ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IRAKLI HASTALARDA ÜROPATOJENİK *ESCHERICHIA COLI*'DE SİDEROFORLARI KODLAYAN GENLERİN ARAŞTIRILMASI

Raed Amer Ali ALSAHOO

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Raed Amer Ali ALSAHOO tarafından hazırlanan**"Iraklı Hastalar'da Üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC)'de Sideroforları Kodlayan Genlerin Araştırılması"**adlı tez çalışması 28/02/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin ÜniversitesiFen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman **:** Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT

Eş Danışman : Prof. Dr. Hayfa Hadi Hassani ALATTİYA

Jüri Üyeleri :

Başkan **:**Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Eldivan SHMYO, Veterinerlik Bölümü
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye **:** Doç. Dr. Mustafa Sencer KARAGÜL
Kartepe Atçılık MYO Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü
Kocaeli Üniversitesi

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Eldivan SHMYO, Veterinerlik Bölümü
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**IraklıHastalardaÜropatojenik*Escherichia coli*'deSideroforlarıKodlayanGenlerin Araştırılması**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (28/02/2022).

Raed Amer Ali ALSAHOO

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

IRAKLI HASTALARDA ÜROPATOJENİK*ESCHERICHIA COLI*'DE SİDEROFORLARIKODLAYAN GENLERİN ARAŞTIRILMASI

Raed Amer Ali ALSAHOO

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Eş Danışman: Prof. Dr. Hayfa Hadi Hassani ALATTİYA

Bu çalışma, Iraklı idrar yolu enfeksiyonu (İYE) olan hastalardan izole edilen üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC) izolatlarında demir iyonlarının siderofor genlerinin (*iucA, iroN* ve *irp2*) ekspresyonu üzerine etkisini araştırmayı amaçlamaktadır.Farklı yaş gruplarından idrar yolu enfeksiyonu (İYE) şüphesi olan hastalardan idrar örnekleri (230) alınmıştır.Bu örneklerin farklı kültür ortamlarında kültürlenmesinden sonra, örneklerin 109'u (%68,81) *E. coli* ile enfekte olurken, örneklerin 51'i (%22,17) negatif üreme göstermiştir.Cinsiyete göre bakıldığında kadınlar erkeklere göre İYE'den daha fazla etkilenmektedir ($p \leq 0,05$) ve enfeksiyon yüzdesi sırasıyla %68,81 ve %31,19 olmuştur.Daha sonraUPEC izolatlarının antibiyotiklere direnci araştırılmış ve bunun sonucunda izolatların ampisilin ve amoksisilin/klavulanik aside yüksek dirençli (%98) olduğu görülmüştür.İYE'lerin kalıcılığı ve tekrarlanmasındaki en önemli faktör, UPEC'in biyofilm oluşturma yeteneğidir ve bu çalışmadaki UPEC izolatlarının %77,5'i biyofilm üreticisi olarak tespit edilmiştir. Biyofilm üreten UPEC izolatlarında ürovirülans belirteci olarak siderofor üretimi, siderofor üretimini kodlayan genlerin, yersiniabaktin geninin *(ırp2*), salmokelin geninin *(iroN)* ve aerobaktin geninin (*lucA*) PCR kullanılarak yükseltilmesiyle tespit edilmiştir.Sonuçlar bakterilerde biyofilm oluşumu ile siderofor üretimi arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir. Ayrıca, UPEC izolatlarında 1 mM demir ve ferrik iyonlarının (Fe2 +, Fe3 +) siderofor genlerinin (*irp2, iroN ve iucA*) ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi gerçek zamanlı PCR kullanılarak araştırılmıştır.Sonuçlar, demir iyonunun siderofor üretimini kodlayan genlerin ekspresyonunu indüklediğini, özellikle *iucA* geninin ekspresyonunda önemli bir ($p \leq 0,01$) yukarı regülasyon fark edildiğini göstermiştir.Buna karşılık, 1mM demir iyonu siderofor genleriniönemli ölçüde ($p \leq 0,05$) aşağı regüle etmiştir.

2022, 68 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Üropatojenik *Escherichia coli*, Aerobaktin, Salmokelin, Yersiniabaktin, Siderofor sistemleri, Gen ekspresyonu

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF GENES CODING SIDEROPHORES IN UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* IN IRAQI PATIENTS

Raed Amer Ali ALSAHOO

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Asst. Dr. Müge FIRAT
Co-Advisor: Prof. Dr. Hayfa Hadi Hassani ALATTİYA

This study is aimed to investigate the influence of iron ions on the expression of siderophore genes (*iucA, iroN, and irp2*) in uropathogenic *Escherichia coli*(UPEC) isolates that isolated from Iraqi patients with urinary tract infections(UTIs).Urine samples (230) were collected from patients suspected of urinary tract infections (UTIs) at different ages.After culturing these samples on different culture media, 109 (68.81%) of samples were infected with *E. coli* while 51(22.17%) of samples were negative growth. According to the gender, women were more effected with UTIs than men with significant differences ($p \leq 0.05$) the percentage of infection was 68.81% and 31.19% respectively. The resistance of UPEC isolates to antibiotics was investigaed, the isolates were high resist (98%) to ampicillin and amoxicillin/clavulanic acid. The most important factor in the persistence and recurrence of UTIs is the ability of UPEC to form a biofilm, and in this study 77.5% of UPEC isolates were biofilm producers. The siderophore production as urovirulence marker in biofilm-producing UPEC isolates was detected by amplifying genes encoding siderophore production, yersiniabactin gene (*irp2*), salmochelin gene (*iroN*) and aerobactin gene (*iucA*) using PCR. The results demonstrated a positive correlation between biofilm formationand siderophore production in bacteria. Furthermore, the effect of 1 mM of iron and ferric ions (Fe 2+, Fe 3+) on expression level of siderophore genes (*irp2, iroN, and iucA*) in UPEC isolates was investigated using real-time quantitative PCR. The results indicated ferrous ion induced the expression of the genes encoding siderophore production, particularly a significant ($p \leq 0.01$) upregulation was noticed in the expression of iucA gene. In contrast, 1 mM ferrric ion was significantly ($p \leq 0.05$) downregulated siderophore genes.

