**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL EĞİTİM ARAŞTIRMA HASTANESİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI**

# İDRAR KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Escherichia coli* İZOLATLARINDA TOLERANS VARLIĞININ İNCELENMESİ

**Dr. Ecem Büyükyanbolu**







**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL EĞİTİM ARAŞTIRMA HASTANESİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI**

# İDRAR KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Escherichia coli* İZOLATLARINDA TOLERANS VARLIĞININ İNCELENMESİ

**Dr. Ecem Büyükyanbolu**

**Tez Danışmanları**

**Prof. Dr. Elif Aktaş Sepetci**

**Uzm. Dr. Murat Öcal**

**(TIPTA UZMANLIK TEZİ)**

İstanbul/2024

## TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince tecrübeleri ve bilgi birikimiyle bana ışık tutan, tez konumun belirlenmesinden tezin son aşamasına gelene kadar bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Elif Aktaş Sepetci'ye, tez sürecim boyunca yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Murat Öcal'a, eğitim sürecim boyunca, bilgi ve tecrübelerini aktararak yetişmemde emeği geçen değerli hocam Prof. Dr. Banu Bayraktar'a, uzmanlık eğitimi süresince yapmış oldukları katkılarından dolayı Doç. Dr. Mehmet Emin Bulut'a, Doç. Dr. Ayşe Barış'a, Uzm. Dr. Süleyman Pelit'e, Uzm. Dr. Leyla Genç'e ve Uzm. Dr. Hanife Tutan'a, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım asistan arkadaşlarıma, laboratuvarımızın tüm teknisyenlerine, personellerine ve sekreterlerine, hayatımın her döneminde desteklerini ve sevgilerini hissettiğim aileme, çalışmalarım sırasında hep yanımda olan sevgili eşim Burak Büyükyanbolu ve canım oğlum Batu Büyükyanbolu'ya çok teşekkür ederim.

Ecem Büyükyanbolu

## İçindekiler

**SİMGELER VE KISALTMALAR** ..... iv
**TABLOLAR** ..... v
**ŞEKİLLER** ..... vi
**ÖZET** ..... viii
**ABSTRACT** ..... xi
**1. GİRİŞ VE AMAÇ** ..... 1
**2. GENEL BİLGİLER** ..... 3
**2.1. *Escherichia coli*** ..... 3
**2.2. *E. coli* Enfeksiyonları** ..... 3
**2.3. Üriner Sistem Enfeksiyonları** ..... 4
**2.4. Üriner Sistem Enfeksiyonlarında Relaps/Rekürrens** ..... 5
**2.5. *E. coli* İzolatlarında Antimikrobiyal Direnç** ..... 6
**2.6. Tolerans** ..... 7
**2.6.1. Yavaş Üremeye Bağlı Tolerans** ..... 8
**2.6.2. Lag Fazının Uzamasına Bağlı Tolerans** ..... 9
**2.7. Persistans** ..... 11
**2.7.1. Zamana Bağlı Persistans** ..... 11
**2.7.2. Doza Bağlı Persistans** ..... 12
**2.8. Tolerans Direnç İlişkisi** ..... 12
**2.9. Tolerans ile İlişkili Genler** ..... 13
**2.10. Anti-Persister Tedaviler** ..... 16
**2.11. Toleransın Saptanmasında Kullanılan Yöntemler** ..... 17
**2.11.1. MBK / MİK Oranının Belirlenmesi** ..... 17
**2.11.2. Zamana Bağlı Öldürme Yöntemi** ..... 17
**2.11.3. Tolerans Disk Testi (TD test) Yöntemi** ..... 18
**2.11.4. Otomatize Laboratuvar Sistemi** ..... 18
**3. GEREÇ YÖNTEM** ..... 19
**3.1. Bakteriyel İzolatlar** ..... 19
**3.2. Bakteri Tanımlaması ve Duyarlılık Testleri** ..... 19
**3.3. Ertapenem MİK Belirlenmesi** ..... 20
**3.4. TD Test ile Tolerans Saptanması** ..... 20
**3.5. Zamana Bağlı Öldürme Yöntemi** ..... 21
**3.6. Otomatize Sistem (WaspLab) ile Tolerans Tayini** ..... 24
**3.7. İstatistik** ..... 25

**4. BULGULAR** ..... 26
**4.1. Araştırma Popülasyonunun Demografik Özellikleri** ..... 26
**4.2. Antibakteriyel Duyarlılık Test Sonuçları** ..... 27
**4.3. TD Test Sonuçları** ..... 28
**4.4. Toleran ve Toleran Olmayan İzolatlarda Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması** ..... 28
**4.5. Ertapenem MİK Sonuçları** ..... 30
**4.6. Toleran ve Toleran Olmayan İzolatlar ile Enfekte Hasta Özelliklerinin Karşılaştırması** ..... 30
**4.7. Zamana Bağlı Öldürme Yöntemi Sonuçları** ..... 31
**4.8. Otomatize Sistem (WaspLab) ile Tolerans Tayini Sonuçları** ..... 33
**5. TARTIŞMA** ..... 33
**6. SONUÇ** ..... 38
**KAYNAKLAR** ..... 39
**ÖZGEÇMİŞ** ..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
**EKLER** ..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
**EK 1** ..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

# SİMGELER VE KISALTMALAR

**ECDC:** European Centre for Disease Prevention and Control

**EUCAST:** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**GSBL:** Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz

**MALDI-TOF MS:** Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

**MBK:** Minimum Bakterisidal Konsantrasyon

**MDK:** Minimum Duration for Killing

**MİK:** Minimum İnhibitör Konsantrasyon

**TA:** Toksin-Antitoksin

**TD test:** Tolerans Disk test

**ÜSE:** Üriner Sistem Enfeksiyonu

**WHO:** World Health Organization

# TABLOLAR

Tablo 1. Toleran ve Toleran Olmayan İzolatlarda Antimikrobiyal Direnç Oranları……...……..29

Tablo 2. Toleran ve Toleran Olmayan *E. coli* Kaynaklı Üriner Sistem Enfeksiyonu Olan Hastaların ve İzolatların Özellikleri……...…..……31

# ŞEKİLLER

Şekil 1. Direnç, tolerans ve persistansın zamana bağlı öldürme grafiğinde karakteristik görünümü…….....8

Şekil 2. Bakteri üreme fazları...……....10

Şekil 3. Tolerans ile direnç ilişkisinin şematik gösterimi…….…13

Şekil 4. Tedavi sonrasında persister hücre oluşumu şematik gösterimi……...……14

Şekil 5. TD test uygulama ve değerlendirme basamakları……...21

Şekil 6. Zamana bağlı öldürme yöntemi için inokülum hazırlanması……...…….23

Şekil 7. Zamana bağlı öldürme yönteminde inokülasyon sonrası dilüsyon şeması……..…..24

Şekil 8. Zamana bağlı öldürme yöntemi inokülasyon sonrası dilüsyon tüpleri…….……...…24

Şekil 9. Çalışmaya alınan hastaların yaş dağılımı…….……..…..26

Şekil 10. Çalışmaya alınan hastaların polikliniklere göre dağılımı……..….……..27

Şekil 11. Çalışmaya alınan hastaların servislere göre dağılımı……...…….27

Şekil 12. Temsili izolatlarda TD test 1. ve 2. adım fotoğrafları……...….28

Şekil 13. Toleran ve toleran olmayan izolatlarda ertapenem MİK dağılımı……...…..30

Şekil 14. Toleran olmayan MGY sokak tipi *E. coli* suşuna ait zamana bağlı öldürme grafiği ve $log_{10}$ tabanlı koloni sayımı…….……..……...…..32

Şekil 15. Toleran tbl3a *E. coli* suşuna ait zamana bağlı öldürme grafiği ve $log_{10}$ tabanlı koloni sayımı…….…....32

**İDRAR KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Escherichia coli* İZOLATLARINDA TOLERANS VARLIĞININ İNCELENMESİ**

# ÖZET

**Amaç:** Antibiyotik direncinin gittikçe daha önemli bir sorun haline geldiği günümüzde, antimikrobiyallerin etkinliğini sınırlayan tolerans kavramı da önem kazanmıştır. Tolerans, bakterilerin geçici bir süre yüksek konsantrasyonda bakterisidal antibiyotiğe maruziyeti sonrasında, o antibiyotiğe karşı minimum inhibitör konsantrasyonunda (MİK) bir değişiklik olmaksızın hayatta kalma yeteneği olarak tanımlanır. Araştırmamızda, idrar kültürlerinden elde edilen ertapenem duyarlı *E. coli* izolatlarında antibiyotik toleransı varlığının tespiti amaçlanmıştır. Ayrıca toleran olan ve toleran olmayan izolatlar arasında ertapenem MİK değerleri, diğer antibiyotiklere direnç oranları, hasta yaş grupları arasında tolerans varlığının dağılımı, çalışmaya dahil edilen hastaların demografik özellikleri ve relaps/rekürrens varlığı karşılaştırılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu araştırma tek merkezli prospektif bir çalışma olarak tasarlanmıştır. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ağustos 2021-Mayıs 2022 tarihleri arasında idrar örneklerinden izole edilen ve saklanan, ertapenem duyarlı genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreticisi 350 *E. coli* izolatı değerlendirmeye alınmıştır. Rutin tanımlama işlemleri, matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı (MALDI-TOF) teknolojisini kullanan VITEK® MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ile gerçekleştirilmiştir. İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları, tam otomatize VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) sistemi veya Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Ertapenem MİK saptanması için E-test (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) uygulanmıştır. Duyarlılık testleri, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (EUCAST) kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Tolerans tayini için tolerans disk testi (TD test) yöntemi uygulanmıştır. Temsili seçilen altı izolat zamana bağlı öldürme yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların, örnek gönderim tarihinin bir yıl öncesi ve sonrasında aynı bakteri ile enfekte olup olmadığına bakılarak relaps/rekürrens varlığı hastane bilgi yönetim sistemi verilerinden alınmıştır. Toleran olan ve toleran olmayan izolatların ertapenem MİK

değerleri, diğer antibiyotiklere direnç oranları, hastalardaki relaps/rekürrens oranları, hasta yaş grupları arasında tolerans varlığının dağılımı, hastalara ait demografik veriler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde, sayısal değişken için ortalama, standart sapma, minimum, maksimum, median olarak verilmiştir. Bağımsız iki grup karşılaştırması Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. Gruplarda oranlar ki kare testi ile karşılaştırılmış, alfa anlamlılık seviyesi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

**Bulgular:** Ertapeneme duyarlı 350 *E. coli* izolatından 57'si (%16,2) TD testi ile toleran olarak değerlendirilmiştir. Tüm izolatlarda duyarlılık test sonuçlarına göre saptanan direnç oranları; amikasine %6,3, amoksisilin-klavulonata %72, ampisiline %99,1, ampisilin-sulbaktama %63, sefepime %40,3, sefiksime %96,2, seftazidime %79,8, seftriaksona %87,4, sefuroksime %98,3, siprofloksasine %64, fosfomisine %17, gentamisine %24, nitrofurantoine %5, piperasilin-tazobaktama %27,9, trimetoprim-sulfametoksazole %51,6 olarak tespit edilmiştir. İzolatlarda imipenem, meropenem ve kolistine direnç saptanmamıştır. TD testi sonucu toleran saptanan izolatların MİK50/MİK90 değeri 0,032/0,125, toleran saptanmayan izolatların MİK50/MİK90 değeri 0,016/0,094 olarak bulunmuştur. Toleran izolatların toleran olmayan izolatlara kıyasla ertapenem MİK değerleri ortalaması ($p$=0,004) ile sefepim ($p$=0,024) ve seftazidime ($p$=0,047) direnç oranları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Zamana bağlı öldürme yöntemi ile değerlendirilen izolatların sonuçları TD test sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Toleran ve toleran olmayan izolatlar ile enfekte olan hastalar arasında cinsiyet, örneğin gönderildiği birim, relaps/rekürrens varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

**Sonuç:** Bu çalışmada, idrar kültürlerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında önemli oranda tolerans varlığı tespit edilmiştir. Toleran olan izolatlarda diğer antibiyotiklere direnç oranlarının ve ertapenem MİK değerlerinin daha yüksek bulunması, toleransın direnç gelişimi için önemli bir faktör olabileceğini düşündürmektedir. *E. coli*'de karbapenem direnci henüz yüksek olmamakla birlikte, toleran izolatların varlığı direncin yakından izlenmesi gerektiğine işaret etmektedir. Toleran izolatlar ile oluşan enfeksiyonlarda tedavi başarısı ve relaps oranlarının incelenmesi ve tedavi başarısızlığının altında yatan mekanizmaların anlaşılması, terapötik yaklaşımların optimize edilmesi açısından faydalı olacaktır.

Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, Türkiye'den *E. coli* izolatlarında tolerans varlığını ve oranını belirleyen ilk çalışmadır, ancak toleransın yaygınlığını ve tedavi üzerindeki etkisini daha iyi anlamak için farklı coğrafi bölgeleri ve daha büyük kohortları içeren çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** *E. coli*, tolerans, ertapenem, TD test, üriner sistem enfeksiyonu, relaps/rekürrens

**INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF TOLERANCE IN *Escherichia coli* ISOLATES ISOLATED FROM URINE CULTURES**

## ABSTRACT

**Aim:** As antibiotic resistance has become an increasingly important problem, the concept of tolerance, which limits the efficacy of antimicrobial agents, has gained importance. Tolerance is defined as the ability of bacteria to survive transient exposure to a high concentration of a bactericidal antibiotic without a change in the minimum inhibitory concentration (MIC) to that antibiotic. In our study, we aimed to determine the presence of antibiotic susceptibility in ertapenem-susceptible *E. coli* isolates obtained from urine cultures. In addition, ertapenem MIC values, resistance rates to other antibiotics, distribution of the presence of tolerance among patient age groups, demographic characteristics of the patients included in the study, and the presence of relapse/recurrence were compared between tolerant and non-tolerant isolates.

**Materials and Methods:** This study was designed as a single-center prospective study. A total of 350 ertapenem-susceptible extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli* isolates isolated from urine specimens and stored in the Medical Microbiology Laboratory of Şişli Hamidiye Etfal Training and Research Hospital, University of Health Sciences, between August 2021-May 2022 were included in the evaluation. Routine identification was performed by VITEK® 2 MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) using matrix-mediated laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) technology. Antimicrobial susceptibilities of isolates were determined using a fully automated VITEK® 2 Compact system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) or the Kirby-Bauer disk diffusion method. The ertapenem MIC was determined using the E-Test (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Susceptibility tests were evaluated according to the criteria of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). The tolerance disk (TD) test method was used to determine susceptibility. Six representative isolates were evaluated using the time-dependent killing method. Whether the patients included in the study were infected with the same bacteria one year before and after the date of sample submission and the presence of relapse/recurrence were obtained from the Hospital Information Management

System data. The ertapenem MIC values of tolerant and non-tolerant isolates, resistance rates to other antibiotics, relapse/recurrence rates in patients, distribution of the presence of resistance among patient age groups, and patient demographics were compared statistically. Descriptive statistics were presented as counts and percentages for categorical variables and as mean, standard deviation, minimum, maximum, and median for numerical variables. Two independent group comparisons were made using the Mann-Whitney U test. The proportions in the groups were compared with chi-squared test, and the alpha significance level was accepted as $p<0.05$.

**Results:** Among 350 *E. coli* isolates susceptible to ertapenem, 57 (16.2%) were found to be tolerant by TD test. According to the susceptibility test results, the resistance rates of all isolates were 6.3% to amikacin, 72% to amoxicillin-clavulonate, 99.1% to ampicillin, 63% to ampicillin-sulbactam, 40.3% to cefepime, 96. 2% to cefixime and 79% to ceftazidime, 8%, 87.4% to ceftriaxone, 98.3% to cefuroxime, 64% to ciprofloxacin, 17% to fosfomycin, 24% to gentamicin, 5% to nitrofurantoin, 27.9% to piperacillin-tazobactam and 51.6% to trimethoprim-sulfamethoxazole. Resistance to imipenem, meropenem and colistin was not detected in the isolates. The MIC50/MIC90 values of the isolates with positive TD test results were 0.032/0.125 and the MIC50/MIC90 values of the isolates with negative results were 0.016/0.094. The mean MIC values of ertapenem ($p$=0.004), cefepime ($p$=0.024) and ceftazidime ($p$=0.047) resistance rates of tolerant isolates were statistically significantly higher compared to non-tolerant isolates. The results of isolates evaluated by the time-dependent killing method were found to be compatible with the results of the TD test. There was no statistically significant difference between patients infected with tolerant and non-tolerant isolates in terms of gender, unit to which sample was sent, and presence of relapse/recurrence.

**Conclusion:** In this study, a significant proportion of *E. coli* isolates from urine cultures were found to be tolerant. The higher rates of resistance to other antibiotics and the higher ertapenem MIC values in tolerant isolates suggest that tolerance may be an important factor in resistance development. Although carbapenem resistance in *E. coli* is not yet high, the presence of tolerant isolates indicates that resistance should be closely monitored. Investigating treatment success and relapse rates in

infections with tolerant isolates and understanding the mechanisms underlying treatment failure will be useful in optimizing therapeutic approaches.

To our knowledge, this is the first study to determine the presence and rate of tolerance in *E. coli* isolates from Turkey, but multicenter studies involving different geographic regions and larger cohorts are needed to better understand the prevalence of tolerance and its impact on treatment.

