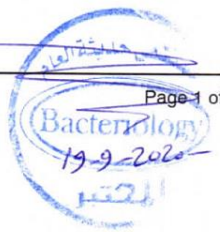
Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	4.92 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	95% Probability **Bionumber:**	**Escherichia coli** 0405610554526200		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 8.08 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	<= 2	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Gentamicin	<= 1	S
Piperacillin	>= 128	R	Tobramycin	8	I
Piperacillin/Tazobactam	>= 128	R	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	>= 64	R	Pefloxacin		
Cefepime	>= 64	R	Minocycline	4	S
Aztreonam	>= 64	R	Colistin		
Imipenem	<= 0.25	S	Rifampicin		
Meropenem	<= 0.25	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	<= 20	S

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Inconsistent



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Sep 19, 2020 21:09 CDT

Patient Name: Duaa yosief, .
Location:
Lab ID: 35

Patient ID: Reasearch13
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: Urine

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	4.77 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	95% Probability	**Escherichia coli**		
	Bionumber:	0405610570526211		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 8.10 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	<= 2	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	16	S	Gentamicin	>= 16	R
Piperacillin	>= 128	R	Tobramycin	8	I
Piperacillin/Tazobactam	<= 4	S	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	4	*R	Pefloxacin		
Cefepime	2	*R	Minocycline	<= 1	S
Aztreonam	16	R	Colistin		
Imipenem	<= 0.25	S	Rifampicin		
Meropenem	<= 0.25	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings		
Confidence:	Consistent	
Phenotypes flagged for review:	BETA-LACTAMS	EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Sep 19, 2020 21:09 CDT

Patient Name: Muhammed laith, .
Location:
Lab ID: 34

Patient ID: Reasearch12
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: Urine

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	4.78 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	98% Probability	**Escherichia coli**		
	Bionumber:	0405611570566211		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 9.17 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	<= 2	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	16	S	Gentamicin	>= 16	R
Piperacillin	>= 128	R	Tobramycin	8	I
Piperacillin/Tazobactam	<= 4	S	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	16	R	Pefloxacin		
Cefepime	>= 64	R	Minocycline	2	S
Aztreonam	>= 64	R	Colistin		
Imipenem	<= 0.25	S	Rifampicin		
Meropenem	<= 0.25	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings		
Confidence:	Consistent	
Phenotypes flagged for review:	BETA-LACTAMS	EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Sep 19, 2020 21:09 CDT

Patient Name: Najaa zughair, .
Location:
Lab ID: 33

Patient ID: Reasearch11
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: Urine

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	4.80 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	95% Probability **Bionumber:**	**Escherichia coli** 0405610440004610		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 16.52 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	<= 2	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Gentamicin	>= 16	R
Piperacillin	>= 128	R	Tobramycin	8	I
Piperacillin/Tazobactam	>= 128	R	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	>= 64	R	Pefloxacin		
Cefepime	>= 64	R	Minocycline	>= 16	R
Aztreonam	>= 64	R	Colistin		
Imipenem	4	R	Rifampicin		
Meropenem	>= 16	R	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings		
Confidence:	Consistent	
Phenotypes flagged for review:	BETA-LACTAMS	IMPERMEABILITY CARBA (+ESBL OR +HL AmpC),CARBAPENEMASE (+ OR - ESBL)



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Sep 19, 2020 21:08 CDT

Patient Name: Naji aied, .
Location:
Lab ID: 32

Patient ID: Reasearch10
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source:

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	5.97 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	97% Probability **Bionumber:**	**Escherichia coli** 0407611540527610		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 8.40 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Ticarcillin	<= 8	S	Amikacin	<= 2	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	<= 8	S	Gentamicin	<= 1	S
Piperacillin	<= 4	S	Tobramycin	<= 1	S
Piperacillin/Tazobactam	<= 4	S	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	<= 1	S	Pefloxacin		
Cefepime	<= 1	S	Minocycline	8	I
Aztreonam	<= 1	S	Colistin		
Imipenem	<= 0.25	S	Rifampicin		
Meropenem	<= 0.25	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Consistent



Appendix 2



Republic Of Iraq
Governorate Of Anbar
Al Anbar Health City
Haditha General Hospital

وزارة الصحة العراقية
Iraqi Ministry of Health
Founded 1920

جمهورية العراق
Republic of Iraq

جمهورية العراق
محافظة الانبار
دائرة صحة الانبار
مديرية مستشفى حديثة العام
العدد / ١٥٦٠
التاريخ / ٢٠٢٠ / ٢ / ٢٤

To \ ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ

S \ Confirmation

We would like to inform you that our hospital does not object to taking samples and taking tests from the patiens for the research project of the student (EESEE ABDULJABBAR SAEED SAEED) accepted by your university for the purpose of completing the master's thesis tagged with (Study on the phenotyping and genotyping of antibiotic resistance properties of the extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *E. coli* isolated from urine samples in Al-anbar province / Iraq.)

الدكتور
حسام حسين علي
معاون مدير المستشفى للشؤون الفنية

الطبيب
أياد غازي مصلح
مدير مستشفى حديثة العام

دائرة صحة الانبار