2022, 68 pages

Keywords: Uropathogenic *Escherichia coli*, Aerobactin, Salmochelin, Yersiniabactin, Siderophore systems, Gene expression

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana yardım eden ve işimi tamamlama gücü veren Yüce Allah'a hamdolsun. Bu çalışmanın sonucunun canlı anlarını bu sayfaya koymak istiyor, onlarla gurur duyuyor ve bu işi yapmak için gerekli olan insanlara teşekkür etme fırsatını yakaladım. Tez boyunca verdiği rehberlik ve teşvik için danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT'a en derin teşekkürlerimi sunarım. Tezin bölümlerine yaptığı değerli yorumları ve beni her zaman çok çalışmaya teşvik eden sözleriyle tüm çalışmayı zenginleştirmiştir. Bu tez, danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT ve Prof. Dr. Hayfa Hadi Hassani ALATTİYA ile ortak çalışmanın başarılı bir sonucudur. Kendilerine tekrar en içten teşekkürlerimi ve takdirlerimi sunuyorum. Biyoloji AnaBilim Dalı Başkanına ve bölümün tüm öğretim üyelerine en derin teşekkürlerimi sunarım.

Bana yardım eden sayın hocam Prof. Dr. Serkan YILMAZ'a saygılarımı sunarım. Beni her zaman destekleyen sevgili aileme, babama, anneme, kardeşlerim; ablam Dr. Noor ALSAHOO, abim Ahmed ALSAHOO ve Huda ALSAHOO'ya, kuzenim Hiba ALSAHOO ve diğer kuzenlerim Ahmed MAHSİN, Mahmmod, Saleh ve Ahmed NASER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.Bana her aşamada yardım, destek ve güç veren amcalarım Sayın Naser ALSAHOO ve Sayın Dr. Hussein ALSAHOO'ya teşekkürlerimi, saygılarımı ve takdirlerimi sunarım.

Tüm Türk halkına yürekten teşekkürlerimi saygılı bir şekilde takdim ediyorum.Yoldaşım ve Hayatımın çiçeğine destekleri için teşekkürlerimi ve takdirlerimi sunarım. Gurbette yanımda olan ve destek veren dostlarım Sayın Abbas ALİSAWİ ve Sayın Hasanain OBAİD'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Bana iyi sözler söyleyen, destek veren ve benim için hayırlı dilekler isteyen arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Raed Amer Ali ALSAHOO

Çankırı, Şubat2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **viii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **iix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 İdrar Yolu Enfeksiyonları (İYE) **3**
2.2 İdrar Yolu Enfeksiyonlarının Sınıflandırılması **5**
2.2.1 Alt idrar yolu enfeksiyonları **5**
2.2.2 Üst idrar yolu enfeksiyonları **5**
2.2.3 Komplike idrar yolu enfeksiyonları **5**
2.2.4 Komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonları **6**
2.2.5 Tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları **6**
2.3 *Escherichia coli* **7**
2.4 Enfeksiyon Bölgesine Göre *E. coli* Türleri **8**
2.4.1 Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC) **8**
2.4.2 Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC) **9**
2.4.3 Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC) **10**
2.4.4 Enteroinvaziv *Escherichia coli* (EIEC) **11**
2.4.5 Enteroagregatif *Escherichia coli* (EAEC) **11**
2.4.6 Diffüz yapışık *Escherichia coli* (DAEC) **12**
2.5 Bağırsak Dışı Patojenik *Escherichia coli* (ExPEC) **12**
2.5.1 Yenidoğan menenjiti *E. coli* (NMEC) **13**
2.5.2 Sepsis ile ilişkili *E. coli* (SEPEC) **13**
2.5.3 Kuş patojenik *E. coli* (APEC) **14**

2.5.4 Üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC) 14
2.6 Üropatojenik *Escherichia coli* Virülans Faktörleri 15
2.6.1 Biyofilm oluşumu 16
2.6.2 Siderofor üretme 17
2.6.3 Enterobaktin 17
2.6.4 Salmokelin 18
2.6.5 Aerobaktin 19
2.6.6 Yersiniabaktin 20
3. MATERYAL VE YÖNTEM 21
3.1 Materyal 21
3.1.1 Laboratuvar ekipmanları 21
3.1.2 Reaktifler ve kimyasallar 22
3.1.3 Antibiyotikler 22
3.1.4 Kültür ortamı 23
3.2 Yöntem 24
3.2.1 Deneysel tasarım ve çalışma grupları 24
3.2.2 İdrar örneklerinden üropatojenik *Escherichia coli*'nin mikroskobik ve kültürel incelemeleri 24
3.3 Çözeltilerin, Tamponların ve Reaktiflerin Hazırlanması 26
3.4 Üropatojenik *Escherichia coli* İzolatlarının Tanımlanması için Biyokimyasal Testler 28
3.5 Vitek2 29
3.6 Antimikrobiyal Duyarlılık Testi 29
3.7 UPEC İzolatlarından Biyofilm Üretiminin Ölçümü 30
3.8 Bakteri İzolatlarının Saklanması 31
3.9 UPEC İzolatları Tarafından Siderofor Üretiminin Tespiti 31
3.10 UPEC İzolatlarında Siderofor Genlerinin Saptanması için Moleküler Analiz 32
3.10.1 UPEC izolatlarından DNA ekstraksiyonu 32
3.10.2 DNA konsantrasyonunun belirlenmesi 32
3.10.3 UPEC izolatlarında siderofor genlerinin (irp2, iroN ve iucA) PCR ile belirlenmesi 33
3.11 Demir İyonlarının UPEC İzolatlarında Siderofor Üretimini Kodlayan İfade Genleri Üzerindeki Etkisi 34

3.11.1 Fe 2+ ve Fe 3+ stok çözeltilerinin hazırlanması 34
3.11.2 Kültür ortamı 34
3.11.3 Gerçek zamanlı PCR ile UPEC izolatlarında siderofor üretimini kodlayan ifade genlerinin (*irp2, iroN* ve *iucA*) tespiti 34
3.12İstatistiksel Analiz 36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 37
4.1 Hastalarda Üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC) Dağılımı 37
4.2 UPEC İzolatlarının Kültürel Özellikleri 38
4.3 UPEC İzolatlarının Biyokimyasal Özellikleri 39
4.4 UPEC İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı 41
4.5 UPEC İzolatları Tarafından Biyofilm Oluşumu 43
4.6 UPEC İzolatlarında Ürovirülans Belirteci Olarak Siderofor 44
4.6.1 UPEC izolatlarından DNA ekstraksiyonu 44
4.6.2 UPEC izolatları ile siderofor üretimi 45
4.6.3 Demir iyonlarının (Fe2+, Fe3+) UPEC izolatları tarafından siderofor üretimini kodlayan genlerin ifadesi üzerindeki etkisi 46
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 51
KAYNAKLAR 52
ÖZGEÇMİŞ 69