**Keywords:** *E. coli*, tolerance, ertapenem, TD test, urinary tract infection, relapse/recurrence

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antimikrobiyal direnç, dünya çapında hızla artış göstererek halk sağlığı için ciddi bir tehdit haline gelmiştir. Antimikrobiyallere karşı direnç kazanmış bakterilerin yayılması, tedavisi zor enfeksiyonlara yol açabilmektedir, aynı zamanda enfeksiyonların bulaşma riskinde artışa, daha uzun hastanede yatış sürelerine, yüksek sosyal ve ekonomik maliyetlere ve artmış ölüm oranlarına sebep olabilmektedir (1). Artan antibiyotik direnç oranları, antibiyotik yönetimi ilkelerinin doğru uygulanmasını ve dolayısıyla antibiyotiklerin akılcı kullanılmasını gerektirmektedir (2, 3).

Tolerans, bakterilerin yüksek konsantrasyonlarda bakterisidal antibiyotiğe geçici olarak maruz kaldıklarında, MİK'te değişiklik olmaksızın hayatta kalma yeteneğidir (4, 5). Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında genellikle gözden kaçan, klinik olarak önemli bir durumdur. Disk difüzyon testleri ve MİK saptanmasına yönelik testler gibi rutin antibiyotik duyarlılık testleri, bir izolatın değerlendirilen antibiyotiğe duyarlı olup olmadığını ya da üremesini önleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonunu belirler. Ancak bu testler, bakterisidal antibiyotiklere maruziyetten sonra canlı kalan toleran suşları tespit edemez. Toleran bakteriler, antibiyotik ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra tekrar üremeye başlar. Disk difüzyon ve MİK testlerinde ise ortamda antibiyotik varlığı devam ettiği için, toleran bakterilerin üremeye devam edip edemeyeceği değerlendirilememektedir. Bu nedenle toleran suşların tespitinde bu yöntemler kullanılamamaktadır (6). Toleran suşların varlığında, disk difüzyon testinde duyarlı bulunan antibiyotiğin tedavide kullanımı bakterinin eliminasyonunda yeterli olamayacağı için gereksiz antibiyotik kullanımına ve uygulanan ardışık dozlar ile direnç gelişmesine neden olabilir. Bu nedenle laboratuvarlarda antibiyotik duyarlılık sonucu bildirilirken olası tolerans varlığının da akılda tutulması gerekmektedir (7, 8).

Son çalışmalar, tolerans ya da persistans ile antibiyotik direnci arasında bir bağlantı olduğuna işaret etmektedir (4). Toleransın, relaps/rekürrenslere ve antibiyotik direnci gelişimine neden olabileceği çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu durum kronik ve tekrarlayan enfeksiyonların daha sık görülmesinin yanı sıra

muhtemelen antibiyotik direncinin ortaya çıkması ve yayılmasında da artışa yol açacaktır (9, 10).

Tolerans tespiti için Gefen ve arkadaşları disk difüzyon testine benzer bir yöntem olan TD test yöntemini geliştirmişlerdir. Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi uygulandığında, antibiyotik konsantrasyonu yaklaşık 12 saat sonra MİK değerinin altına düşmektedir. Bu noktada, inhibisyon zonu içinde hayatta kalan toleran bakteriler, zon dışındaki bakteriler tarafından tüketilen besinler nedeniyle üreyemezler. Ancak antibiyotik diskine eklenen glikoz ile, toleran bakteriler üreyerek zon içerisinde koloni oluştururlar. TD test ile tolerans tespiti, klinik laboratuvarlarda kolay uygulanabilir görünmektedir (11).

Türkiye'de ve dünya genelinde klinik örneklerden izole edilmiş izolatlarda toleransı saptamaya yönelik araştırmalar kısıtlıdır. Ancak literatürdeki mevcut veriler, üriner sistem enfeksiyonlarında etken olan ve ertapeneme duyarlı *E. coli* izolatlarının tolerans sergileyebileceğine işaret etmektedir (12).

Araştırmamızda, idrar kültürlerinden elde edilen ertapenem duyarlı *E. coli* izolatlarında TD test ile antibiyotik toleransı varlığı tespiti amaçlanmıştır. Ayrıca toleran olan ve toleran olmayan izolatlar arasında ertapenem MİK değerleri, diğer antibiyotiklere direnç oranları, hasta yaş grupları arasında tolerans varlığının dağılımı, çalışmaya dahil edilen hastaların demografik özellikleri, relaps/rekürrens varlığı karşılaştırılarak, tolerans varlığının direnç gelişimi üzerine olabilecek etkisi ve laboratuvar otomatize sisteminde (Wasplab) üremenin saatlik çekim ile izlenmesinin toleransı saptamaya yönelik katkısı değerlendirilmiştir.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*), hareketli, 37°C'de aerobik koşullarda inkübe edildiğinde seçici ve seçici olmayan besiyerlerinde 1-2 mm çapında genellikle S koloniler (kapsüllü olanlar M koloniler) oluşturarak üreyen *Enterobacterales* takımı *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunan gram negatif basildir. *E. coli*, filogenetik açıdan A, B1, B2 ve D olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. *E. coli*'nin neden olduğu enfeksiyonlar, intestinal ve ekstraintestinal enfeksiyonlar olarak ikiye ayrılır. En sık görülen ve en virülan özellikteki ekstraintestinal *E. coli* suşları, filogenetik grup B2'de yer alır. Ekstraintestinal enfeksiyonlar sırasında daha az virülans sergileyen *E. coli* suşları, filogenetik grup D'ye aittir. *E. coli*'nin çeşitli kommensal suşları A ve B1 gruplarında yer alır. İntestinal patojenler enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Vero veya Shiga-toksin üreten *E. coli* (VTEC veya STEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve diffüz aderant *E. coli* (DAEC)'dir (13).

## 2.2. *E. coli* Enfeksiyonları

Bağırsak florasının doğal bir üyesi olan *E. coli*, fırsatçı patojen olarak enfeksiyon etkeni olabilmektedir. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler ya da cerrahi girişim geçiren hastalar risk altındadır. Bu popülasyonlarda, *E. coli* kolaylıkla yayılarak üriner sistem, solunum sistemi, kan dolaşımı enfeksiyonları gibi ciddi enfeksiyonlara sebep olabilmektedir (14). Ayrıca *E. coli* ile kontamine gıda ve suyun tüketimi veya doğrudan teması ile de enfeksiyon gelişebilmektedir (15).

*Escherichia coli*'nin sebep olduğu enfeksiyonlar, lokalizasyonlarına göre intestinal ve ekstraintestinal enfeksiyonlar şeklinde sınıflandırılır. Üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE), pnömoni, akut kolesistit, peritonit, deri-yumuşak doku enfeksiyonları, neonatal menenjit ile kemik ve eklem enfeksiyonları sık görülen ekstraintestinal enfeksiyonlardır (16, 17).

Üropatojenik *E. coli* suşları, hem toplum kökenli ÜSE'lerin büyük çoğunluğundan, hem de hastane kaynaklı ÜSE'lerin yaklaşık yarısından sorumludur. Üropatojenik *E. coli* suşları, P fimbria, hemolizin, kapsül ve demir

alım mekanizmaları gibi çeşitli virülans faktörlerine sahiptir. İdrar yollarındaki epitel hücrelerine tutunabilme ve kolonize olabilme yeteneği, bu bakterinin üriner sistem enfeksiyonu oluşturması için kritik öneme sahiptir (14, 18).

### 2.3. Üriner Sistem Enfeksiyonları

Üriner sistem enfeksiyonları, toplum ve hastane kaynaklı en sık görülen bakteriyel enfeksiyonlar arasındadır (19). Anatomik veya işlevsel anormallikleri olmayan bireylerde, ÜSE'ler genellikle kendi kendini sınırlayan ancak tekrarlama eğilimi olan enfeksiyonlardır. Bu nedenle ÜSE'ler küresel olarak bireyler ve sağlık kaynakları üzerinde önemli bir ekonomik yük oluşturmaktadır (20). Küresel Hastalık Yükü Çalışması 2019'dan elde edilen veriler, 1990'dan 2019'a kadar, bölge ve ülkelere göre ÜSE insidansı ve mortalite ile ilişkisini araştırmak için kullanılmıştır. Küresel olarak, 2019 yılında ÜSE'lerle ilişkili tahmini 405 milyon olgu ve 237.000 ölüm bildirilmiştir. Aynı çalışmada ÜSE'lerin insidansının 1990'da 100.000 nüfus başına 4.715 kişiden, 2019'da 100.000'de 5.229'a yükseldiği ve ÜSE'lere bağlı ölüm sayısının 1990'da yaklaşık 99.000 iken 2019'da 237.000'e çıktığı gösterilmektedir. (21).

Toplum kökenli komplike olmayan ÜSE, özellikle kadınlarda sık görülmektedir. Yapılan araştırmalar, kadınların yaklaşık %25-40'ının hayatlarının herhangi bir döneminde en az bir semptomatik ÜSE atağı geçirdiğini göstermektedir. Erkeklerde bu oran, daha düşüktür ve yaklaşık %1 civarındadır. ÜSE geçiren kadınların önemli bir kısmı (%27-48) tekrarlayan enfeksiyonlar yaşamaktadır (19).

Üriner sistem enfeksiyonlarına sıklıkla gram negatif bakteriler neden olmaktadır. En sık rastlanan etken ise üropatojenik *E. coli* (UPEC) suşlarıdır. UPEC'in komplike olmayan ÜSE'lerin yaklaşık %80'inden, toplum kökenli ÜSE'lerin %95'inden ve hastane kaynaklı ÜSE'lerin ise %50'sinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (22). Türkiye'de yapılan çalışmalara göre, sağlık hizmeti ile ilişkili ÜSE'lerin büyük çoğunluğunda (%74,1) etken *Enterobacterales* takımı içerisinde yer alan bakterilerdir. Bu grup içinde ise en sık rastlanan etken %33,4 oranı ile *E. coli*'dir (23, 24).

Avrupa Üroloji Derneği, ÜSE'lerin ampirik tedavisinde birinci basamak reçete edilecek ilaçlar olarak fosfomisin, pivmecillinam ve nitrofurantoini

önermekte, ayrıca lokal direncin %20'nin altında olması durumunda trimetoprim-sulfametoksazol ve sefalosporinlerin de tedavi rejiminde alternatif olabileceğini belirtmektedir. Komplike olmayan piyelonefritin tedavisinde lokal direnç oranlarının %10'nun altında olduğu durumda oral tedavide kinolonların kullanılması önerildiğinden başarılı ampirik tedavi için ülkemizdeki antibiyotik duyarlılık sonuçlarının belirli aralıklarla gözden geçirilmesi önemlidir (25).

### 2.4. Üriner Sistem Enfeksiyonlarında Relaps/Rekürrens

Üriner sistem enfeksiyonlarında tedavi sonlandırıldıktan sonraki haftalarda relaps görülebilmektedir. Relaps, tedavi sırasında enfeksiyona neden olan mikroorganizmanın idrar yollarında kalmaya devam ettiğine işaret etmektedir. İdrar yollarından tamamen elimine edilse dahi enfeksiyona neden olan mikroorganizma periüretral bölge, vajina veya bağırsakta hala bulunabilir ve sonrasında relapsa yol açabilir (16). Relaps, bir ÜSE atağı tedavi edildikten sonra kısa süre içerisinde aynı etkenle tekrar ÜSE bulgularının gelişmesi olarak tanımlanmıştır. ÜSE rekürrensi ise, komplike olmayan ve/veya komplike ÜSE ataklarının aynı veya farklı mikroorganizma ile yılda en az üç kez veya son altı ay içerisinde iki kez görülmesi olarak tanımlanmaktadır (26).

Üriner sistemin anatomik bozuklukları, enfeksiyon relapsı ve rekürrensleri için zemin hazırlamaktadır. Obstrüksiyon varlığında, ÜSE'lerin, böbrek fonksiyon bozukluğu ve bakteriyemi geliştirme olasılığı artmaktadır. Taş varlığı da ÜSE tekrarlarının sık görülen bir nedenidir. Tedavinin nihai başarısı, taşların çıkarılması ile doğrudan ilişki göstermektedir. Bazı olgularda, ürolojik anomalilerin cerrahi olarak düzeltilmesine rağmen relaps gözlenebilmekte, uzun süreli antibiyotik tedavisi gerektirebilmektedir. Uzun süreli antibiyotik kullanımında amaç, tedavi boyunca bakteriürinin devamlı baskılanmasıdır (16, 27).

Antibiyotiklere direnç gelişimi görülmeden relapsların oluşmasını ve oluşan enfeksiyonlarda antibiyotik tedavisine yanıt alınamamasını açıklamak için birçok farklı model önerilmiştir. Bu modeller arasında küçük koloni varyantları, persistans, tolerans, çevresel olarak tetiklenen antibiyotik direnci ve biyofilm oluşumu gibi mekanizmalar yer almaktadır. Bu çok çeşitli modeller ışığında, relapsların oluşumunun ve tedavisinin zorluğunun arkasında tek bir mekanizma yerine birçok farklı mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir (28–30). Antibiyotik toleransı,

bu mekanizmalar arasında önemli bir yere sahiptir. Toleransın relaps/rekürrense yol açtığına ve antibiyotik direnci gelişimine neden olabileceği bazı çalışmalar ile desteklenmiştir (9, 10).

### 2.5. *E. coli* İzolatlarında Antimikrobiyal Direnç

Antibiyotiklerin geniş spektrumlu ve kontrolsüz reçete edilmesi, mikroorganizmaların bu ilaçlara karşı direnç geliştirmelerine neden olmaktadır. Artan antibiyotik direnci ise halk sağlığı açısından giderek büyüyen bir sorun teşkil etmektedir (17).

Antimikrobiyal direnç, çeşitli mekanizmalarla ortaya çıkabilir. *E. coli* izolatlarında en önemli direnç mekanizması, beta-laktam grubu antibiyotikleri inaktive edebilmelerini sağlayan beta-laktamaz enzim üretimidir. Özellikle genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), *E. coli*'nin etken olduğu enfeksiyonlarda klinik olarak ciddi sorunlar oluşturur ve tedavi yönetimini zorlaştırır. GSBL'ler, sefuroksim, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler ve aztreonam gibi oksimino-β-laktamları, ayrıca penisilin ve diğer sefalosporinleri hidrolize edebilen, ancak karbapenemler ve sefamisinleri etkilemeyen enzimlerdir (31, 32).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten suşlar, 1983 yılından itibaren dünya genelinde tespit edilmektedir. Bu yayılım, klonal çoğalma, GSBL genlerinin plazmidler ile aktarılması ve nadir durumlarda yeni enzimlerin ortaya çıkmasıyla gerçekleşir. En sık görülen GSBL'ler arasında TEM (Temoneira), SHV (Sulfhydryl Variable), CTX-M (Cefotaximase-Munich) gibi enzimler bulunur. Bunların yanı sıra BEL-1 (Belçika GSBL), BES-1 (Brezilya GSBL), SFO-1 (*Serratia fonticola*), TLA-1 (Tlahuicas), TLA-2, PER (*Pseudomonas* Genişletilmiş Direnç) ve VEB (Vietnam GSBL) gibi daha az yaygın GSBL'ler de mevcuttur (33, 34).

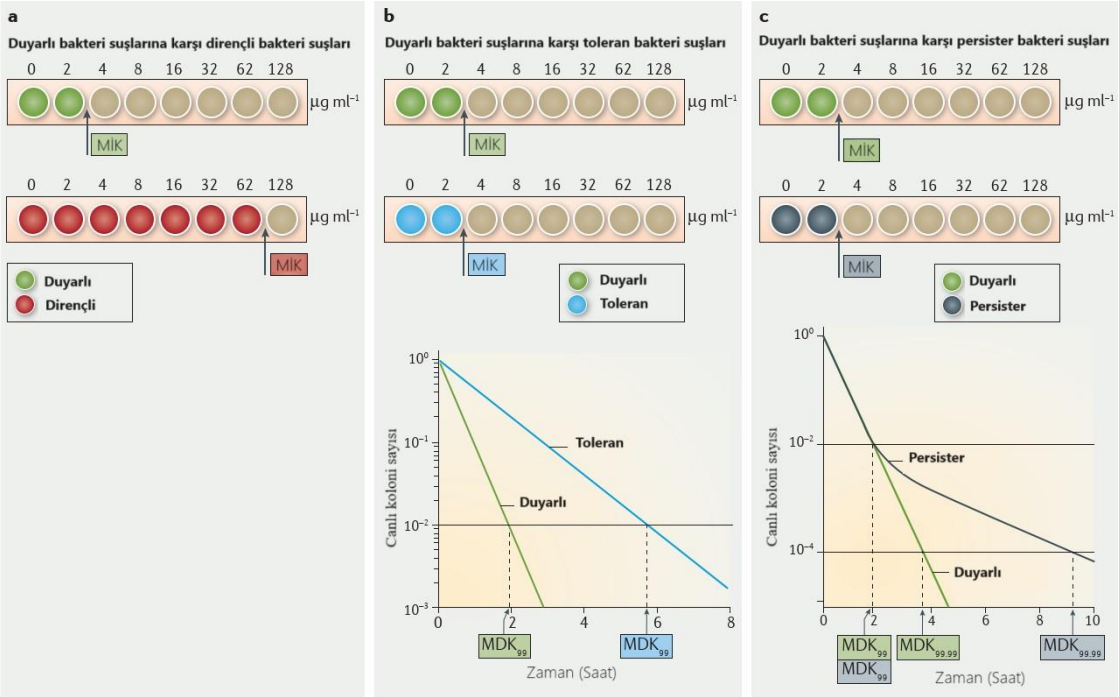
*Escherichia coli*'lerde karbapenem direnci karbapenemaz üretiminin yanında, porin kaybı veya dışa atım pompası (efflux) görevi gören proteinlerin aşırı üretimi sonucunda gelişebilmektedir. Karbapenemazların çoğu, plazmidler üzerindeki transpoze olabilen elemanlar tarafından kodlanan, kazanılmış enzimlerdir. Karbapenemazlar, çeşitli düzeylerde eksprese edilebilir. Ayrıca gerek biyokimyasal özellikleri gerekse etkiledikleri beta-laktam spektrumu açısından birbirlerinden farklı olabilmektedirler. Karbapenemaz üreten izolatlarda üretilen

karbapenemazın ekspresyon düzeyi, beta-laktamazın özellikleri ve diğer direnç mekanizmalarının varlığı (diğer beta-laktamazlar, aktif pompa, geçirgenlik değişimleri) farklı direnç fenotiplerine yol açabilmektedir. *E. coli* izolatlarında daha yaygın olarak NDM (New Delhi Metallo-betalactamase) ve OXA-48 benzeri karbapenemazlar görülmektedir (33). ECDC/WHO verilerinin yer aldığı Avrupa'da Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı 2023 Raporu'na göre Avrupa bölge ülkelerinde invaziv *E. coli* izolatlarında üçüncü kuşak sefalosporin direnci %13,8, florokinolon direnci %21,9, aminoglikozid direnci %9,6 ve karbapenem direnci %0,2 iken, Türkiye'de üçüncü kuşak sefalosporin direnci %50,2, florokinolon direnci %50,9, aminoglikozid direnci %24,6 ve karbapenem direnci %4,7 olarak bildirilmiştir. Bu raporda Türkiye'deki *E. coli* izolatlarında karbapenem direncinin son beş yıl içinde %2,7 den %4,7 ye yükseldiği ve bir artış eğiliminde olduğu belirtilmiştir (35).