SİMGELER DİZİNİ

bp	Baz çifti
°C	Santigrat derece
CFU	Koloni oluşturma birimi
CT	Eşik döngüsü
g	Gram
Ib/In²	İnç kare başına pound
Kb	Kilobaz
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
ng	Nanogram
pg	Petagram
pmol	Pikomol
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
ΔCT	Delta CT
ΔΔCT	Delta delta CT
σ^{70}	Sigma 70 faktörü
%	Yüzde
*	Önemli

KISALTMALAR DİZİNİ

ABÜ	Asemptomatik bakteriüri
AİYE	Alt idrar yolu enfeksiyonları
APEC	Kuş patojenik*Escherichia coli*
BBD	Mesane ve bağırsak disfonksiyonu
BFP	Demet oluşturan demetler
BSİ	Kan dolaşımı enfeksiyonları
DAEC	Diffüz yapışık *Escherichia coli*
DBÜSA	Böbrek ve üriner sistem konjenital anomalileri
EAEC	Enteroagregatif *Escherichia coli*
EHEC	Enterohemorajik *Escherichia coli*
EIEC	Enteroinvaziv *Escherichia coli*
EPEC	Enteropatojenik *Escherichia coli*
ETEC	Enterotoksijenik *Escherichia coli*
EXPEC	Bağırsak dışı patojenik *Escherichia coli*
GI	Gastrointestinal
HUS	Hemolitik üreemik sendromu
İYE	İdrar yolu enfeksiyonu
KİYE	Komplike idrar yolu enfeksiyonları
KOİYE	Komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonları
LA	Yerel yapışma
LEE	Enteropatojenik lokus
NMEC	Neonatal menenjit*Escherichia coli*
PAI	Patojenik bağırsak adacık bölgesi
SEPEC	Sepsis ile ilişkili*Escherichia coli*
STX	Shiga toksini
T3SS	Tip ııı salgılama sistemlerine
T-EPEC	Tipikenteropatojenik *Escherichia coli*
TİYE	Tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları
UPEC	Üropatojenik*Escherichia coli*
ÜİYE	Üst idrar yolu enfeksiyonları
VF	Virülans faktörlerine
VÜR	Vezikoüreteral reflü
YBT	Yersiniabactin
α -EPEC	Atipik enteropatojenik *Escherichia coli*

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 İdrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan alınan idrar numunelerinde enfeksiyon yüzdesi 36
Şekil 4.2 Cinsiyete göre hastalarda İYE yüzdesi ve dağılımı 37
Şekil 4.3 Farklı kültür ortamlarında UPEC izolatlarının özellikleri 38
Şekil 4.4 UPEC izolatlarında antibiyotiklere direnç 40
Şekil 4.5 UPEC adalarında biyofilm oluşumunun yüzdesi 43
Şekil 4.6 UPEC izolatlarında 1 mM Fe 2+'nın irp2 ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi 45
Şekil 4.7 UPEC izolatlarında 1 mM Fe 2+'nın demirN ekspresyon düzeyine etkisi. 46
Şekil 4.8 UPEC izolatlarında 1 mM Fe2+'nın iucA ekspresyon düzeyine etkisi 47
Şekil 4.9 UPEC izolatlarında 1 mM Fe 3+'nın *irp2* ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi 48
Şekil 4.10 UPEC izolatlarında 1 mM Fe 3+'nın iroN ekspresyon düzeyine etkisi 48
Şekil 4.11 UPEC izolatlarında 1 mM Fe3+'nın iucA ekspresyon düzeyine etkisi 48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanları 21
Çizelge 3.2 Mevcut çalışmada kullanılan kimyasallar ve reaktifler 22
Çizelge 3.3 İYE'li hastalarda yaygın olarak kullanılan antibiyotikler 23
Çizelge 3.4 Bu çalışmada kullanılan kültür besiyerleri 23
Çizelge 3.5 Bakteriyel yapışmanın sınıflandırılması 30
Çizelge 3.6 UPEC izolatlarında irp2, iroN ve iucA genlerinin PCR amplifikasyonu için primer çiftleri 33
Çizelge 3.7Bu çalışmada gerçek zamanlı PCR için kullanılan primerler 35
Çizelge 4.1UPEC izolatlarının biyokimyasal özellikleri 39
Çizelge 4.2 Farklı biyofilm formasyonu profiline sahip upec izolatlarında sideroforu kodlayan genler 44

1. GİRİŞ

İdrar Yolu Enfeksiyonu (İYE), mikroorganizmaların idrar yolunun herhangi bir yerinde bulunması ve üremesinden kaynaklanan bir enfeksiyondur ve insanlarda belki de en sık görülen bakteriyel enfeksiyondur (Okonko *et al.*2010).Her yıl milyonlarca insanı etkileyen ciddi bir sağlık sorunudur (O'Brien *et al.*2020, Okonko *et al.*2010). Hem toplum hem de hastane ortamlarında, her iki cinsiyette de tüm yaş gruplarında İYE bildirilmiştir. Semptomatik idrar yolu enfeksiyonu (İYE) için yüksek risk altındaki bireyler arasında yeni doğanlar, okulöncesi kızlar, cinsel olarak aktif kadınlar ve yaşlı kadınlar ve erkekler bulunmaktadır, bir İYE için diğer önemli risk faktörleri böbreklerin ve idrar yollarının konjenital malformasyonları (CAKUT) sebebiyle mesane ve bağırsak disfonksiyonu olmaktadır (BBD) (Mattoo *et al.*2021).

Genellikle İYE'ler kadınlarla ilişkilidir, çünkü yaşamları boyunca etkilenme olasılıkları %50'ye kadar çıkmaktadır ve etkilenme olasılıkları erkeklerden yaklaşık 6 kat daha fazla olmaktadır (Waller *et al.*2018). İdrar Yolu Enfeksiyonları, idrar yolunu oluşturan üretra, mesane, üreterler veya böbreklerin enfeksiyonlarıdır, bu tür bir enfeksiyon ya yalnızca alt idrar yolunda (üretrit, sistit, üretrosistit) kendini göstermektedir veya renal pelvis ve böbrekleri etkilemektedir (sistopyelit, piyelonefrit) (Komala and Kumar 2013). İYE'lerin yaklaşık %95'ine *Klebsiella pneumoniae, Enterococcus sp.* ve *Staphylococcus saprophyticus* gibi bakteriler neden olmaktadır, ancak en yaygın olanı *Escherichia coli'dir* (Karigoudar *et al.*2019, Dadi *et al.*2020).

Escherichia coli(E. coli), tüm komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonlarının (İYE) %50-90'ını oluşturan en sık izole edilen idrar patojenidir. Periüretral bölgeyi kolonize edebilen, idrar yoluna girebilen ve semptomatik hastalığa neden olabilen bir fekal *E. coli* alt grubu olduğu kabuledilmektedir. Bunlar şu anda üropatojenik *E. coli* (UPEC) olarak tanımlanmaktadır (Vagarali2009).