### 2.6. Tolerans

Tolerans, bakterilerin geçici süreyle yüksek antibiyotik konsantrasyonlarına maruz kaldıktan sonra hayatta kalma yeteneği olarak tanımlanmaktadır (36). Tolerans, MİK'ten bağımsız olarak gelişebilmektedir. Ancak aynı bakterisidal etkiye ulaşmak için toleran suşların antibiyotik maruziyetinin daha uzun süre olması gerekmektedir (30, 37). Bu nedenle, tedavi süresinin tolerans düzeyine göre ayarlanması, antibiyotiklerin etkinliği açısından önem taşımaktadır (8, 38).

Tolerans yavaş üremeye ve lag fazının (gecikme, adaptasyon fazı) uzamasına bağlı olarak gelişebilir. Bu iki tolerans türü, duyarlı izolatlara göre popülasyonun %99'unun öldürülmesi için gereken minimum sürede [minimum duration for killing (MDK)] artışa sebep olsa da ölçüm protokolleri arasında farklılıklar bulundurmaktadır. Yavaş üremeye bağlı tolerans durağan durumda gerçekleşirken, lag fazı uzamasına bağlı tolerans, açlık veya stres tarafından tetiklenen geçici bir durumdur (Şekil 1) (4).




Şekil 1. Direnç, tolerans ve persistansın zamana bağlı öldürme grafiğinde karakteristik görünümü
[Brauner ve ark. çalışmasından uyarlanmıştır (4).]

### 2.6.1. Yavaş Üremeye Bağlı Tolerans

Bazı antibiyotikler etkilerini bakterilerin üremesi sırasında gösterdiğinden, üreme hızını azaltan koşulların bu antibiyotiklere karşı tolerans gelişimine neden oluşturduğu bilinmektedir. Örneğin, beta-laktam grubu antibiyotikler, bakteri üremesi sırasında peptidoglikan tabakasındaki bağları parçalayarak etki etmektedir. Böylece beta-laktamlar, peptidoglikan sentezini inhibe ederek hücre duvarı yapımına engel olmakta ve bakterinin ölümüne yol açmaktadır (39). Bu nedenle peptidoglikan tabakasındaki hasar, üreme hızını etkilemektedir. Çalışmalar beta-laktamlara maruz kalan toleran olmayan bakterilerin ölüm hızının, toleran bakterilerin ölüm hızına göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu da bakteri üreme hızı ile tolerans arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Benzer şekilde, florokinolonlar gibi DNA giraz inhibitörleri de bakterinin üreme hızı ile orantılı olarak etkinlik göstermektedir (40). $MDK_{99}$ ile üreme hızı arasındaki ilişki, birçok çalışmada farklı bakteri türleri ve antibiyotikler için zamana bağlı öldürme yöntemi kullanılarak gösterilmiştir (4, 41, 42).

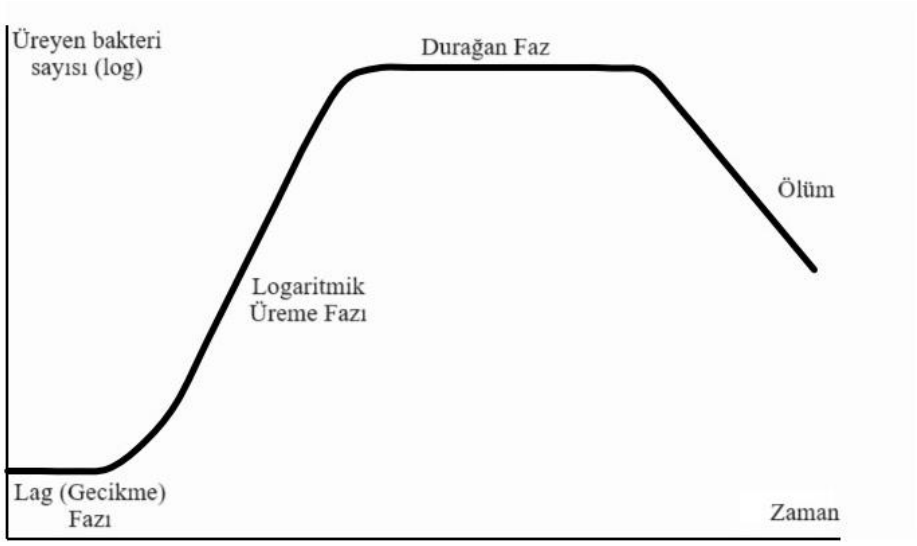
Yavaş üremeye bağlı tolerans, bir bakterinin yapısal olarak düşük üreme hızına sahip olması nedeniyle geliştiğinde kalıtsal olabilir. Ancak bakterilerin

yavaş üremesi, zayıf üreme koşullarına bağlı ise kalıtsal olmadan da ortaya çıkabilmektedir. Doğal olarak yavaş üreyen bakteri türleri, antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde kalıtsal tolerans göstermektedir (43).

Kalıtsal olmayan, yavaş üremeye bağlı tolerans, antibiyotik tedavisi sırasında ortaya çıkabilmektedir. Zayıf üreme koşulları, biyofilm oluşması, üremeyi inhibe eden çeşitli stres faktörleri, bakterilerin üremesini yavaşlatabilmekte ve buna bağlı olarak antibiyotiklere karşı tolerans gelişmesine neden olabilmektedir. Yavaş üreyen bakterilerde antibiyotiklerin bakterisidal etkisinin azaldığı gösterilmiştir (44). Antibiyotiklerin kendisi de bazı bakterilerde üremeyi yavaşlatarak toleransa neden olabilmektedir. Bu durum antibiyotik ile indüklenen tolerans olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca bakterilerde açlık, konak faktörleri gibi çeşitli stres koşullarının da antibiyotiklere karşı kalıtsal olmayan toleransa yol açtığı bilinmektedir (45).

### 2.6.2. Lag Fazının Uzamasına Bağlı Tolerans

Sıvı kültür ortamında bakteriler, zamanla logaritmik olarak artan tek tip bir üreme eğrisi göstermektedir (Şekil 2). Tipik bir bakteri üreme eğrisinde lag fazı, hücrenin yeni enzimler, kofaktörler ve metabolik ara ürünler sentezlediği, iç besin depolarını oluşturduğu bir fizyolojik hazırlık dönemidir. Artan üreme fazında, enzimatik reaksiyonlar kararlı hale gelip hücre üremesi başlamaktadır. Logaritmik fazda, hücre üremesi ve bölünmesi en yüksek hızlara ulaşmakta, bu hız, ortam sıcaklığı, karbon kaynağının türü, besin kısıtlamaları, mevcut besinlerin çeşidi ve oksijen gibi faktörlerden etkilenmektedir. Durağan fazda canlı hücre sayısı maksimuma erişmekte ve yeni üreyen hücreler ile ölen hücrelerin sayısı eşitlenmektedir. Ölüm fazında hücre parçalanması ve ölümü gerçekleşmektedir (15).



Şekil 2. Bakteri üreme fazları

Bakterilerin üreme döngüsünde lag fazı, bakterilerin geçici bir süre için üreyemediği ancak hayatta kalmaya devam ettiği önemli bir evredir. (46). Üremesi durmuş bakterilerin uygun şartlar sağlandığında (besinler açısından zengin ortama tekrar konduklarında) üremeye başlamadan önce geçirdikleri süre lag fazı olarak tanımlanmaktadır. Örneğin normal koşullar altında *E. coli* için bu süre ortalama 30 dakikadır. Ancak daha önce uzun süre kısıtlı besin koşullarında inkübe edilmiş izolatlarda lag fazı uzayabilmektedir. Lag fazı, durağan faza benzemekle birlikte aslında farklı bir metabolik durumdur. Lag fazında bakterilerin üreyebilmek için öncelikle ortama uyum sağlaması gerekmektedir. Bu nedenle lag fazının uzaması yoluyla gelişen tolerans mekanizması, durağan fazdakinden farklılık göstermektedir. Lag fazında üremenin durması geçici bir durum iken, lag fazının uzamasına bağlı tolerans durumunda $MDK_{99}$ saatlere veya günlere ulaşabilmektedir. Örneğin, *E. coli*'nin aralıklı olarak bir beta-laktam antibiyotiğe maruz kalması sonucunda, atasal popülasyondan 10 kat daha uzun bir lag fazına sahip olabileceği ve bir günden fazla bir $MDK_{99}$'a ulaşabileceği gösterilmiştir (47). Uzamış lag fazı ile oluşan tolerans nedeniyle, antibiyotik tedavisinde kullanılan antibiyotik değiştirilse bile tedavi süresi aynı olduğu sürece etkisiz hale gelebilmektedir. Antibiyotik tedavisinin süresi lag fazından daha kısa olursa, lag fazının uzamasına bağlı tolerans devreye girmektedir. Böylece bakteriler, antibiyotik duyarlılıkları değişmeden saatlerce hatta günlerce canlı kalabilirken, antibiyotikler etkinliğini kaybetmektedir. Bu durum lag fazının uzamasına bağlı toleransın dirençten daha hızlı gelişebildiğine işaret etmektedir (4, 48, 49).

### 2.7. Persistans

Bakteri popülasyonunun çoğunluğunu etkili bir şekilde öldüren antibiyotik tedavileri sırasında, antibiyotik tarafından öldürülmeyen alt popülasyonlar ortaya çıkabilmektedir. Bu durum bakteriyel persistans, hayatta kalan bakteriler ise persister hücre olarak adlandırılmaktadır. Persister hücreler, uyku modundaki, aktif olmayan hücreler gibidir ve normal mikrobiyal popülasyonların küçük bir alt kümesini oluşturmaktadır. Araştırmalar, persister hücrelerin kronik enfeksiyonların tedavi başarısızlığında önemli bir rol oynayabileceğine işaret etmektedir (50–53).

Persistans, tek tip bir bakteri popülasyonundan beklenen zamana bağlı öldürme grafiğinden farklı olarak iki modlu bir zamana bağlı öldürme yöntemi ile tespit edilebilmektedir. Persister ve duyarlı bakteri hücrelerinin beraber olduğu durumda persister hücreler, daha az sayıda olan alt popülasyonu oluşturmakta (tipik olarak %1'den az) ve duyarlı hücrelerden daha yavaş öldürülmektedir. Temelde daha önce sırasıyla Tip I persistans ve Tip II persistans olarak tanımlanmış olan zamana bağlı persistans ve doz bağımlı persistans olmak üzere iki tip persistans vardır (4).

#### 2.7.1. Zamana Bağlı Persistans

Zamana bağlı persistans, tipik olarak popülasyonun çoğundan daha uzun lag fazına (gecikme yoluyla tolerans) veya daha yavaş üreme hızına (yavaş üreme yoluyla tolerans) sahip olan toleran bir bakteri alt popülasyonunun varlığı ile karakterizedir. Aslında, persistans ile tolerans arasındaki tek fark, persistansta bakteri popülasyonunun sadece bir kısmının sorumlu olmasıdır. Bu nedenle, toleransa yol açan moleküler mekanizmaların zamana bağlı persistans için de geçerli olması beklenmektedir. Örneğin, toksin-antitoksin (TA) modüllerinde toksinlerin indüklenmesi, düşük seviyelerde ifade edildiğinde indüklenen bakteri hücrelerinin bir alt popülasyonunun üremesinin durmasına (yani zamana bağlı persistans) veya yüksek seviyelerde ifade edildiğinde indüklenen tüm bakteri hücrelerinin metabolizmasının yavaşlamasına (dormansisine) neden olmaktadır. Zamana bağlı persistans için zamana bağlı öldürme yönteminin temel özelliği ikiye ayrılmış popülasyon eğrisi görünümüdür (54–56).

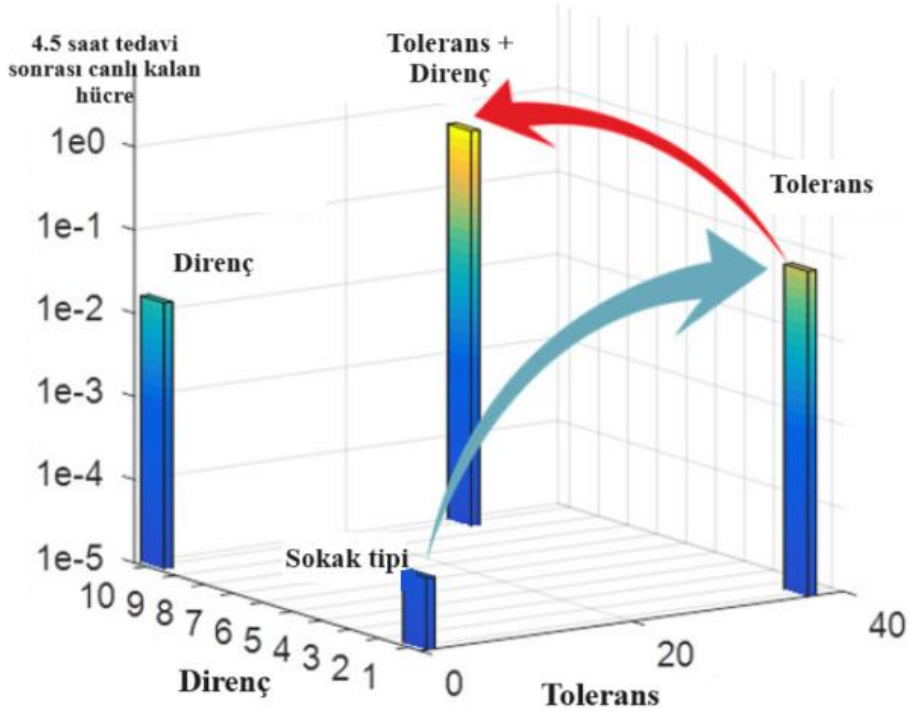
### 2.7.2. Doza Bağlı Persistans

Antibiyotik duyarlılığında geçici bir azalmaya sahip olan persister hücre alt popülasyonları da bildirilmiştir. Bu persister alt popülasyonlarda bir direnç faktörünün aşırı ekspresyonu, antibiyotiğin etkili hücre içi konsantrasyonunda azalmaya neden olmakta ve aynı öldürme oranını elde etmek için daha yüksek konsantrasyon gerektiğinden daha düşük antibiyotik duyarlılığı ile sonuçlanmaktadır. Bakteri popülasyonu, popülasyondaki hücrelerin çoğunluğu için doygunluğa ulaşacak kadar yüksek antibiyotik konsantrasyonuna maruz kaldığında bimodal zamana bağlı öldürme grafiği gözlemlenmektedir. Doza bağlı persister hücreler tam bir popülasyona dönüştüğünde, direnç faktörü yeni popülasyondaki bakteri hücrelerinin yalnızca bir alt popülasyonunda aşırı eksprese edilmekte, böylece yeni popülasyondaki bakteriler antibiyotik duyarlılığı açısından heterojen olmaktadır.

Dirençte olduğu gibi, doza bağlı persistans tipik olarak belirli bir antibiyotik sınıfına karşı hayatta kalmayı arttırmakta ve ayrıca genellikle bakteri üreme hızından bağımsız olmaktadır. Bunun aksine, zamana bağlı persistans, beta-laktam grubu ve kinolon grubu antibiyotikler gibi bakteri üremesiyle ilişkili mekanizmaları hedef alan çeşitli antibiyotik gruplarına karşı bir mekanizma olmaktadır (4, 57).

## 2.8. Tolerans Direnç İlişkisi

Tolerans mutasyonlarının direnç gelişimini kolaylaştırdığını ve tolerans ile direnç mutasyonları arasında pozitif bir etkileşim olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (6, 8, 58). Levin-Reisman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada antibiyotik toleransının, *E. coli*'de antibiyotik direncinin oluşması üzerindeki etkileri araştırılmış, aralıklı ampisilin maruziyeti altında tutulan *E. coli* kültürlerinde önce toleransın, ardından direncin ortaya çıktığı gösterilmiştir (Şekil 3) (8). Tolerans, direnç mutasyonlarının oluşma olasılığını iki şekilde artırmaktadır. Bakteri popülasyonun hayatta kalmaya devam etmesini desteklemekte ve dolayısıyla daha nadir mutasyonların ortaya çıkması için fırsat oluşturmaktadır. Aynı zamanda tolerans varlığında, hayatta kalanların sayısı daha fazla olmakta bu nedenle antibiyotiğe maruziyet sırasında direnç mutasyonlarının ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (59).



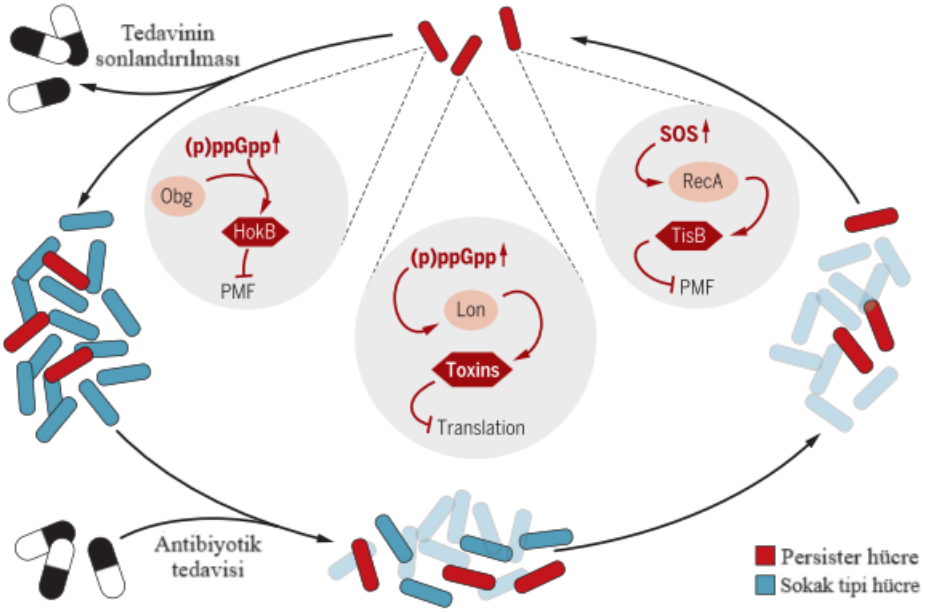

Şekil 3. Tolerans ile direnç ilişkisinin şematik gösterimi
[Levin-Reisman ve ark. çalışmasından uyarlanmıştır (8).]

### 2.9. Tolerans ile İlişkili Genler

Tolerans ve persistansın genetik temeline ilişkin önemli bilgi eksiklikleri bulunmaktadır. Fenotipik olarak persister duruma geçişte, katı yanıt ve (p)ppGpp sinyali, RpoS ve genel stres yanıtı, SOS yanıtı, bakteriyel iletişim (quorum sensing) ve TA modülleri gibi çeşitli mekanizmalar ve yollar rol oynamaktadır (58).

Birçok çalışmada, bakterilerde tolerans ve persistans ile ilişkili en önemli mekanizmalardan ikisinin TA modülleri ve guanozin pentafosfat/tetrafosfat (p)ppGpp yolağı olduğu gösterilmiştir (Şekil 4) (60–64). (p)ppGpp, bakterilerde stres yanıtını düzenleyen çok önemli bir moleküldür ve RelA/SpoT homolog protein ailesine ait enzimler tarafından amino asit ya da yağ asidi eksikliğinde sentezlenmektedir. Bununla birlikte, (p)ppGpp seviyeleri oksijen değişikliği, pH değişiklikleri, ozmotik şok gibi çok çeşitli uyaranlara karşı da artış göstermektedir. Ayrıca (p)ppGpp, çevresel stres yanıtları yanında bakteriyel patogenez, konakçı

istilası antibiyotik toleransı ve persistansında da rol oynamaktadır. Özellikle (p)ppGpp yolağını hedef alan bazı yeni moleküllerin, etkili anti-persister ajanlar olarak geliştirilebileceği tartışılmaktadır (65, 66).




Şekil 4. Tedavi sonrasında persister hücre oluşumu
[Harms ve ark. çalışmasından uyarlanmıştır (64).]

Schumacher ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *E. coli*'de HipA lokusunda bir mutasyonun persister hücrelerin oluşumuna yol açtığını ve çoklu ilaç direnci ile tolerans arasında bir ilişkinin olabileceğini savunmuşlardır. HipA, bir serin-protein kinazı kodlayan ve HipB transkripsiyonel regülatörü ile hipBA promotörüne bağlanarak etkisizleştirilen bir gendir. Ancak, HipA'nın çoklu ilaç toleransındaki fizyolojik rolü belirsizliğini korumaktadır. Bu çalışmada, sokak tipi HipA'nın persister hücre oluşumuna katkıda bulunduğu ve hipA geni yüksek oranda mutasyona uğramış suşların ÜSE'lerde çoklu ilaç toleransına yol açtığı gösterilmektedir (67).

Wu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *E. coli* suşları kullanılarak bilinen 21 persister aday geninde mutantlar üretilmiş ve bu mutantların çeşitli antibiyotiklere (ampisilin, gentamisin, norfloksasin ve trimetoprim) karşı gösterdikleri persistans düzeyindeki göreceli değişiklikler karşılaştırılmıştır. Ayrıca oxyR, dnaK, sucB, relA, rpoS, clpB, mqsR ve recA gibi genlerin birden fazla antibiyotiğe karşı persistans üzerinde önemli rol oynadığı bulunmuştur. Bu genler

antioksidan savunması, global düzenleyiciler, enerji metabolizması, stres yanıtı, TA modüller ve SOS yolağı ile ilişkilidir. İlginç şekilde, rpoS mutantı gentamisine karşı düşük persistans gösterirken, ampisilin ve norfloksasine karşı yüksek persistans göstermiştir (68). Başka bir çalışmada, *E. coli*'de sodyum-proton antiporter geni nhaA'nın delesyonuna dayanan bir tolerans mekanizması tanımlanmıştır (69).

Fridman ve arkadaşlarının, *E. coli*'nin antibiyotiklere tolerans geliştirme mekanizmasının araştırıldığı çalışmasında, ilk olarak 100 mg/ml ampisilin içeren ortamda 24 saat süreyle stres uygulanarak bakterilerin antibiyotiklere adapte olması sağlanmıştır. Antibiyotik uygulaması her gün 3, 5 veya 8 saat süreyle 8-10 gün tekrarlanarak bakteriler antibiyotik baskısı altında evrimleştirilmiştir. Evrimleşen izolatlarda tolerans varlığı değerlendirilmiş, ayrıca tek hücre lag süreleri otomatize sistem ile ölçülmüştür. Yapılan analizler sonucunda tolerans varlığı belirlenmiş, tüm genom dizilemesi ile toleransla ilişkili olarak metG, vapB, prsA genleri gösterilmiştir (47).

Biyofilmin tolerans ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Biyofilm içerisindeki bakterilerin planktonik formdaki bakterilerle karşılaştırıldığında antibiyotiklere karşı daha dayanıklı oldukları iyi bilinmektedir. Ancak, biyofilm bakterileri için antibiyotik toleransının mekanizmalarına dair çok az şey bilinmektedir (70). Thöming ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 352 *P. aeruginosa* klinik izolatında, biyofilme özgü üreme koşulları altında antibiyotiklere (tobramisin, siprofloksasin, kolistin) karşı tolerans durumu incelenmiş, biyofilmin antibiyotik toleransı ile ilişkisi gösterilmiştir (71). Biyofilm yoluyla antibiyotik penetrasyonunun sınırlanması, biyofilme özgü direnç genlerinin ifadesi veya dormant hücrelerin varlığı gibi faktörlerin de tolerans fenotipine katkıda bulunması muhtemeldir (71–73).

Antibiyotiklerin biyofilme etkili bir şekilde nüfuz edememesine ek olarak, biyofilmin derinliklerinde besin ve oksijen sınırlıdır ve bu da üremede yavaşlamaya yol açar. Besin maddelerinin azalmasının, SOS ve katı tepkilerde de artışa yol açtığı ve bunların da tolerans gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (44, 74–76).

Tolerom, tolerans ile ilişkili genlerin ortak tanımı olarak kullanılabilmektedir. Toleromun antibiyotiklere ve zamanlamaya bağlı değişken rollerinin olduğu anlaşılmaktadır. Bu da toleransın dinamik bir süreç olduğuna

işaret etmektedir. Her ne kadar son yıllarda bu konuda bazı ilerlemeler kaydedilmiş olsa da tolerans ve persistansa neden olan genler ve mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu durum, şu anda DNA tabanlı tanı araçlarının geliştirilmesini ve rutin klinik kullanıma girmesini engellemektedir. Ancak ilerleyen yıllarda, genomik ve transkriptomik çalışmalar yoluyla tolerans ve persistansın genetik belirleyicilerine dair bilgiler artacaktır. Bu da gelecekte bu fenotipleri öngören moleküler tanı kitlerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir. Fakat şu an için, fenotipik testler tolerans tespiti için altın standart olmaya devam etmektedir (77).

### 2.10. Anti-Persister Tedaviler

Anti-persister tedaviler, izledikleri stratejiye göre üç gruba ayrılabilmektedir. İlk grup olan doğrudan persister hücre öldürücü tedaviler, metabolik olarak inaktif, persister hücreleri aktif hücresel süreçlere ihtiyaç duymadan öldürmeyi hedeflemekte, ikinci grup tedaviler ise persister hücreleri antibiyotiklere karşı duyarlı hale getirerek dolaylı olarak etkisiz hale getirmektedir. Bunu, persister hücreleri uyararak antibiyotik hedeflerini aktive etme yoluyla veya antibiyotik alımını artırarak gerçekleştirmektedir. Üçüncü grup tedaviler ise persister oluşumunu engelleyen veya azaltan moleküllerden oluşmaktadır. Ancak kesin sınırlar olmayıp, bazı tedaviler bu üç stratejinin ikisini ya da üçünü birden kullanabilmektedir. Özetle anti-persister ajanlar, mevcut persister popülasyonu yok etmeye ya da oluşumlarını engellemeye yönelik olup, kimileri ise her iki hedefi birden taşımaktadır (78, 79).

Antimikrobiyal dirence rağmen yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesine yönelik çalışmaların azalması endişe vermektedir. Kronik enfeksiyonların tedavisinde etkisiz kalan mevcut antibiyotiklere karşı yeni moleküllerin keşfi acil bir ihtiyaçtır. Tolerans mekanizmalarını anlamak, dirençli enfeksiyonlarla mücadele stratejileri geliştirmek açısından hayati öneme sahiptir. Farklı patojenlerde gözlenen tolerans mekanizmalarının benzer ve farklı yönlerinin aydınlatılması, geniş spektrumlu ya da patojene özgü toleransı hedef alan tedavi seçeneklerinin geliştirilmesinin önünü açabilecektir. Mevcut antibiyotiklerin etki mekanizmalarının tolerans bağlamında yeniden değerlendirilmesiyle, klinikte daha etkili kullanımları mümkün olabilecektir. Yeni bilgiler ışığında, antibiyotiklerin metabolik aktivasyonu ya da dışa atım (efflux) pompa inhibitörleri gibi destek tedavileri tolerans görülen antibiyotiklerin etkisini artırabilecektir (1, 80, 81).

### 2.11. Toleransın Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Tolerans, rutin antibiyotik duyarlılık testleriyle saptanamayan, önemli bir mekanizmadır. Bu standart testler, çoğunlukla bir antibiyotiğin bakteri üremesini engellediği MİK'i belirlemeye dayanmaktadır. Fakat bu yöntemler, antibiyotik varlığında bakterilerin saatlerce hatta günlerce canlılığını sürdürüp sürdürmediği hakkında fikir vermemektedir. Toleran bakterilerin ölüm hızı çok yavaş olduğundan, tolerans; minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK)/MİK oranının belirlenmesi yönteminde suşların MİK'in 32 katı ya da daha yüksek antibiyotik konsantrasyonunda 24 saat inkübasyondan sonra inokülumdaki bakterilerin %1'inden fazlasının canlı kaldığının gösterilmesiyle, zamana bağlı öldürme yöntemi ile veya TD test ile saptanabilmektedir (11, 82).

#### 2.11.1. MBK / MİK Oranının Belirlenmesi

Bakterisidal antibiyotiklerin MİK ve MBK değerlerinin saptanması ve bu yolla toleransın belirlenmesinde pratikte kullanılan yöntemdir. MBK, incelenen bakterinin %99.9'unu öldüren en düşük antibiyotik konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemde bakterisidal antibiyotikler için MBK/MİK ≥32 olarak belirlenen suşlar toleran olarak değerlendirilmektedir. Bu amaçla CLSI ve EUCAST önerilerine göre standardize edilmiş duyarlılık çalışmaları yapılmakta, belirlenen MBK ve MİK değerlerinin oranlarına bakılmaktadır (33, 83).

#### 2.11.2. Zamana Bağlı Öldürme Yöntemi

Zamana bağlı öldürme yöntemi, zamana ve antibiyotik yoğunluğuna bağlı olarak antibiyotiğin bakterisidal etkisini dinamik olarak ortaya koyan bir yöntemdir. Bu yöntem, yeni antimikrobiyal ajan ve kombinasyonlarını değerlendirmek, paradoksal efektleri veya toleransı doğrulamak ve hastanın prognozu için önem arz edecek bakterisidal aktiviteyle klinik durumlardaki tedavi başarısızlıklarını açıklamada yardımcı olmak için kullanılmaktadır. Bu yöntem bakterisidal etkiyi zamana karşı gösteren bir yöntemdir. Bir bakteri suşunun bir antimikrobiyal madde karşısındaki ölüm hızının belirlenmesinde kullanılır ve toleransın belirlenmesinde en güvenilir yöntemdir (56).

### 2.11.3. Tolerans Disk Testi (TD test) Yöntemi

Tolerans tespiti için Gefen ve arkadaşları disk difüzyon testine benzer bir yöntem olan TD test yöntemini geliştirmişlerdir. Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi uygulandığında, antibiyotik konsantrasyonu yaklaşık 12 saat sonra MİK değerinin altına düşmektedir. Bu noktada, inhibisyon zonu içinde hayatta kalan toleran bakteriler, zon dışındaki bakteriler tarafından tüketilen besinler nedeniyle üreyemezler. Ancak antibiyotik diskine glikoz eklenmesi, bu toleran bakterilerin zon içerisinde üreyebilmelerine neden olmaktadır. Glikoz sayesinde, inhibisyon zonunda koloni oluşturabilen bu bakteriler üremeye başlarlar.

TD test birkaç çalışmada tolerans tespiti için kullanılmış, TD test sonuçları referans yöntem olan zamana bağlı öldürme yöntemi sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Hana ve arkadaşlarının *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) izolatlarında vankomisin toleransı TD test sonuçları zamana bağlı öldürme yöntemi ile uyumlu bulunmuştur (84). Lazarovitz ve ark. yaptığı çalışmada *E. coli* izolatlarında ertapenem toleransı TD test sonuçları ile zamana bağlı öldürme yöntemi sonuçları uyumlu bulunmuştur (12). Zamana bağlı öldürme yönteminin zaman ve yoğun emek gerektirmesi gibi bazı dezavantajları mevcuttur. Ancak TD test ile tolerans tespiti, klinik laboratuvarlarda kolay uygulanabilir görülmektedir (11).

### 2.11.4. Otomatize Laboratuvar Sistemi

Mikrobiyoloji laboratuvarında kültür sonuçlarının hızlı bir şekilde raporlanması enfeksiyon hastalıklarının yönetiminde son derece önemlidir. Son yıllarda, tam laboratuvar otomasyonunun (TLA) tanı laboratuvarlarına girmeye başlamasıyla klinik mikrobiyoloji dramatik değişikliklerle karşı karşıya kalmıştır. Otomasyona yönelik bu eğilim, ekonomik verimliliği, standardizasyonu ve laboratuvar prosedürlerinin sonuçlanma süresini çeşitli boyutlarda etkileyecektir. Klinik mikrobiyolojide kısmi veya tam laboratuvar otomasyonu, özellikle örnek yükü fazla olan laboratuvarlarda enfeksiyon hastalıklarının hızlı tanısında giderek daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

# 3. GEREÇ YÖNTEM

Araştırmamız prospektif ve tanımlayıcı bir araştırma olarak tasarlanmıştır. Araştırma tasarımı, "The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology" (STROBE) kılavuzunun modifikasyonu olan Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively (MICRO) kılavuzuna uygun olarak yapılmıştır (85, 86). Uluslararası etik kurallarına uyulmuş ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu 10.01.2023 tarihli 3778 sayılı karar ile etik kurul onayı alınmıştır.