UPEC suşları, hastalığa neden olma kapasitelerine katkıda bulunan hem yapısal (fimbria, pili, curli, flagella gibi) hem de salgılanmış (toksinler, demir alım sistemleri)

çok sayıda virülans faktörüne sahiptir; üriner sistem patojenitenin en önemli belirleyicisini temsil etmektedir (Terlizzi *et al.*2017).

Demir alımı, idrar yolu gibi demirin sınırlı olduğu birortamda UPEC'nin hayatta kalması için kritik bir gereklilik olmaktadır (Skaar2010). Bu nedenle, UPEC'in demir elde etmek için fazlalık sistemlerin düzenlenmesini göstermesi şaşırtıcı bulunmamaktadır (Reigstad *et al.*2007). Bu bağlamda, sideroforlar, UPEC suşları tarafından ferrik demiri (Fe3+) temizlemek için üretilen küçük moleküllü demir şelatörleridir, bu nedenle UPEC, aerobaktin, salmokelin, enterobaktin ve yersiniabaktin olmak üzere dört tip sideroforu ifade etmektedir (O'Brien *et al.* 2016).

Bakteriler tarafından demir elde etmek için kullanılan ve *iucDBAC* gen kümesi tarafından kodlanan çeşitli demir şelasyon sistemlerinden en etkilisinin hidroksimat siderofor aerobaktin olduğu, salmokelinin *iro*Agen kümesi tarafından kodlandığıtespit edilmiştir. Ada (HPI) ve *irp2, irp1, ybt*SETUXPQA gen kümeleri, Fe3+ -enterobaktin ise bakteri hücre yüzeyinde tanınmaktadır ve bir TBDT olan FepA tarafından periplazmaya taşınmaktadır(Khasheii *et al.*2016, Moynié *et al.*2019).

Bu çalışma, üropatojenik *Escherichia coli* izolatlarında demir iyonlarının siderofor genlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırmayı amaçlamaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1İdrar Yolu Enfeksiyonları (İYE)

İdrar yolu enfeksiyonları (İYE), çeşitli patojenlerin neden olduğu ciddi halk sağlığı sorunlarından biridir ve karmaşık veya basit olarak sınıflandırılmaktadır (Mireles *et al.*2015). İYE, her iki cinsiyetten tüm yaş gruplarındaki bireylerde çok ciddi morbidite ve hastalıktan sorumludur (Mickymaray and Al Aboody 2019). Hastalığa genellikle hem üst hem de alt kısımları içeren idrar yollarına saldıranbakterilerneden olmaktadır (Hamzah and Khan 2017).

Hastalık yayıldığı yere görenefrit (böbrek enfeksiyonu) ve sistit (mesane hastalığı) olarak adlandırılmaktadır, böbrek ve mesane enfeksiyonu ile ilişkili semptomlar ağrılı sık idrara çıkma ve bel ağrısıdır,nefritte ise genellikle yüksek ateş de vardır (Pollann 2019). Böbrekleri etkileyen ve kan yoluyla bulaşan enfeksiyon geliştirme riskini artıran, tedavi edilmemiş bir alt sistem enfeksiyonunun bir sonucu olarak bir üst idrar yolu enfeksiyonu oluşabilmektedir. Bu nedenle, İYE'ler ciddi klinik vakalarda ölümcül olabilir ve kan yoluyla bulaşan enfeksiyondan sonra en yaygın ikinci bakteriyel enfeksiyon türü olarak tanımlanmaktadır (Vasudevan2015).

Virüslerin, bakterilerin ve mantarların neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarına rağmen, bakteriler, özellikle bağırsaktan kaynaklanan İYE'lerin %95'inden fazlasını oluşturmaktadır (Mireles *et al.*2015, Mickymaray and Al Aboody 2019). *Proteus* ve *Klebsiella* gibi diğer hastane kaynaklı bağırsak bakterilerinin üçte ikisi Pseudomonas ailesinin üyeleriyken, Enterobacteriaceae, İYE'lerin en yaygın nedenidir ve ayakta tedavi edilen hastalardaki tüm İYE'lerin %90'ından en yaygın olarak *Escherichia coli* sorumlu olmaktadır ayrıca *Staphylococcusspp.*'nin bazı popülasyonlarda İYE'lerin %5-10'unu oluşturduğu gözlemlenmektedir (Foxman2013, Leeand Le2018).

Hücre dışı faktörler (sideroforlar, toksinler, polisakkarit kaplamalar ve enzimler) ve yüzey faktörleri (adezinler, fimbria ve P ve tip1 pili) çeşitli bakteri türleri tarafından kullanılmaktadır ve bu da ilk hücre, kolonizasyon ve konakçı mukozal yüzeylerin doku

invazyonu için İYE'lere ve enfeksiyonlara neden olmaktadır (Delcaru *et al.*2016). İYE'ler çoğunlukla solunum yolu enfeksiyonlarından sonra ikinci yaygın bakteriyel enfeksiyonlar olmaktadır, birinci basamakta görülmektedir ve tipik olarak piyüri ve bakteriüri ile bağlantılı olan bakteri istilasına ürotelyumla ilişkili inflamatuar yanıtlar olarak belirtilmektedir (Zare *et al.*2018).

Olgunlaşmamış bir bağışıklık sistemi, bakteriyel bağırsak florasındaki değişiklikler ve en yaygın olanı vezikoüreteral reflü (VUR) olan idrar yolu anomalilerinin tümü, çocuklarda İYE'ye yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir (Swerkersson*et al.*2014). Ürogenital sistemin anatomik özellikleri, üretranın kısa olması nedeniyle İYE kadınlara göre daha sık görülmektedir (Grabe *et al.*2008). Tüm idrar yolu enfeksiyonlarının yaklaşık %80'i, büyük ölçüde premenopozal kadınlarda cinsel temastan kaynaklanmaktadır. Ancak idrar yolu enfeksiyonlarının diğer etiyolojileri enürezis, menopoz ve gebelik olmaktadır. (Mickymaray and Al Aboody 2019).

Semptomatik İYE'ler, asemptomatik bakteriüri (ABU) en yaygın İYE türü olarak kabuledilse de, süre ve sürelerine göre kronik, tekrarlayan veya akut olarak sınıflandırılmaktadır. Tekrarlayan İYE her yaştan ve her iki cinsiyetten bireyleri etkiler ve nedeni tipik olarak genitoüriner sistem hastalığı olmaktadır (örneğin, doğuştan gelen bir anormallik) (Jhang and Kuo 2017). İYE'lerde erken tedavi morbidite oranında bir azalmaya neden olmaktadır, bu da vakaların çoğunda antimikrobiyal tedavinin ampirik olarak reçete edilebileceğini göstermektedir (Ibrahim *et al.*2020).