## 3.1. Bakteriyel İzolatlar

Bu araştırma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na, Ağustos 2021-Mayıs 2022 tarihleri arasında rutin olarak gönderilen idrar kültürlerinde üremiş olan GSBL üreticisi ve ertapenem duyarlı 350 *E. coli* izolatını kapsamaktadır. Hasta örnekleri değerlendirilirken yaş ve cinsiyet farkı gözetmeksizin, tüm servis ve polikliniklerden gelen idrar kültürlerinden izole edilen *E. coli* izolatları incelenmiştir. Bir hastadan aynı anda gönderilen üriner sistemin farklı anatomik bölgelerine ait idrar örneklerinden aynı mikroorganizma izole edilmişse, sadece bir izolat çalışmaya dahil edilmiştir. İdrar kültüründen izole edilen *E. coli* sayısı, 2021 Ağustos-2022 Ağustos tarihleri arasında 2.854 iken ertapenem duyarlı *E. coli* sayısı 2.692'dir. Güven aralığı %90-98 alınarak, %5 hata payı ile örneklem büyüklükleri hesaplanmıştır. Araştırmaya, %95 güven seviyesini karşılayacak şekilde 350 *E. coli* izolatı dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastaların, örnek gönderim tarihinin bir yıl öncesi ve sonrasında aynı bakteri ile enfekte olup olmadığına bakılarak relaps/rekürrens varlığı hastane bilgi yönetim sistemi verilerinden takip edilmiştir.

## 3.2. Bakteri Tanımlaması ve Duyarlılık Testleri

İdrardan izole edilen *E. coli* izolatlarının rutin tanımlama işlemleri, matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrofotometrisi (MALDI-TOF MS) teknolojisini kullanan VITEK® 2 MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ile gerçekleştirilmiştir. İzolatların ampisilin, gentamisin, amikasin, trimetoprim-sulfametoksazol, piperasilin-tazobaktam, nitrofurantoin, fosfomisin,

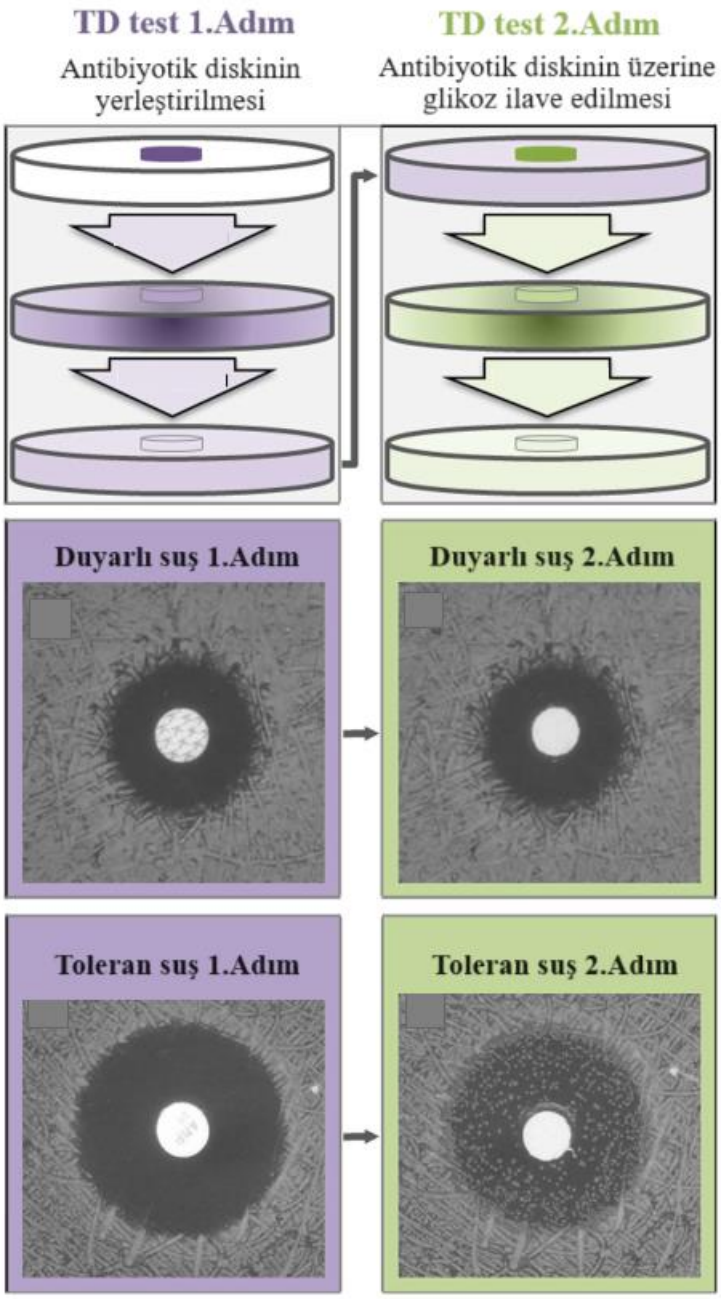
norfloksasin, ampisilin-sulbaktam, aztreonam, amoksisilin-klavulanat, sefuroksim, seftazidim, seftriakson, ertapenem, siprofloksasin, imipenem, meropenem ve sefepim için antimikrobiyal duyarlılıkları, tam otomatize VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) sistemi veya Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak, EUCAST kriterlerine göre değerlendirilmiştir (33). Tanımlama ve duyarlılık testleri sonrası *E. coli* izolatları triptik soya buyyon besiyerine aktarılarak çalışma tarihine kadar -80°C'de saklanmıştır. Tüm veriler, analiz edilmek üzere Excel dosyasına kaydedilmiştir.

### 3.3. Ertapenem MİK Belirlenmesi

TD test ile toleran olarak saptanan izolatlara ve toleran izolatların yaklaşık iki katı sayıdaki toleran olmayan izolata ertapenem E-test (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) uygulanmış ve MİK değerleri kaydedilmiştir.

### 3.4. TD Test ile Tolerans Saptanması

Toleransın belirlenmesi için Gefen ve arkadaşları tarafından tanımlanan, Kirby-Bauer disk difüzyon yönteminin bir modifikasyonu olan TD test yöntemi kullanılmıştır (11). *E. coli* izolatları çalışma tarihinde canlandırılıp saflaştırıldıktan sonra McFarland 0.5 bulanıklık standardına göre süspanse edilmiştir. Hazırlanan inokulumlar Mueller Hinton agara ekilip yayıldıktan sonra, agarların üzerine konsantrasyonu 1,25 µg olacak şekilde küçültülmüş ertapenem diskleri yerleştirilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır (1. adım). İnkübasyonun ardından, %10'luk glikoz içeren dekstroz çözeltisinden 10 uL solüsyon ertapenem disklerinin üzerine ilave edilmiş ve petriler 37°C'de yeniden 18-24 saat inkübe edilmiştir (2. adım). İkinci adımdan sonra inhibisyon bölgesinde görünen mikrokoloniler varlığında izolatlar "toleran" olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 5). Kalite kontrol için Kudüs İbrani Üniversitesi Racah Fizik Enstitüsü'nden temin edilen tbl3a, tbl5a toleran *E. coli* suşları ve toleran olmayan MGY sokak tipi *E. coli* suşu kullanılmıştır.




Şekil 5. TD test uygulama ve değerlendirme basamakları
[Gefen ve ark. çalışmasından uyarlanmıştır (11).]

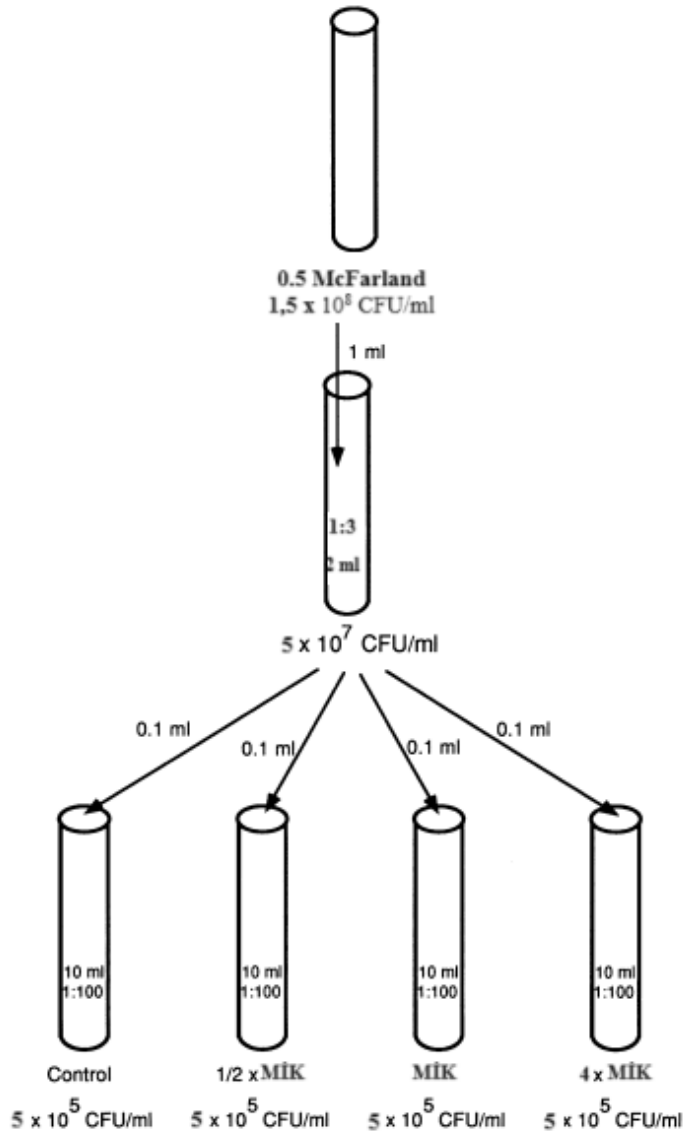
### 3.5. Zamana Bağlı Öldürme Yöntemi

Zamana bağlı öldürme yöntemi, standart miktarda bakteri içeren besiyerlerine farklı konsantrasyonlarda antimikrobiyal ajanlar eklenerek ve belirli zaman aralıklarında kalan canlı bakteri sayısını sayarak gerçekleştirilir. Kontrol tüpü ve her antimikrobiyal konsantrasyon tüpü için elde edilen veriler ile zamana karşı grafik oluşturulur. Yeterli bakterisidal cevabın göstergesi, genellikle

antimikrobiyal içeren tüplerde bakteri sayısının kontrol tüplerine göre 3-$\log_{10}$ CFU/ml azalması olarak kabul edilmiştir (56).

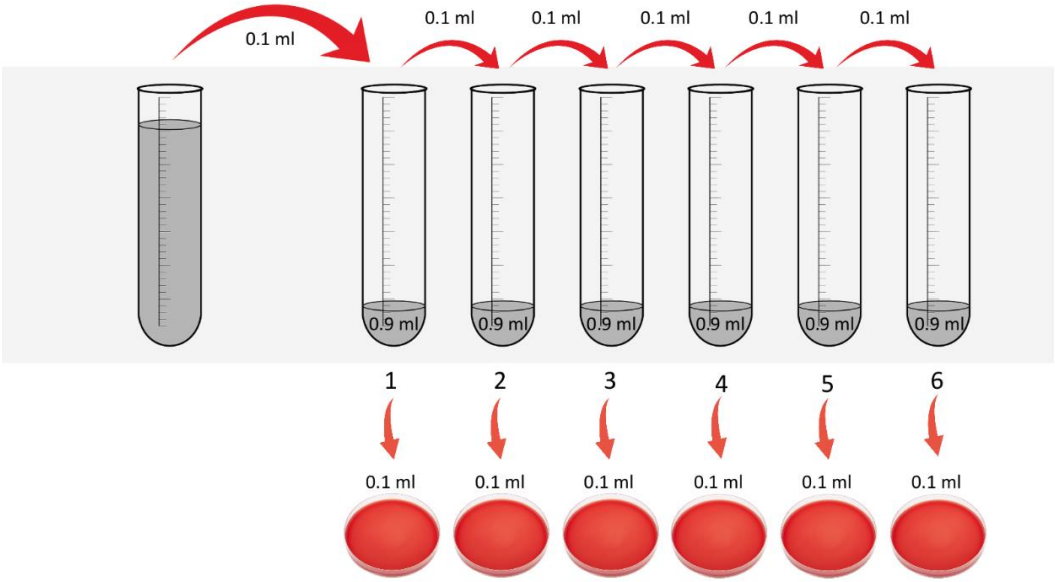
Zamana bağlı öldürme yöntemi çalışmasına, pozitif kontrol olarak toleran *E. coli* tbl3a suşu, negatif kontrol olarak toleran olmayan MGY sokak tipi *E. coli* suşu, TD testi ile toleran oldukları tespit edilen iki klinik izolat ve toleran olmayan iki izolat dahil edilmiştir. Tolerans tespiti için çalışmamızda yapılan zamana bağlı öldürme yönteminde besiyeri olarak katyon ayarlı Mueller-Hinton sıvı besiyeri (KAMHB) kullanılmıştır. 0.5 McFarland standardına göre ayarlanmış bakteri süspansiyonundan KAMHB ile dilüsyon yapılarak tüpte $5x10^7$ bakteri olması sağlanmıştır. Her bir izolat için sadece KAMHB içeren kontrol tüpü ile ½xMİK, 1xMİK ve 4xMİK konsantrasyonlarında ertapenem içeren, her biri 9,9 ml hacminde toplam dört tüp besiyeri hazırlanmıştır. Sonrasında kontrol tüpüne ve ertapenem içeren tüplere hazırlanan $5x10^7$ bakteri süspansiyonundan 0,1 ml eklenerek, final konsantrasyonun $5x10^5$ olması sağlanmıştır (Şekil 6). Kontrol ve ertapenem içeren tüpler inokülum sonrası dilüsyon yapılmak üzere 35ºC'de inkübe edilmiştir. Tüplerin her birine bakteri inoküle edildikten hemen sonra (0. saat) ve 4., 6. ve 24. saatlerde 100 µl alınarak 1/10 oranında altı ayrı tüpte seri dilüsyon yapılmıştır. Sonrasında her bir dilüsyon tüpünden 100 µl alınarak kanlı agar besiyerlerine ekim yapılmış ve 35ºC etüvde 18-24 saat inkübe edilmiştir (Şekil 7-8).

İnkübasyon süresi sonunda 30-300 koloni üreyen besiyerlerinden koloni sayımı yapılarak canlı kalan bakteri sayısı hesaplanmıştır. Koloni sayıları onluk tabanda yazılmış, dilüsyon oranları da eklendikten sonra logaritmik değerleri hesaplanarak, zamana bağlı öldürme grafikleri oluşturulmuştur. İnkübasyon sonrasında 24. saatteki elde edilen canlı bakteri sayısı, 0. saatteki inokülumdan elde edilen canlı bakteri sayısının %0,1'inden fazla ise izolat toleran olarak kabul edilir (56).

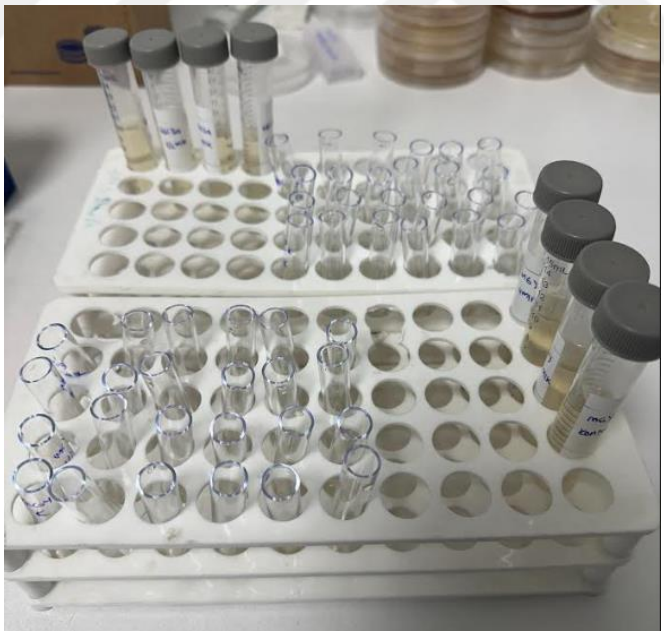



Şekil 6. Zamana bağlı öldürme yöntemi için inokülum hazırlanması

[Clinical microbiology procedures handbook (2020)'dan uyarlanmıştır (56).]




Şekil 7. Zamana bağlı öldürme yönteminde inokülasyon sonrası dilüsyon şeması



Şekil 8. Zamana bağlı öldürme yöntemi inokülasyon sonrası dilüsyon tüpleri

### 3.6. Otomatize Sistem (WaspLab) ile Tolerans Tayini

*E. coli* izolatları çalışma gününde canlandırılıp saflaştırıldıktan sonra McFarland 0.5 bulanıklık standardına göre süspanse edildi. Hazırlanan inokülumlar

WaspLab tüplerine aktarılıp otomatize sistemde ekimleri gerçekleştirildi. Saatlik fotoğraflamalar ile üreme durumları kayıt altına alındı

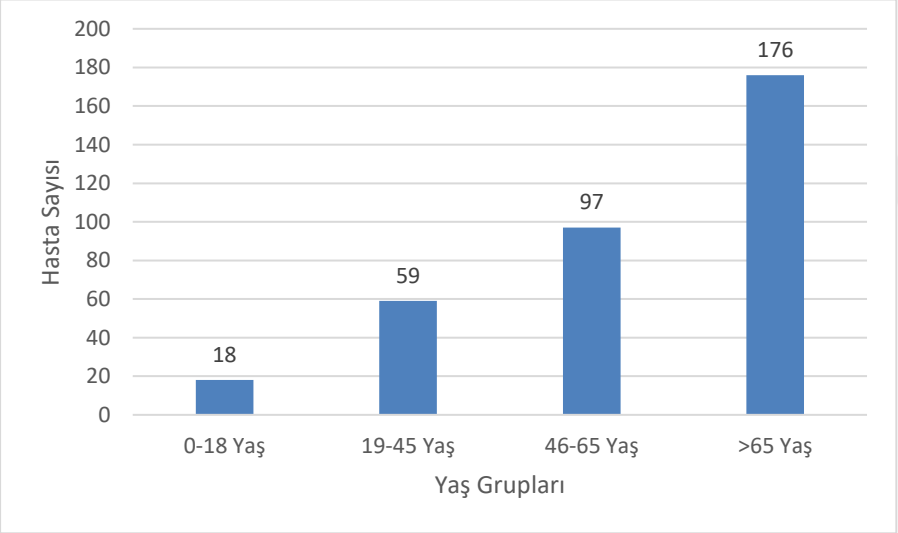
### 3.7. İstatistik

İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde, sayısal değişken için ortalama, standart sapma, minimum, maksimum, median olarak verilmiştir. Toleran olan ve toleran olmayan izolatların ertapenem MİK değerleri, diğer antibiyotiklere direnç oranları, hastalardaki relaps/rekürrens oranları, hasta yaş grupları arasında tolerans varlığının dağılımı, hastalara ait demografik veriler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Bağımsız iki grup karşılaştırması Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. Gruplarda oranlar ki kare testi ile karşılaştırılmış, alfa anlamlılık seviyesi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

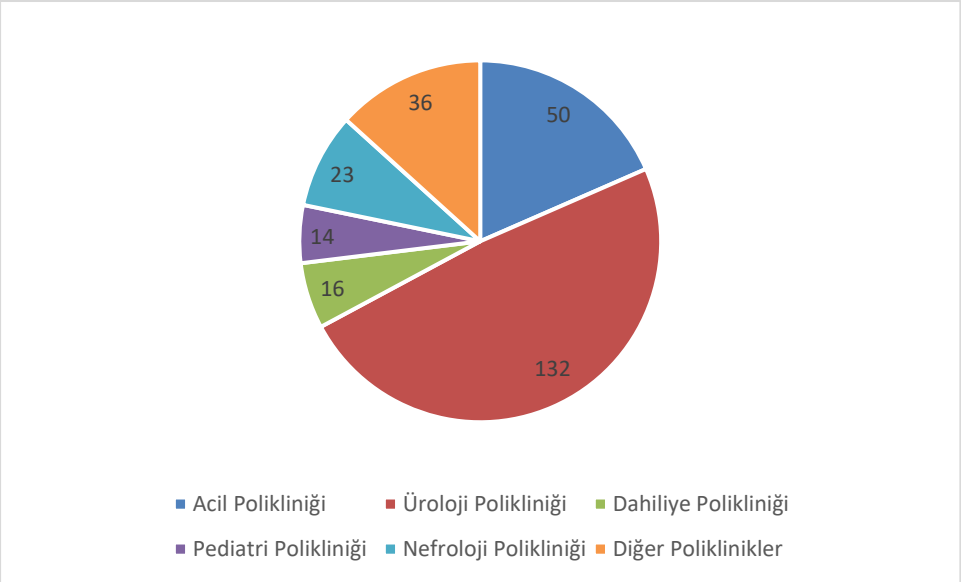
# 4. BULGULAR

## 4.1. Araştırma Popülasyonunun Demografik Özellikleri

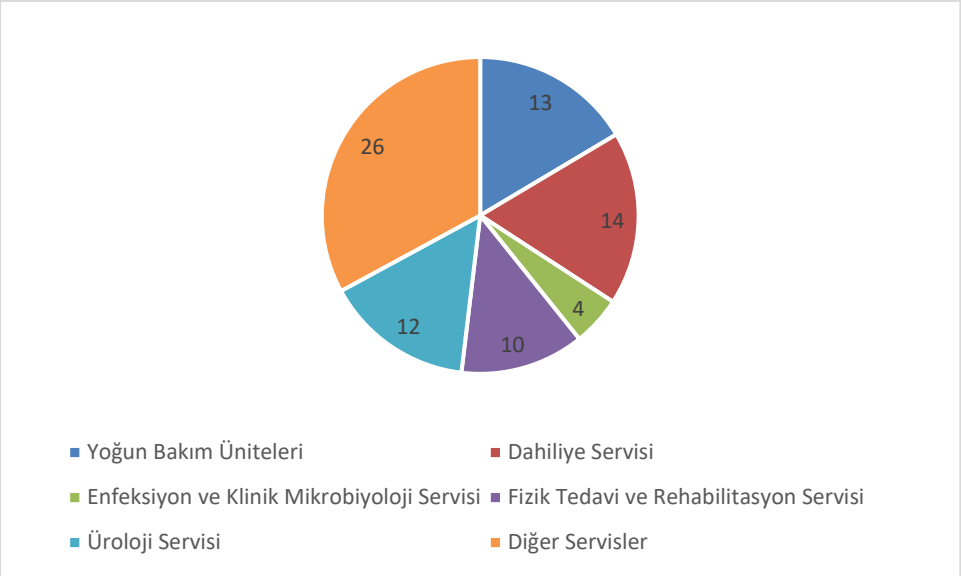
Bu çalışmaya, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Ağustos 2021-Mayıs 2022 tarihleri arasında gönderilen idrar kültürlerinde üreyen, ertapenem duyarlı *E. coli* izolatları dahil edilmiştir. Araştırmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması 61,1±21 olarak saptanmış, yaş dağılımı Şekil 9'da gösterilmiştir. İncelenen idrar örneklerinin, 122'si (%34,9) erkek, 228'inin (%65,1) kadın hastalara ait olduğu görülmüştür. 350 izolatın 271'i poliklinik, 79'u servis hastalarına ait örneklerden izole edilmiş olup, çalışmaya alınan hastaların polikliniklere ve servislere göre dağılımı Şekil 10 ve 11'de gösterilmiştir.




Şekil 9. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş dağılımı




Şekil 10. Çalışmaya alınan hastaların polikliniklere göre dağılımı



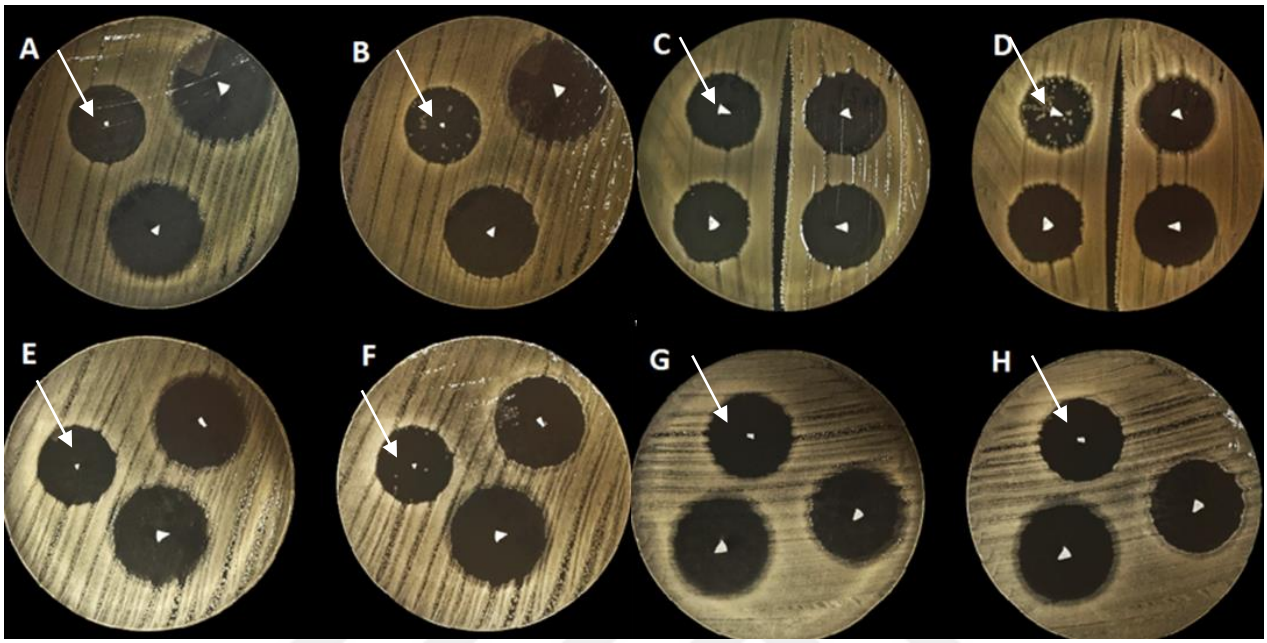

Şekil 11. Çalışmaya alınan hastaların servislere göre dağılımı

### 4.2. Antibakteriyel Duyarlılık Test Sonuçları

Tüm izolatlarda duyarlılık test sonuçlarına göre saptanan direnç oranları amikasine %6,3, amoksisilin-klavulonata %72, ampisiline %99,1, ampisilin-sulbaktama %63, sefepime %40,3, sefiksime %96,2, seftazidime %79,8, seftriaksona %87,4, sefuroksime %98,3, siprofloksasine %64, fosfomisine %17, gentamisine %24, nitrofurantoine %5, piperasilin-tazobaktama %27,9, trimetoprim-sulfametoksazole %51,6 olarak tespit edilmiştir. İzolatlarda imipenem, meropenem ve kolistine direnç saptanmamıştır.

### 4.3. TD Test Sonuçları

Ertapeneme duyarlı 350 *E. coli* izolatından 57'si (%16,2) TD test ile toleran olarak değerlendirilmiştir. Temsili sonuçlar Şekil 12'de gösterilmiştir.




Şekil 12. Temsili izolatlarda TD test 1. ve 2. adım fotoğrafları
(A) tbl5a için glikoz eklemeden önce, (B) tbl5a için glikoz ekledikten sonra, (C) 239 numaralı izolat için glikoz eklemeden önce, (D) 239 numaralı izolat için glikoz ekledikten sonra, (E) tbl3a için glikoz eklemeden önce, (F) tbl3a için glikoz ekledikten sonra, (G) MGY için glikoz eklemeden önce, (H) MGY için glikoz ekledikten sonra

### 4.4. Toleran ve Toleran Olmayan İzolatlarda Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması

Toleran izolatlarda en yüksek direnç oranları, sefuroksim (%100), ampisilin (%98,25) ve sefiksimde (%94,64) saptanmıştır. En düşük direnç oranları amikasin (%3,8) ve nitrofurantoinde (%1,8) görülmüştür.

Toleran izolatlarda, toleran olmayan izolatlara göre seftriakson, sefuroksim, fosfomisin, gentamisin, nitrofurantoin ve trimetoprim-sulfametoksazol antibiyotiklerine karşı daha yüksek direnç oranı bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Toleran izolatlarda sefepim ($p=0,024$) ve seftazidim ($p=0,047$) direnci istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (Tablo 1).

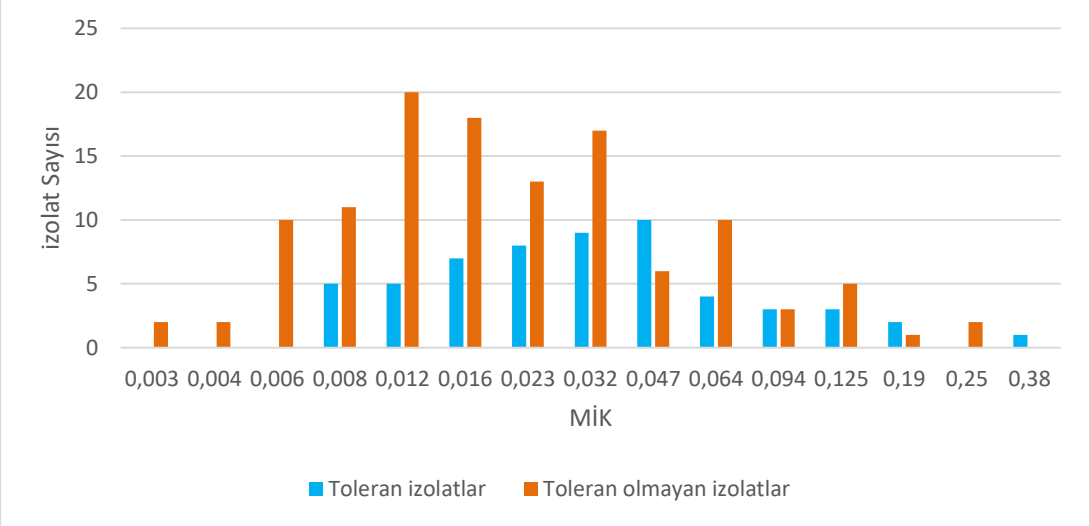
Tablo 1. Toleran ve Toleran Olmayan İzolatlarda Antimikrobiyal Direnç Oranları

| | Toleran İzolatlar | | | Toleran Olmayan İzolatlar | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Dirençli n (%)** | **Duyarlı n (%)** | **Toplam n** | **Dirençli n (%)** | **Duyarlı n (%)** | **Toplam n** | **p** |
| **Amikasin** | 2 (%3,5) | 55 (%96,5) | 57 | 20 (%6,8) | 273 (%93,2) | 293 | 0,55 |
| **Amoksisilin-klavulonat** | 36 (%64,3) | 20 (%35,7) | 56 | 211 (%73,5) | 76 (%26,5) | 287 | 0,159 |
| **Ampisilin** | 5 (%98,2) | 1 (%1,8) | 57 | 291 (%99,3) | 2 (%0,7) | 293 | 0,414 |
| **Ampisilin-sulbaktam** | 35 (%62,5) | 21 (%37,5) | 56 | 171 (%63) | 100 (%37) | 271 | 0,933 |
| **Sefepim** | 12 (%85,7) | 2 (%14,3) | 14 | 25 (%52,1) | 23 (%47,9) | 48 | 0,024 |
| **Seftazidim** | 51 (%89,5) | 6 (%10,5) | 57 | 226 (%77,9) | 64 (%22,1) | 290 | 0,047 |
| **Seftriakson** | 52 (%91,2) | 5 (%8,8) | 57 | 253 (%86,6) | 39 (%13,4) | 292 | 0,34 |
| **Sefuroksim** | 57 (%100) | 0 (%0) | 57 | 286 (%97,9) | 6 (%2,1) | 292 | 0,595 |
| **Siprofloksasin** | 35 (%61) | 22 (%59) | 57 | 189 (%64,5) | 104 (%35,5) | 293 | 0,655 |
| **Fosfomisin** | 14 (%25,9) | 40 (%74,1) | 54 | 42 (%15,2) | 234 (%84,8) | 276 | 0,055 |
| **Gentamisin** | 15 (%26,3) | 42 (%73,7) | 57 | 69 (%23,5) | 224 (%76,5) | 293 | 0,655 |
| **İmipenem** | 0 (%0) | 57 (%100) | 57 | 0 (%0) | 293 (%100) | 293 | - |
| **Levofloksasin** | 26 (%100) | 0 (%0) | 26 | 159 (%99,4) | 1 (%0,6) | 160 | 1 |
| **Nitrofurantoin** | 3 (%5,8) | 49 (%94,2) | 52 | 14 (%4,9) | 272 (%95,1) | 286 | 0,733 |
| **Piperasilin-tazobaktam** | 15 (%26,8) | 41 (%73,2) | 56 | 80 (%28,1) | 205 (%71,9) | 285 | 0,845 |
| **Trimetoprim-sulfametoksazol** | 31 (%54,4) | 26 (%45,6) | 57 | 149 (%51) | 143 (%49) | 292 | 0,643 |

n: sayı

### 4.5. Ertapenem MİK Sonuçları

Toleran izolatların MİK50/MİK90 değeri 0.032/0.125, toleran olmayan izolatların MİK50/MİK90 değeri 0.016/0.094 olarak bulunmuştur. Toleran izolatlarda ertapenem MİK değerleri ortalaması toleran olmayan izolatlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı (p=0,004) derecede yüksek saptanmıştır (Tablo 1). MİK dağılım grafikleri Şekil 13'te gösterilmiştir.




Şekil 13. Toleran ve toleran olmayan izolatlarda ertapenem MİK dağılımı

### 4.6. Toleran ve Toleran Olmayan İzolatlar ile Enfekte Hasta Özelliklerinin Karşılaştırması

Toleran izolatlar ile enfekte hastaların yaş ortalaması toleran olmayan izolatlar ile enfekte hastaların yaş ortalamasına göre istatistiksel olarak anlamlı (p=0,015) derecede düşük bulunurken, 19-45 yaş grubunda tolerans varlığı oranının diğer gruplara göre anlamlı (p= 0,004) derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Hastaların cinsiyeti ve örneğin gönderildiği birimler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo 1).

Toleran *E. coli* izolatlarıyla enfekte olduğu tespit edilen 57 hastanın 27'sine tedaviden sonra tekrar idrar kültürü alınmamıştır. Tekrar idrar kültürü alınan 30 hastanın ise 10'unda (%33,3) relaps/rekürrens varlığı tespit edilmiştir. Toleran olmayan *E. coli* izolatlarıyla enfekte olduğu tespit edilen 293 hastadan 128'inde tedavi sonrasında tekrar idrar kültürü alınmazken, tekrar idrar kültürü gönderilen 165 hastadan 64'ünde (%37,9) relaps/rekürrens varlığı tespit edilmiştir (Tablo 2).