Antibiyotik kullanımı sıklıkla, antibiyotiklerin hastalar tarafından yanlış kullanımı, antibiyotik kalitesi ve hijyenik olmayan bir ortam nedeniyle dirençli mikroorganizmaların artmasına neden olur ve bunların tümü, florokinolonlar ve tüm sefalosporin nesilleri gibi birçok antibiyotiğe dirençte çarpıcı bir artışa katkıda bulunmaktadır (Karam *et al.*2016).

2.2 İdrar Yolu Enfeksiyonlarının Sınıflandırılması

2.2.1 Alt idrar yolu enfeksiyonları

Sistit olarak da bilinen alt idrar yolu enfeksiyonları, kadınlarda erkeklere göre önemli ölçüde daha yaygın görülmektedir (Fcshp *et al.*2018). Bu enfeksiyonlar, bakteriler üretraya ulaştığında ortaya çıkmaktadır ve bakterilerin bu bölgeyi kolonize etmeye ve istila etmeye başladığı üretrite veya mesaneye ulaşarak sistite neden olabilmektedir(Flores-Mireles *et al.*2015). Bu, esas olarak, kadınlarda daha kısa üretral uzunluk ve nemli bir periüretral ortam dahil olmak üzere anatomik farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

Dizürinin en önemli semptomlarından biri sık idrara çıkma ve idrarda irin veya kan bulunmasıdır. Kadınlarda enfeksiyon üretradan mesaneye kadar uzanarak cinsel süreç sonucu oluşabilen sistite yol açabileceği gibi semptomatik sistit de olabilmektedir(Kolawole *et al.*2010).

2.2.2 Üst idrar yolu enfeksiyonları

Piyelonefrit olarak da bilinen üst idrar yolu enfeksiyonları, üropatojenler üreterler yoluyla böbreklere ulaştığında gelişmektedir ve bu enfeksiyon sistitten daha şiddetli olmaktadır. Üst idrar yollarındaki enfeksiyonlara ateş, titreme, ağrı ve idrarda bakteri semptomları eşlik etmektedir (Jackson 2015). Genellikle üst üriner sistem enfektedir veya komplike değildir.Bir tıkanıklık varsa veya o bölgede komplikasyon riski taşıyan hastalarda ortaya çıkarsa tehlikeli olabilmektedir (Ifergan *et al.*2012).

2.2.3 Komplike idrar yolu enfeksiyonları

Karmaşık bir idrar yolu enfeksiyonu, genitoüriner sistemde fonksiyonel veya yapısal anormallikleri olan bir kişide meydana gelen bir idrar yolu enfeksiyonunu ifade etmektedir (Nicolle 1997). Kompleks İYE'ler, cihazları kullandıktan sonra obstrüktif

üropati oluşumuna bağlı olarak piyelonefrit veya prostat iltihabını içermektedir (Rubini *et al.*2020).

Asemptomatik bir hastada kompleks idrar yolu enfeksiyonlarını teşhis etmek için, 105 koloni oluşturan ünite CFU/mL ile iki ardışık idrar kültürü gerekmektedir. Semptomatik bir hasta için bir pozitif idrar kültürü yeterli olmaktadır (Nicolle 1997). Karmaşık İYE'lerde önemli bir nokta, tedavi sürelerini kısaltmak ve enfeksiyonun üst organa ulaşmasını önlemek için enfekte olmuş materyalin boşaltılması kavramıdır (Lee *et al.*2018).

2.2.4 Komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonları

Ana etiyolojik ajanı *Escherichia coli* olan toplum kökenli komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonlarıdır. Hem yatan hastalarda hem de ayakta tedavi gören hastalarda toplum kökenliler için yaklaşık %95 ve komplike olmayan İYE'ler için %80 sıklıkta üropatojenik *E. coli* görülmektedir (UPEC) (González *et al.*2021).

14-24 yaş arası genç kadınlarda ani bir artış dışında, İYE prevalansı yaşla birlikte artmaktadır. 65 yaş üstü kadınlarda prevalans, genel popülasyondaki yaklaşık %11'e kıyasla yaklaşık %20'dir. Yetişkin kadınların %50 ila %60'ı en az bir idrar yolu enfeksiyonu geçirmiştir ve menopoz sonrası kadınların yaklaşık %10'unun önceki yıl idrar yolu enfeksiyonu geçirdiği bildirilmiştir(Medine and Castillo-Pino 2019).

2.2.5 Tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları

Komplike olmayan ve/veya komplike İYE'lerin (rUTI'ler) nüksetmesi ile son altı ay içinde en az üç İYE/yıl veya iki İYE tekrarlaması durumudur. rUTI'ler hem alt organ enfeksiyonunu (sistit) hem de üst organ enfeksiyonunu (piyelonefrit) içermesine rağmen, tekrarlayan piyelonefrit, karmaşık bir etiyolojinin düşünülmesine yol açmaktadır (Bonkat *et al.*2021). Nüks, komplike olmayan İYE'lerden daha az yaygındır; kadınların %9'u ve erkeklerin %5,7'si bir yıl içinde ikinci bir atak geçirmektedir

(Medina and Castillo-Pino 2019).Sık İYE'ler, anksiyete ve depresyon semptomları ile ilişkili bulunmaktadır. Bir İYE'nin ani, hızlı ve ağrılı başlangıcı genellikle hastalarda endişe nedeni olmaktadır.

Hastanın olağan aktivitelerini yapamaması veya sık sık enfeksiyonun sosyal aktivitelerine etkisi nedeniyle suçluluk duygusu klinik depresyon belirtilerine yol açabilmektedir. Tekrarlayan İYE'lerin sosyal etkisi, özellikle çalışan premenopozal kadınlarda fark edilebilmektedir. İYE tedavisi tek başına bir hastanın yaşam kalitesini iyileştirmek için genellikle yeterli olmamaktadır (Renard *et al.*2015).

2.3 *Escherichia coli*

Gram negatif, hareketli, fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde bir bakteri olan *Escherichia coli*, idrar yolu enfeksiyonlarına, karın enfeksiyonlarına ve kan dolaşımı enfeksiyonlarına (BSI) neden olabilen hastane kaynaklı en yaygın patojenlerden birisidir (Li *et al.*2021).*E. coli*hem çevrede hem de konakçı hayvanda birçok nişte kolonize olma ve kalıcı olma kabiliyetine sahipbir bakteridir.*E. coli* klonlarında, yeni nişlere adapte olmalarını artırmalarına ve çok çeşitli hastalıklara neden olmalarına izin veren belirli virülans özellikleri edinmiş birçok yüksek düzeyde adaptasyon yeteneği bulunmaktadır.