İki grup arasında relaps/rekürrens oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

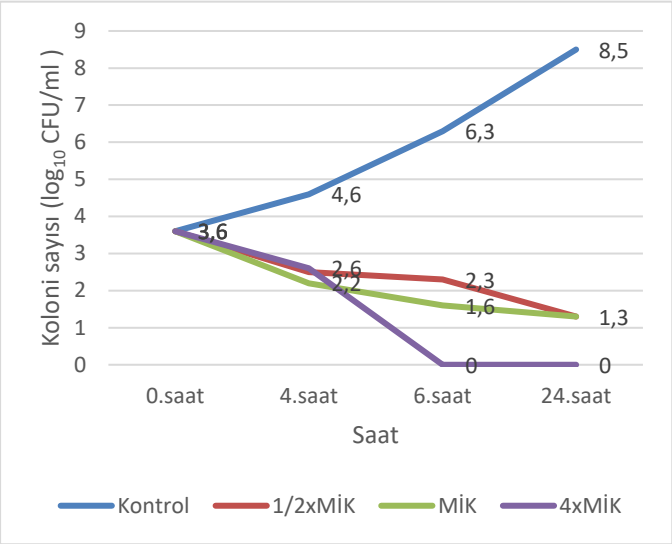
Tablo 2. Toleran ve Toleran Olmayan *E. coli* Kaynaklı Üriner Sistem Enfeksiyonu Olan Hastaların ve İzolatların Özellikleri

| | | **Toleran izolatlar n=57** | **Toleran olmayan izolatlar n=293** | **Toplam** | p |
|---|---|---|---|---|---|
| **Yaş** | | 55,4±20,6 | 62,2±20,9 | 61,1±20,9 | 0,015 |
| | 0-18 | 2 | 16 | 18 | 0,54 |
| | 19-45 | 17 | 42 | 59 | 0,004 |
| | 46-65 | 16 | 81 | 97 | 0,94 |
| | >65 | 22 | 154 | 176 | 0,053 |
| **Cinsiyet** n (%) | Erkek | 23 (40,4) | 98 (33,4) | 121 (34,6) | 0,316 |
| | Kadın | 34 (59,6) | 195 (66,6) | 229 (65,4) | |
| **Örneğin Gönderildiği Birim** n (%) | Servis | 9 (15,8) | 70 (23,9) | 79 (22,6) | 0,181 |
| | Poliklinik | 48 (84,2) | 223 (76,1) | 271 (77,4) | |
| **Relaps/Rekürrens** n (%) | | 10 (33,3) | 64 (37,9) | 74 (38) | 0,179 |
| **Ertapenem MIK (E-test)** | | 0,050±0,060 | 0,035±0,046 | 0,040±0,051 | |
| | | 0,008-0,38 (0,032) | 0,003-0,25 (0,016) | 0,003-0,38 (0,023) | 0,004 |

n: sayı

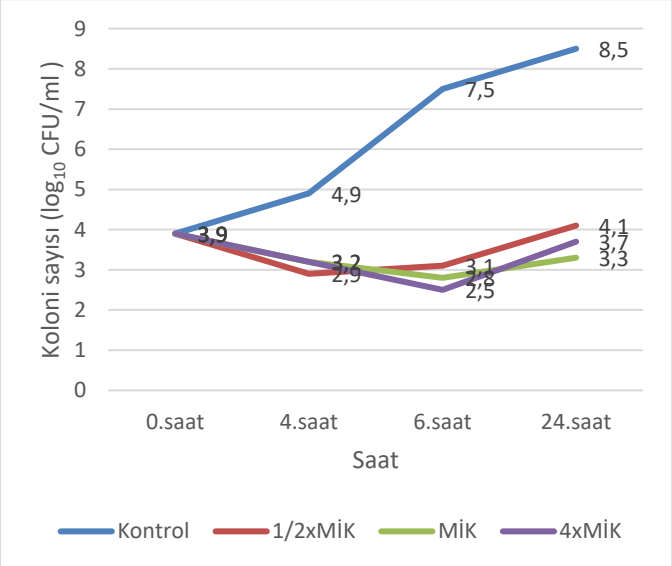
### 4.7. Zamana Bağlı Öldürme Yöntemi Sonuçları

Temsili olarak TD test ile toleran ve toleran olmayan ikişer adet izolat ile birer pozitif ve negatif kontrol izolatları zamana bağlı öldürme yöntemi ile değerlendirilmiştir. TD test sonuçları ile zamana bağlı öldürme yöntemi sonuçları uyumlu bulunmuştur. Toleran ve toleran olmayan izolatların grafikleri ve $\log_{10}$ tabanlı koloni sayımları Şekil 14-15'te gösterilmiştir.




| MYG | Kontrol | 1/2xMİK | MİK | 4xMİK |
|---|---|---|---|---|
| 0.saat | 3,6 | 3,6 | 3,6 | 3,6 |
| 4.saat | 4,6 | 2,5 | 2,2 | 2,6 |
| 6.saat | 6,3 | 2,3 | 1,6 | 0 |
| 24.saat | 8,5 | 1,3 | 1,3 | 0 |

Şekil 14. Toleran olmayan MGY sokak tipi *E. coli* suşuna ait zamana bağlı öldürme grafiği ve $\log_{10}$ tabanlı koloni sayımı




| tbl3a | Kontrol | 1/2xMİK | MİK | 4xMİK |
|---|---|---|---|---|
| 0.saat | 3,9 | 3,9 | 3,9 | 3,9 |
| 4.saat | 4,9 | 2,9 | 3,2 | 3,2 |
| 6.saat | 7,5 | 3,1 | 2,8 | 2,5 |
| 24.saat | 8,5 | 4,1 | 3,3 | 3,7 |

Şekil 15. Toleran tbl3a *E. coli* suşuna ait zamana bağlı öldürme grafiği ve $\log_{10}$ tabanlı koloni sayımı

### 4.8. Otomatize Sistem (WaspLab) ile Tolerans Tayini Sonuçları

Ertapenem duyarlı 350 *E. coli* izolatı otomatize sistem ile değerlendirildiğinde, tüm izolatların 6. veya 7. saatte görünür koloni oluşturmaya başladığı gözlenmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda idrar kültürlerinden izole edilen ertapeneme duyarlı 350 *E. coli* izolatının 57'si (%16,2) ertapeneme tolerans göstermiştir. Toleran izolatlarda ertapenem MİK ortalaması toleran olmayan izolatlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı (p=0,004) derecede yüksek saptanmıştır. Toleran izolatlarda sefepim (p=0,024) ve seftazidime (p=0,047) direnç oranları toleran olmayan izolatlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Artan antibiyotik direnci halk sağlığı açısından giderek büyüyen bir sorun teşkil etmektedir. Yapılan çalışmalar direncin yanında mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı oluşturduğu toleransın da önemli bir tehdit olabileceğini göstermektedir (6, 59). Antibiyotik toleransı, antimikrobiyallere maruz kalan bakterilerin yaşamaya ve çoğalmaya devam etmesine izin veren bir mekanizmadır. Özellikle kronik enfeksiyonlarda antibiyotik tedavisinin başarısızlığında ve relaps/rekürrens gibi durumlarda antibiyotik toleransının önemli rol oynadığı düşünülmektedir (9). Toleransın antibiyotik direncinin gelişmesini kolaylaştırdığı ve tolerans ile direnç gelişimi arasında pozitif bir ilişki olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (6, 8). Bu nedenle, antimikrobiyal direnç ile mücadelede, antibiyotik toleransı tehdidinin de göz ardı edilmemesi gerekmektedir (35, 87).

Türkiye'de ve dünya genelinde klinik örneklerden izole edilmiş izolatlarda toleransı saptamaya yönelik az sayıda araştırma bulunduğu için tolerans epidemiyolojisi hakkında sınırlı veri mevcuttur. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, üropatojenik *E. coli* izolatlarının %22,5'inin tolerans sergilediği bulunmuştur (88). Lazarovitz ve arkadaşlarının, prospektif bir *E. coli* kan dolaşımı enfeksiyonu kohortunda izolatların %8,5'inin toleran olduğu saptanmıştır (12). Cross ve arkadaşlarının altı farklı gram negatif bakteri türündeki 11 izolatla yaptıkları çalışmada, zamana bağlı öldürme deneyleri ile 9 izolatın meropeneme tolerans fenotipi belirlenmiştir. *E. coli, Enterobacter cloacae, Klebsiella*

*pneumoniae, Klebsiella aerogenes, Pseudomonas aeruginosa* ve *Vibrio cholerae*'nın dahil edildiği bu çalışma, gram negatif patojenlerde meropenem toleransının yaygın olduğunu ortaya koymuştur (89). Çalışmamızda idrar kültürlerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında %16,2 gibi yüksek oranda tolerans varlığı saptanmıştır.

Son çalışmalar, tolerans ya da persistans ile antibiyotik direnci arasında bir bağlantı olduğuna işaret etmektedir (4). Bu durum sadece kronik ve tekrarlayan enfeksiyonların yaygınlığında değil, aynı zamanda antibiyotik direncinin ortaya çıkması ve yayılmasında da muhtemelen artışa yol açacaktır. Levin-Reisman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada antibiyotik toleransının, *E. coli*'de antibiyotik direncinin oluşması üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Aralıklı ampisilin maruziyeti altında tutulan *E. coli* kültürlerinde önce toleransın, ardından direncin ortaya çıktığı gösterilmiştir (8).

Çalışmamızda izolatların diğer antibiyotiklere karşı direnç profilleri incelendiğinde, toleran izolatlarda, toleran olmayan izolatlara göre seftriakson, sefuroksim, fosfomisin, gentamisin, nitrofurantoin ve trimetoprim-sulfametoksazol antibiyotiklerine karşı daha yüksek direnç oranı bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, sefepim (p=0,024) ve seftazidim (p=0,047) için direnç oranları istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (Tablo 1).

MİK artışının direnç gelişimi öncesi bir gösterge olduğu bilinmektedir. MİK verilerinin raporlanması ve saklanması, zaman içinde MİK'teki değişimleri tespit etmek ve ortaya çıkan direncin erken teşhisini kolaylaştırmak için bir mekanizma sağlamaktadır (90). Simner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 2007-2009 yılları arasında *E. coli* izolatlarının seftriakson, sefepim ve piperasilin-tazobaktama karşı artan MİK değerleri karşılaştırılmış ve MİK artışının bu antibiyotiklere karşı direnç oranlarındaki artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (91).

Çalışmamızda, toleran olan ve toleran olmayan *E. coli* izolatlarının ertapenem MİK ortalamaları karşılaştırıldığında, toleran izolatlarda ertapenem MİK ortalaması toleran olmayan izolatlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı (p=0,004) derecede yüksek saptanmıştır. Toleran izolatlarda MİK değerinin anlamlı düzeyde yüksek olması ve diğer antibiyotiklere direnç oranının yüksek olması toleransın

antibiyotik direnci gelişiminde öncül bir mekanizma olabileceğine dair önemli bir kanıt niteliği taşımaktadır.

Yapılan bazı çalışmalarda *E coli* izolatlarında çeşitli antibiyotik gruplarına karşı direnç görülme sıklığının yaşla birlikte arttığı gösterilmiştir (92–94) . Fakat tolerans varlığının yaş ile ilişkisini gösteren çalışmalar bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda 19-45 yaş grubunda tolerans varlığı oranının diğer yaş gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunması dikkat çekicidir. Konu ile ilgili çeşitli yaş gruplarını içeren farklı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Toleransın, relaps/rekürrense yol açtığına ve antibiyotik direnci gelişimine neden olabileceği çalışmalar ile gösterilmiştir. Adams-Ward ve arkadaşları tekrarlayan *Legionella pneumophila* enfeksiyonu olan hasta izolatlarında yaptıkları çalışma ile relapsın tolerans ile ilişkisini göstermişlerdir (9). Britt ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada vankomisin toleransı, metisilin duyarlılığına bakılmaksızın *S. aureus* bakteriyemisinde klinik başarısızlıkla ilişkilendirilmiştir (10). Lazarovitz ve arkadaşlarının çalışmasında kan kültürlerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında TD test ile tolerans tespiti yapılmış, toleran izolatlar ile enfekte hastalarda 90 gün içinde relaps oranının toleran olmayan izolatlar ile enfekte hastalara göre önemli ölçüde yüksek olduğu belirtilmiştir (12).

Bizim çalışmamızda toleran *E. coli* suşlarıyla enfekte olduğu tespit edilen 57 hastanın 27'sine tedaviden sonra tekrar idrar kültürü alınmamıştır. Tekrar idrar kültürü alınan 30 hastanın ise 10'unda (%33,3) relaps/rekürrens varlığı tespit edilmiştir. Toleran olmayan *E. coli* izolatlarıyla enfekte olduğu tespit edilen 293 hastadan 128'inde tedavi sonrasında tekrar idrar kültürü alınmazken, tekrar idrar kültürü gönderilen 165 hastadan 64'ünde (%37,9) relaps/rekürrens varlığı tespit edilmiştir (Tablo 2). Toleran ve toleran olmayan izolatlar ile enfekte hastalar için relaps/rekürrens oranları incelendiğinde, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Hastaların farklı sağlık kuruluşlarına başvuruda bulunmuş olma ihtimali relaps/rekürens konusunda kapsamlı bir değerlendirme yapmayı kısıtlamaktadır. Tüm hastaların uzun süreli takibinin yapıldığı prospektif çalışmalar bu konuda faydalı olacaktır.

Toleransın belirlenmesinde en güvenilir yöntem zamana bağlı öldürme yöntemi olup, test parametreleri bakteri türü ve antimikrobiyalin etki

mekanizmasına göre değişmekte, test yoğun emek ve zaman gerektirmektedir (56). Laboratuvarlarda tolerans varlığını daha kolay tespit edebilmek amacıyla Gefen ve arkadaşları, standart disk difüzyon testinin modifikasyonu olan TD testi tanımlamıştır (11). Daha sonra yapılan bazı çalışmalarda da zamana bağlı öldürme yöntemi sonuçları ile TD test sonuçlarının uyumlu olduğu gösterilmiştir. Hana ve arkadaşlarının *S. aureus* izolatlarında vankomisin toleransı TD test sonuçları zamana bağlı öldürme yöntemi ile uyumlu bulunmuştur (84). Lazarovitz ve ark. yaptığı çalışmada *E. coli* izolatlarında ertapenem toleransı TD test sonuçları ile zamana bağlı öldürme yöntemi sonuçları uyumlu bulunmuştur (12). Bizim çalışmamızda da temsili izolatlar ile yapılan zamana bağlı öldürme yöntemi sonuçları TD test sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda, Wasplab sisteminde üreme gecikmesi görüntülemesi kullanılarak tolerans varlığını öngörmeyi amaçladık. Ancak, elde ettiğimiz veriler ışığında, bu yöntemin toleransı belirlemede beklenen etkinliği göstermediği gözlemlenmiştir. Bu sonuç, üreme gecikmesi görüntülemesi ve antimikrobiyal tolerans arasındaki ilişkinin öngörüldüğünden daha karmaşık olabileceğini düşündürmektedir. İleride yapılacak çalışmalarda, farklı parametrelerin ve daha geniş örneklem büyüklüklerinin kullanılması, bu ilişkinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir.

Araştırmamız, Türkiye'de ÜSE'lerden izole edilen *E. coli* izolatlarında tolerans varlığını araştıran ilk çalışma olması açısından öncü bir niteliğe sahiptir. Çok sayıda klinik izolatın değerlendirilmiş olması, elde edilen verinin güvenilirliğini ve temsil gücünü artırmaktadır.

Ertapenem toleransı saptanan *E. coli* izolatlarında, artmış ertapenem MİK değerleri gözlenmiş olması ve diğer antibiyotiklerdeki direnç oranının yüksek olması, toleransın antibiyotik direnci gelişimindeki olası tetikleyici rolüne işaret etmektedir. ECDC/WHO verilerinin yer aldığı Avrupa'da Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı 2023 Raporu'na göre son beş yıl içinde Avrupa bölge ülkelerinde invaziv *E. coli* izolatlarında karbapenem direncinin %0,1'den %0,2'ye, Türkiye'de ise %2,7'den %4,7'ye yükseldiği ve artış eğiliminde olduğu belirtilmiştir (35). Toleran izolatların varlığı ve direnç ile ilişkisi göz önüne alındığında, ülkemizde *E. coli*'de karbapenem direncinin yakından izlenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları arasında hastaların farklı sağlık kuruluşlarına da başvurabileceği ihtimali göz önünde bulundurularak, gerçek relaps/rekürrens sıklığına ulaşılamaması ve örnek gönderimi öncesi ve sonrasındaki antibiyotik kullanımının hasta verilerinden elde edilememesi gösterilebilir. Toleransın yaygınlığını ve tedavi ile ilişkisini daha iyi anlamak için farklı coğrafi bölgeleri ve daha büyük kohortları içeren çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.

# 6. SONUÇ

- Çalışmamızda, idrar kültürlerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında önemli oranda (%16,2) ertapeneme karşı tolerans tespit edilmiştir.
- Toleran olan izolatlarda diğer antibiyotiklere direnç oranlarının ve ertapenem MİK değerlerinin daha yüksek bulunması, toleransın direnç gelişimi için önemli bir faktör olabileceğini düşündürmektedir.
- Toleran izolatlar ile oluşan enfeksiyonlarda tedavi başarısı ve relaps/rekürrens oranlarının incelenmesi ve tedavi başarısızlığının altında yatan mekanizmaların anlaşılması, terapötik yaklaşımların optimize edilmesi açısından faydalı olacaktır.
- *E. coli*'de karbapenem direnci henüz yüksek olmamakla birlikte artış eğilimi göstermektedir. Toleran izolatların varlığı ve direnç ile ilişkisi göz önüne alındığında ülkemizde *E. coli*'de karbapenem direncinin yakından izlenmesi gerektiğine işaret etmektedir.
- Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma Türkiye'den *E. coli* izolatlarında tolerans varlığını ve oranını belirleyen ilk çalışmadır.
- Toleransın yaygınlığını ve tedavi üzerindeki etkisini daha iyi anlamak için farklı coğrafi bölgeleri ve daha büyük kohortları içeren çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.
- Tolerans ve direnç mekanizmaları arasındaki karmaşık etkileşimlerin ve tolerans varlığının klinik süreçlere etkisinin aydınlatılması, klinikte toleran bakteriler ile enfeksiyonların tedavisinin optimize edilmesine yardımcı olacaktır. Bu doğrultuda geliştirilecek stratejiler, direnç gelişiminin önlenmesi ve enfeksiyonların daha hızlı kontrol altına alınmasında etkili olacaktır.

# KAYNAKLAR


1. Huemer, Markus, et al. "Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives." *EMBO reports* 21.12 (2020): e51034.

2. Fitzpatrick, J. M., et al. "Gram-negative bacteraemia; a multi-centre prospective evaluation of empiric antibiotic therapy and outcome in English acute hospitals." *Clinical Microbiology and Infection* 22.3 (2016): 244-251.

3. Tacconelli, Evelina, et al. "Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis." *The Lancet infectious diseases* 18.3 (2018): 318-327.

4. Brauner, Asher, et al. "Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment." *Nature Reviews Microbiology* 14.5 (2016): 320-330.

5. Ronneau, Séverin, Peter WS Hill, and Sophie Helaine. "Antibiotic persistence and tolerance: not just one and the same." *Current Opinion in Microbiology* 64 (2021): 76-81.

6. Levin-Reisman, Irit, et al. "Epistasis between antibiotic tolerance, persistence, and resistance mutations." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.29 (2019): 14734-14739.

7. Liu, Jiafeng, et al. "Effect of tolerance on the evolution of antibiotic resistance under drug combinations." *Science* 367.6474 (2020): 200-204.

8. Levin-Reisman I, Ronin I, Gefen O, Braniss I, Shoresh N, Balaban NQ. 2017. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. Science (1979) 355:826–830.

9. Adams-Ward, Xanthe, et al. "Bacterial persistence in Legionella pneumophila clinical isolates from patients with recurring legionellosis." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 13 (2023).

10. Kuehl R, Morata L, Meylan S, Mensa J, Soriano A. 2020. When antibiotics fail: A clinical and microbiological perspective on antibiotic tolerance and persistence of Staphylococcus aureus. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Oxford University Press https://doi.org/10.1093/jac/dkz559.

11. Gefen, Orit, et al. "TDtest: easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay." *Scientific reports* 7.1 (2017): 41284.

12. Lazarovits, Gilad, et al. "Prevalence of Antibiotic Tolerance and Risk for Reinfection Among Escherichia coli Bloodstream Isolates: A Prospective Cohort Study." *Clinical Infectious Diseases* 75.10 (2022): 1706-1713.

13. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. St Louis: Mosby Inc; 2002. pp 285-96.

14. Murray, Patrick R., Ken S. Rosenthal, and Michael A. Pfaller. *Medical microbiology*. Elsevier Health Sciences, 2021. pp 258-270.

15. Washington WJ, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. pp 623-71.

16. Mandell GL, Bennett JE (John E, Dolin Raphael. 2010. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone/Elsevier. pp 2503-2515.

17. Kucheria, R., et al. "Urinary tract infections: new insights into a common problem." *Postgraduate medical journal* 81.952 (2005): 83.

18. Kang CI, Kim J, Park DW, Kim BN, Ha US, Lee SJ, Yeo JK, Min SK, Lee H, Wie SH. 2018. Clinical practice guidelines for the antibiotic treatment of community-acquired urinary tract infections. Infect Chemother 50:67–100.

19. Foxman, Betsy. "The epidemiology of urinary tract infection." *Nature Reviews Urology* 7.12 (2010): 653-660.

20. Yang, Xiaorong, et al. "Disease burden and long-term trends of urinary tract infections: A worldwide report." *Frontiers in Public Health* 10 (2022): 888205.

21. Vos T, Lim SS, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi M, Abbasifard M et.al.2020. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. The Lancet 396:1204–1222.

22. Lee, Dong Sup, Seung-Ju Lee, and Hyun-Sop Choe. "Community-acquired urinary tract infection by Escherichia coli in the era of antibiotic resistance." *BioMed research international* 2018 (2018).

23. Batir E, Sağlığı H, Müdürlüğü G, Altun D. Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı (USHİESA) Etken Dağılımı ve Antibiyotik Direnç Raporu 2021. Coşkun, Ömer. "Rekürren üriner sistem enfeksiyonları." Gülhane Tıp Dergisi 50.3 (2008): 226-231.

24. Bunduki, Gabriel Kambale, et al. "Virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic Escherichia coli (UPEC) isolated from urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis." *BMC infectious diseases* 21 (2021): 1-13.

25. Urological Infections EAU Guidelines available.2023 on: https://uroweb.org/guidelines/urological-infections

26. Montelin, Hanna, et al. "Treatment, outcomes and characterization of pathogens in urinary tract infections caused by ESBL-producing Enterobacterales: a prospective multicentre study." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2024): dkad402.

27. Silverman JA, Schreiber HL, Hooton TM, Hultgren SJ. 2013. From physiology to pharmacy: Developments in the pathogenesis and treatment of recurrent urinary tract infections. Curr Urol Rep 14:448–456.

28. Allison, Kyle R., Mark P. Brynildsen, and James J. Collins. "Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them." *Current opinion in microbiology* 14.5 (2011): 593-598.

29. Grant, Sarah Schmidt, and Deborah T. Hung. "Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response." *Virulence* 4.4 (2013): 273-283.

30. Rocha-Granados, Maria C., et al. "The social network: Impact of host and microbial interactions on bacterial antibiotic tolerance and persistence." *Cellular Signalling* 75 (2020): 109750.

31. Mortazavi-Tabatabaei, Seyed Abdol Reza, et al. "Pattern of antibacterial resistance in urinary tract infections: A systematic review and meta-analysis." *International Journal of Preventive Medicine* 10 (2019).

32. Dünya Sağlık Örgütü. Antibiyotik Direnci Bilgi Formu. Cenevre: Dünya Sağlık Örgütü; 2023. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance 2023.

33. The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms, version 14. EUCAST, Växjö, Sweden. 2024.

34. Bush, Karen, and George A. Jacoby. "Updated functional classification of β-lactamases." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54.3 (2010): 969-976.

35. ECDC. "Antimicrobial resistance surveillance in Europe." (2023): 1-208.

36. Levin-Reisman, Irit, Ofer Fridman, and Nathalie Q. Balaban. "ScanLag: high-throughput quantification of colony growth and lag time." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 89 (2014): e51456.

37. Michaux, Charlotte, et al. "Antibiotic tolerance and persistence have distinct fitness trade-offs." *Plos Pathogens* 18.11 (2022): e1010963.

38. Santi, Isabella, et al. "Evolution of antibiotic tolerance shapes resistance development in chronic Pseudomonas aeruginosa infections." *MBio* 12.1 (2021): 10-1128.

39. Tuomanen, Elaine, et al. "The rate of killing of Escherichia coli byβ-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth." *Microbiology* 132.5 (1986): 1297-1304.

40. Ortiz-Padilla M, Diaz-Diaz S, Machuca J, Tejada-Gonzalez A, Recacha E, Docobo-Pérez F, Pascual A, Rodríguez-Martínez JM. 2020. Role of low-level quinolone resistance in generating tolerance in Escherichia coli under therapeutic concentrations of ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother 75:2124–2132.

41. Brauner A, Shoresh N, Fridman O, Balaban NQ. 2017. An Experimental Framework for Quantifying Bacterial Tolerance. Biophys J 112:2664–2671.

42. Liu, Jia-Feng, et al. "Interaction tolerance detection test for understanding the killing efficacy of directional antibiotic combinations." *Mbio* 13.1 (2022): e00004-22.

43. Zhang, Ying, Wing Wai Yew, and Michael R. Barer. "Targeting persisters for tuberculosis control." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56.5 (2012): 2223-2230.

44. Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Beer K, McKay G, Siehnel R, Schafhauser J, Wang Y, Britigan BE, Singh PK. 2011. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. Science (1979) 334:982–986.

45. Kwan BW, Valenta JA, Benedik MJ, Wood TK. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. Antimicrob Agents Chemother (2013) 57:1468–1473.

46. Madar, Daniel, et al. "Promoter activity dynamics in the lag phase of Escherichia coli." *BMC systems biology* 7.1 (2013): 1-13.

47. Fridman O, Goldberg A, Ronin I, Shoresh N, Balaban NQ. 2014. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. Nature 513:418–421.

48. Luidalepp H, Jõers A, Kaldalu N, Tenson T. 2011. Age of inoculum strongly influences persister frequency and can mask effects of mutations implicated in altered persistence. J Bacteriol 193:3598–3605.

49. Gefen, Orit, et al. "Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.16 (2008): 6145-6149.

50. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. 2004. Bacterial persistence as a phenotypic switch. Science (1979) 305:1622–1625.

51. Gefen, Orit, and Nathalie Q. Balaban. "The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress." *FEMS microbiology reviews* 33.4 (2009): 704-717.

52. Leatham-Jensen, Mary P., et al. "Uropathogenic Escherichia coli metabolite-dependent quiescence and persistence may explain antibiotic tolerance during urinary tract infection." *Msphere* 1.1 (2016): 10-1128..

53. Lewis, Kim. "Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance." *Antibiotic resistance* (2012): 121-133.

54. Rotem, Eitan, et al. "Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.28 (2010): 12541-12546..

55. Korch, Shaleen B., and Thomas M. Hill. "Ectopic overexpression of wild-type and mutant hipA genes in Escherichia coli: effects on macromolecular synthesis and persister formation." *Journal of bacteriology* 188.11 (2006): 3826-3836.

56. Leber, Amy L. Clinical microbiology procedures handbook. John Wiley & Sons, 2020. pp 5.14.2.1-5.14.2.12

57. Lewis, Kim. "Persister cells, dormancy and infectious disease." *Nature Reviews Microbiology* 5.1 (2007): 48-56.

58. Sulaiman, Jordy Evan, and Henry Lam. "Evolution of bacterial tolerance under antibiotic treatment and its implications on the development of resistance." *Frontiers in microbiology* 12 (2021): 617412.

59. Windels, Etthel M., et al. "Antibiotics: combatting tolerance to stop resistance." *MBio* 10.5 (2019): 10-1128.

60. Kaspy, Ilana, et al. "HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase." *Nature communications* 4.1 (2013): 3001.

61. Zhu, Manlu, Haoyan Mu, and Xiongfeng Dai. "Integrated control of bacterial growth and stress response by (p) ppGpp in Escherichia coli: A seesaw fashion." *Iscience* 27.2 (2024).

62. Mohiuddin, Golam, Aslan and Orman. "High-throughput screening of a promoter library reveals new persister mechanisms in Escherichia coli." *Microbiology Spectrum* 10.1 (2022): e02253-21.

63. Ospino, Katia, and Beny Spira. "Glyphosate affects persistence and tolerance but not antibiotic resistance." *BMC microbiology* 23.1 (2023): 1-10.

64. Harms, Alexander, Etienne Maisonneuve, and Kenn Gerdes. "Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure." *Science* 354.6318 (2016): aaf4268.

65. Pacios, Olga, et al. "(p) ppGpp and its role in bacterial persistence: new challenges." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 64.10 (2020): 10-1128.

66. Goormaghtigh, Frédéric, et al. "Reassessing the role of type II toxin-antitoxin systems in formation of Escherichia coli type II persister cells." *MBio* 9.3 (2018): 10-1128.

67. Schumacher, Maria A., et al. "HipBA–promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance." *Nature* 524.7563 (2015): 59-64.

68. Wu, Nan, et al. "Ranking of persister genes in the same Escherichia coli genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics." *Frontiers in microbiology* 6 (2015): 1003.

69. Zheng, Erica J., et al. "Modulating the evolutionary trajectory of tolerance using antibiotics with different metabolic dependencies." *Nature Communications* 13.1 (2022): 2525.

70. Murakami, Keiji, et al. "Explorative gene analysis of antibiotic tolerance-related genes in adherent and biofilm cells of Pseudomonas aeruginosa." *Journal of Infection and Chemotherapy* 23.5 (2017): 271-277.

71. Thöming, Janne G., and Susanne Häussler. "Pseudomonas aeruginosa is more tolerant under biofilm than under planktonic growth conditions: a multi-isolate survey." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 12 (2022): 851784.

72. Soares, Anaïs, et al. "Understanding ciprofloxacin failure in Pseudomonas aeruginosa biofilm: persister cells survive matrix disruption." *Frontiers in microbiology* 10 (2019): 2603.

73. Lewis, K. "Multidrug tolerance of biofilms and persister cells." *Bacterial biofilms* (2008): 107-131.

74. Ciofu, Oana, and Tim Tolker-Nielsen. "Tolerance and resistance of Pseudomonas aeruginosa biofilms to antimicrobial agents—how P. aeruginosa can escape antibiotics." *Frontiers in microbiology* 10 (2019): 913.

75. Bernier, Steve P., et al. "Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin." *PLoS genetics* 9.1 (2013): e1003144.

76. Schiessl, Konstanze T., et al. "Phenazine production promotes antibiotic tolerance and metabolic heterogeneity in Pseudomonas aeruginosa biofilms." *Nature communications* 10.1 (2019): 762.

77. Westblade, Lars F., Jeff Errington, and Tobias Dörr. "Antibiotic tolerance." *PLoS pathogens* 16.10 (2020): e1008892.

78. Defraine, Valerie, Maarten Fauvart, and Jan Michiels. "Fighting bacterial persistence: Current and emerging anti-persister strategies and therapeutics." *Drug Resistance Updates* 38 (2018): 12-26.

79. Khan, Fazlurrahman, et al. "Treatment strategies targeting persister cell formation in bacterial pathogens." *Critical Reviews in Microbiology* 46.6 (2020): 665-688.

80. Meylan, Sylvain, Ian W. Andrews, and James J. Collins. "Targeting antibiotic tolerance, pathogen by pathogen." *Cell* 172.6 (2018): 1228-1238.

81. Mishra, Alok K., et al. "Unlocking the enigma of phenotypic drug tolerance: Mechanisms and emerging therapeutic strategies." *Biochimie* (2023).

82. Töreci K, 1993. Postantibiyotik etki ve bakterilerde antibiyotiklere karşı tolerans. Ankem 7:196-204.

83. Lewis JS, Weinstein MP, Bobenchik AM, Cameau S, Cullen SK, Dingle T,et al. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100: performance standards for antimicrobial susceptibility testing.

84. Kotková, Hana, et al. "Evaluation of TD test for analysis of persistence or tolerance in clinical isolates of Staphylococcus aureus." *Journal of microbiological methods* 167 (2019): 105705.

85. Turner, Paul, et al. "Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively (MICRO): a framework for the reporting and interpretation of clinical microbiology data." *BMC medicine* 17.1 (2019): 1-8..

86. Von Elm, Erik, et al. "The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies." *The Lancet* 370.9596 (2007): 1453-1457.

87. Lewis, Kim. "The science of antibiotic discovery." *Cell* 181.1 (2020): 29-45.

88. Leatham-Jensen, Mary P., et al. "Uropathogenic Escherichia coli metabolite-dependent quiescence and persistence may explain antibiotic tolerance during urinary tract infection." *Msphere* 1.1 (2016): 10-1128.

89. Cross, Trevor, et al. "Spheroplast-mediated carbapenem tolerance in Gram-negative pathogens." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63.9 (2019): 10-1128.

95. Gajic, Ina, et al. "Antimicrobial susceptibility testing: A comprehensive review of currently used methods." *Antibiotics* 11.4 (2022): 427.

90. Simjee, S., et al. "Present and future surveillance of antimicrobial resistance in animals: principles and practices." *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals* (2018): 595-618.

91. Simner, Patricia J., et al. "Prevalence and characterization of extended-spectrum β-lactamase–and AmpC β-lactamase–producing Escherichia coli: results of the CANWARD 2007–2009 study." *Diagnostic microbiology and infectious disease* 69.3 (2011): 326-334.

92. Swami, Sanjeev K., et al. "Incidence of antibiotic-resistant Escherichia coli bacteriuria according to age and location of onset: a population-based study from Olmsted County, Minnesota." *Mayo Clinic Proceedings*. Vol. 87. No. 8. Elsevier, 2012.

93. Blaettler, L., et al. "Secular trend and risk factors for antimicrobial resistance in Escherichia coli isolates in Switzerland 1997–2007." *Infection* 37 (2009): 534-539.

94. Adam, Heather J., et al. "Comparison of pathogens and their antimicrobial resistance patterns in paediatric, adult and elderly patients in Canadian hospitals." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68.suppl_1 (2013): i31-i37.