Bu virülans özellikleri genellikle yeni virülans faktörleri kombinasyonları yaratmak için farklı suşlar halinde paketlenebilen genetik elementler üzerinde kodlanmaktadır (Kaper *et al.* 2004). *E. coli*'nin bazı suşları ortak gruplarından sapabilir, daha patojenik hale gelebilir ve hem bağırsakta hem de konakçının başka yerlerinde ciddi hastalıklara neden olma potansiyeline sahiptir. (Wiles *et al.*2008). Genel olarak patojenik *Escherichia coli* suşları, enfeksiyon bölgesine göre Enteropatojenik koli ve ekstraintestinal patojenik *Escherichia coli* olmak üzere iki ana gruba ayrılabilmektedir (Ramos *et al.*2020).

2.4 Enfeksiyon Bölgesine Göre *E. coli* Türleri

Birkaç farklı *E. coli* suşu, çok çeşitli hücresel süreçleri etkileyen virülans faktörleri aracılığıyla çeşitli bağırsak ve bağırsak dışı hastalıklara neden olmaktadır. Ancak *E. coli* suşları enteropatojenik *E. coli* (EPEC) ve ekstraintestinal *E. coli* (ExEC) olmak üzere iki alt gruba ayrılabilmektedir (Kaper *et al.*2004).

2.4.1 Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC)

Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC), 1940 yılında ishal hastalığı ile bilinen ilk *E. coli* suşlarındandır. Bu tip *E. coli* suşları gelişmekte olan ülkelerde bebek ishali ile ilişkilendirilmiştir, bu nedenle EPEC suşları çocuklarda daha yaygın olmaktadır (Santos *et al.*2019). EPEC suşlarının klinik tanımlaması, klasik olarak, yerel yapışma (LA), demet oluşturan demetler (BFP) ve mikro koloni oluşumu olarak adlandırılan kültürlenmiş epitel hücrelerine bağlanma yeteneklerini içermektedir. Genellikle epitel hücrelerinin yüzeyindeki 3B kümelerde 5 ila 200 bakteri bulunmaktadır (Munhoz *et al.*2018).

1995 yılında EPEC, tipik EPEC (t-EPEC) ve atipik EPEC (α -EPEC) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. İki grup arasındaki birincil fark, insanlarda bulaşıcı ishale neden olan tipik EPEC suşlarının, EPEC taahhüt faktörü (EAF) olarak bilinen büyük bir zararlı plazmit içermesi ve atipik EPEC'in bu plazmidi içermemesidir (Slinger *et al.*2017). Atipik *Escherichia coli* (α-EPEC) suşları, tipik EPEC suşlarının patogenezinin önemli bir özelliği olan lokalize yapışma modelinden sorumlu demet oluşturan demetler (BFP) üretememektedir. α-EPEC suşlarında BFP eksikliği, pentamerik veya pentapiller olmayan yapışmanın, konakçı hücrelere yapışmalarında rol oynadığını göstermektedir (Munhoz *et al.*2018).

Atipik enterik patojenik *Escherichia coli* (α -EPEC) yeni ortaya çıkan enterik patojenlerdir ve gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde tipik EPEC'den daha yaygındır. EPEC suşlarının temel özelliği, bağırsakta yapışıklıklar ve yıkıcı lezyonlar oluşturabilmeleridir. Bu lezyonları üretmek için gereken genler, enteropatojenik lokus

(LEE) olarak bilinen patojenik bir adada bulunmaktadır EPEC, genetik ve fenotipik özellikler, özellikle patojenik bağırsak adacık bölgesi (PAI) ile karakterize edilmektedir (Xu *et al.*2016). Atipik EPEC suşları, çoklu lenfokinlerin ekspresyonunu inhibe eden ve lenfosit proliferasyonunu inhibe eden lenfosit inhibitör faktör (LifA) gibi geniş bir yüzey proteinini kodlamaktadır. İlişkili iki gen, Lifa/efa1 ve ToxB, epitel hücre yapışmasında rol oynar ve LifA'nın in vitro epitel hücre yapışmasına katkıda bulunduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır (Slinger *et al.* 2017).

Herhangi bir kolonize edici ajana sahip değildirler ve ST veya LT toksinleri üretmemektedirler. Özellikle antimin için aşındırıcı olmayan bir yapıştırıcı üretmektedirler (Mirza2015). Enterokoklar (EPEC), virülans faktörlerini doğrudan konakçı hücrelere aktarmak için tip III salgılama sistemlerine (T3SS) güvenmektedir. T3SS, birçok Gram-negatif bakteride patojenite için gerekmektedir. Enjeksiyon benzeri bir aparat olan T3SS, bakteri istilasını teşvik etmek, fagositozu inhibe etmek, hücre içi öldürmeyi inhibe etmek, bakteri kaçakçılığını teşvik etmek ve hücre ölüm yollarını aktive etmek için gereklidir (Larzabal *et al.*2019).

Epidemiyolojik çalışmalar, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde α-EPEC'in t-EPEC'den daha yaygın olduğunu ve α-EPEC'in hem pediatrik endemik diyare hem de diyare salgınlarında önemli olduğunu göstermektedir (Hu and Torres2015).

2.4.2 Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC)

Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), son 30 yıllık sürveyansa dayalı olarak sürekli olarak dünya çapında en önde gelen gıda kaynaklı patojen tehditlerinden biri olmaktadır. EHEC, öncelikle yakındaki çiftlik ortamlarına bulaşabileceği ve aylarca canlı kalabileceği sığır gastrointestinal (GI) yolunu kolonize etmektedir (Saberianfar *et al.*2019). Genel olarak EHEC ile enfeksiyonun ana nedenleri O157:H7 idi, ancak daha sonra EHEC suşlarının neden olduğu enfeksiyonlar O157'den O26, O111, O103 ve O145 gibi anter serogruplarına bağlanmaktadır. *E. coli* O157'nin kendi kendini sınırlayabilen veya Hemolitik Üreemik Sendrom'a (HUS) komplike olabilen kanlı ishalin önemli nedenlerinden biri olduğu bulunmuştur (Sah *et al.*2017). Shiga toksini

üreten *E. coli* (STEC) serotipi ve salgınının önem özelliklerine göre STEC, O157 ve O157 olmayan olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom (HC/ HUS) gibi yaşamı tehdit eden O157 Shiga toksini olmayan birkaç suş vardır, ancak Shiga toksini üreten *E. coli*'nin tüm suşları HC veya HUS'a neden olmamaktadır (In *et al.*2016).

Amerika Birleşik Devletleri'nde, *E. coli* O157:H7, 1994'te ulusal olarak dikkate değer hale gelirken, O157 olmayan STEC enfeksiyonları 2000 yılına kadar rapor edilebilir değildi. O157 dışı taramanın, kommensal bir *E. coli* davranışıyla aynı olması nedeniyle laboratuvarda tanımlanması zor olmaya devam etmektedir (Nagy *et al.*2016). Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC) O157:H7, Birleşik Devletler'de her yıl 96.000'den fazla ishalli hastalık vakasının ve enfeksiyona bağlı 3.200 hastaneye yatış vakasının nedensel ajanı olmaktadır (Slayton *et al.*2013).

Shiga toksini (Stx) üreten *E. coli*'nin (STEC) ortaya çıkan halk sağlığı sorunları, daha sık veya şiddetli hastalık oluşumunu ve değişikliklerle ilişkili ve genellikle patojen, nüfus ve çevreyle bağlantılı risk faktörleri kaymalarını içermektedir (Karmali2016).Shiga toksini (STX), EHEC'in ana virülans faktörü olmaktadır, şimdiye kadar, EHEC enfeksiyonunun patofizyolojisi tam olarak anlaşılmamıştır ve bir STEC suşunun insanlarda hastalığa neden olmasını sağlayan "yardımcı" faktörleri karakterize etmek için daha fazla bilgiye ihtiyaç bulunmaktadır (Gardette *et al.*2019).

2.4.3 Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC)

Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC), düşük ve orta gelirli ülkelerden gelen çocuklarda ve gezginlerde yaygın bir ishal nedenidir. Çocuklarda termotoksin (ST) salgılayan ETEC suşları en yaygın patojenler olmaktadır (Diaz *et al.*2019). Isıya dayanıklı enterotoksin (LT), ETEC tarafından üretilmektedir ve halk sağlığı için potansiyel bir tehdit oluşturan aşırı sulu ishale neden olabilmektedir, ancak sadece ST insanları ilgilendirmektedir (Zhai *et al.*2020).ETEC'in spesifik kolonize edici faktörler (CF'ler) ile elde edilen epitel hücrelerine bağlandığı varsayılmıştır; bu faktörler yapısal, işlevsel ve antijenik olarak oldukça değişkendir. ETEC kolonize edici ajanların çoğu

pili(fimbria) olmaktadır(Vidal *et al.*2019). Hastalık hafif bir rahatsızlıktan şiddetli kolera benzeri bir sendroma kadar değişmektedir. ETEC, kontamine yiyecek ve suyun yutulmasıyla elde edilmekte ve endemik bölgelerdeki yetişkinlerin bağışıklık geliştirdiği görülmektedir (Mirza 2015).

2.4.4 Enteroinvaziv *Escherichia coli* (EIEC)

Enteroinvaziv *Escherichia coli* (EIEC), kolonun epitel hücrelerine girebilen, içlerinde çoğalabilen ve Shigella'ya benzer bir mekanizma ile komşu hücreler arasında göç edebilen bir hücre içi patojen grubudur (Pasqua *et al.*2017). Hem EIEC hem de Shigella spp. suşları, insanlarda kolonik mukozanın epitel hücrelerinde istila ve çoğalma yoluyla basil dizanterisine neden olmaktadır (Gomes *et al.*2016). EIEC, kolonun epitel hücrelerine nüfuz eder ve çoğalarak geniş hücre yıkımına neden olmaktadır. Klinik sendrom shigella dizanteri ile aynıdır ve ateşin eşlik ettiği dizanteri benzeri ishali içermektedir (Kaper *et al.*2004).

2.4.5 Enteroagregatif *Escherichia coli* (EAEC)

Enteroagregatif *Escherichia coli* (EAEC), dünya çapında akut ve kalıcı ishalli hastalıklara neden olan önemli enterik patojenlerdir. EAEC için birkaç varsayılan virülans faktörü tanımlanmış olmasına rağmen, çevresel ipuçları bakteriyel virülansı modüle edebildiğinden bunların patojenite ile ilişkileri belirsizliğini korumaktadır (Ellis *et al.*2019). EAEC, salgın hastalıklarda ve gezginlerde hafif inflamatuar ishal ile ilişkilendirilmiştir ve açık ve açıklanamayan ishali olan küçük çocuklarda giderek artan bir şekilde bağırsak patojeni olarak tanınmaktadır (Rogawski *et al.*2017). Bakterilerin bağırsak mukozasına tutunması ve istila veya iltihaplanmaya neden olmadan kanlı olmayan ishale neden olması bakımından ETEC suşlarına benzerler (Mirza 2015).

EAEC, jejunum, ileum ve kolonun epitelyumuna bağlanabilir ve farklı kümelenme modeli, sitotoksik ve proinflamatuar etkilerin izlediği mukozal bir tabakada sağlam bir biyofilm oluşturmaya hizmet etmektedir. EAEC patogenezinin üç aşamalı bir modelidir: (a) bağırsak mukozasına aşırı yapışma (b) sitotoksiklerin ve enterotoksinlerin üretimi ve

(c) mukozal inflamasyonun indüklenmesi. İlk aşamada pentagonal ve embriyonik yapıştırıcıların yanı sıra diğer yapıştırıcı yapıların katkısı önemlidir (Estrada-Garcia and Navarro-Garcia2012).

2.4.6 Diffüz yapışık *Escherichia coli* (DAEC)

DAEC'de, *Escherichia coli* geniş ölçüde yapışmış, uzun süreli çocukluk ishalinin yaygın bir nedenidir ve bağırsak mukozasının iltihaplanmasını indükleyebileceği ve duyarlı çocuklarda inflamatuar bağırsak hastalığının (IBD) gelişimine katkıda bulunabileceği varsayılmaktadır (Walczuk *et al.*2019). *Escherichia coli*'nin (DAEC) yayılmasının neden olduğu ishal tartışmalıdır. Bazı çalışmalar, diyare hastalarından izole edilen DAEC suşlarının, Toll benzeri reseptörler aracılığıyla yüksek seviyelerde interlökin-8 (IL-8) salgılanmasını uyardığını göstermektedir (Tanimoto *et al.*2019).

Diğer çalışmalar, DAEC'nin bağırsak epitel hücreleri tarafından içselleştirilmesini ve bunların tümör nekroz faktörü-alfa'nın (TNF-a) aşırı ekspresyonunu uyarma yeteneklerini göstermektedir (Walczuk *et al.*2019). Yaygın şekilde yapışan *E. coli*, idrar yolu enfeksiyonu gibi hastalıklarda Ekstraintestinal patojenik *Escherichia coli*'ye (ExPEC) benzemektedir (Desilets *et al.*2016).

2.5 Bağırsak Dışı Patojenik *Escherichia coli* (ExPEC)

Bağırsak dışı patojenik *E. coli* (ExPEC) suşları insan vücudundaki çeşitli bölgeleri kolonize eder ve çeşitli bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olmaktadır (Orskov and Orskov 1985, Eisenstein and Jones 1988). Kommensal *E. coli* suşları ile karşılaştırıldığında, ekstraintestinal suşlar daha büyük genomlara sahiptir ve daha fazla virülans faktörü kodlamaktadır(Rasko *et al.*2008). Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC), normal insan bağırsak florasının bir parçası olan fakültatif patojenlerdir.ExPEC grubu, neonatal menenjit *E. coli*'yi (NMEC), sepsis ile ilişkili *E. coli*'yi (SEPEC) ve kuş patojenik *E. coli*'yi (APEC) ve üropatojenik *E. coli*'yi (UPEC) içermektedir (Johnson and Russo 2002).

ExPEC'in patojenitesi ile ilgili virülans faktörleri (VF'ler) sayısızdır ve bakteri kolonizasyonu ile ilgili olanlardan virülans ile ilgili olanlara, örneğin adezinler, toksinler, demir edinme faktörleri, lipopolisakkaritler, polisakkarit kapsülleri ve invazinler dahil olmak üzere geniş bir aktivite yelpazesine sahip olmaktadır, genellikle patojenite adalarında (PAI'ler), plazmitlerde ve diğer mobil genetik elementlerde kodlanmaktadır (Micenková *et al.*2016).

2.5.1 Yenidoğan menenjiti *E. coli* (NMEC)

E. coli neonatal menenjite neden olan en yaygın Gram negatif organizmadır ve neonatal menenjit tüm dünyada önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olmaya devam etmektedir. Patogenezi ve patofizyolojisi hakkındaki eksik bilgimiz bu tür mortalite ve morbiditeye katkıda bulunmaktadır. CTX-M tipi veya TEM tipi genişletilmiş spektrumlu β-laktamaz üreten *E. coli* suşlarının neden olduğu yenidoğan menenjitine ilişkin son raporlar bir zorluk yaratmaktadır. Kan-beyin bariyerinin *E. coli* istilası beyne nüfuz etmek için bir ön koşuldur ve spesifik mikrobiyal-konak faktörlerinin yanı sıra mikrop ve konakçıya özgü sinyal molekülleri gerektirmektedir.

Bu tür mikrobiyal-konakçı faktörlerin ve konak hücre sinyal moleküllerinin bloke edilmesinin, *E. coli* menenjit gelişiminde temel adım olan*E. coli'nin* beyne girmesini önlemede etkili olduğu gösterilmektedir (Kim2013).

2.5.2 Sepsis ile ilişkili *E. coli* (SEPEC)

Sepsis ile ilişkili *E. coli* (SEPEC), ekstra bağırsak patojenik *E. coli*'ye (ExPEC) ait olmaktadır ve insan mikrobiyotasının bir parçası olan hem bağırsak patojenik *E. coli* hem de kommensal *E. coli*'den filogenetik ve epidemiyolojik olarak farklıdır. İnsan SEPEC'i ile ilgili çeşitli virülans faktörleri arasında HlyA (a-hemolizin), Sat (salgılanan ototransportör toksin) ve CNF-1 (sitotoksik nekrotizan faktör 1) gibi salgılanan toksinler bulunmaktadır. Bu toksinler, konak hücre şeklini ve/veya işlevini değiştirebilir, böylece patojen tarafından uyarılan biyolojik süreçlere katkıda bulunabilmektedir (Tibo *et al.*2016).

2.5.3 Kuş patojenik *E. coli* (APEC)

İnsanlarda enfeksiyonlara neden olan kuş patojenik *E. coli* (APEC) ve ekstraintestinal patojenik *E. coli*(ExPEC) suşlarının filogenetik olarak oldukça yakın akraba olduğunu ve aynı virülans genlerinin bazılarını paylaştığını ortaya koyan bazı çalışmalar bulunmaktadır (Manges 2016). APEC suşları, ExPEC'in insanlarda patojenik olan virülans genlerinin bir rezervuarı olabilir, iss geni, kuş patojenik *E. coli* suşlarına özgü büyük bir virülans plazmiti olan plazmit ColV üzerinde bulunmaktadır; bu virülans genlerinin çoğu, insan ve kuş patojenik *E. coli* suşları arasında mümkün olmaktadır (Rodriguez-Siek *et al.*2005).

2.5.4 Üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC)

Patojenik bakteri *Escherichia coli*, hastane veya toplum kaynaklı olabilen idrar yolu enfeksiyonlarına (İYE) neden olabilmektedir. İYE'lerin kalıcılığı ve tekrarlanmasındaki en önemli faktör, UPEC'nin kendisini antimikrobiyal tedaviden koruyan biyofilm oluşturma yeteneğidir (Naziri *et al.*2021). Üriner patojenik bakteriler idrar yoluna girdikten sonra, daha fazla idrar akışı, büyük bir antibakteriyel molekül akışı ve hassas bağışıklık hücreleri içeren çok sayıda yapıcı ve uyarılabilir konak savunmasıyla karşılaşmaktadırlar. Konak savunmasının üstesinden gelmek için, üriner patojenler konak dokulara bağlanmak ve onları istila etmek için bir dizi mekanizma geliştirmiştir (Mulvey2002).

UPEC izolatları genetik olarak heterojen bir gruptur ve mesane veya böbrekte kolonize olma ve kalıcı olma yeteneklerinde büyük farklılıklar gösterebilmektedir (Foxman *et al.*1995). Epidemiyolojik, hücresel ve hayvan çalışmaları, UPEC tarafından kodlanan bir dizi faktörün idrar yolu içindeki bakteriyel virülansı modüle edebildiğini göstermiştir. Bu virülans faktörleri genellikle UPEC kromozomu üzerinde kodlanır ve genellikle patojenite adaları olarak bilinen büyük kararsız kromozomal bölgelerin bir parçası olmaktadır (Naziri *et al.*2021). UPEC'nin virülans faktörleri, bakteri hücre yüzeyini ve salgılanan virülans faktörünü içermektedir. En yaygın bakteri hücre yüzeyi virülans faktörleri esas olarak tip 1 fimbria ve P fimbria gibi fimbriaları içermektedir.

Bu fimbrialar konak hücre yüzeyine tutunmaya, doku invazyonuna (UPEC idrar yolu enfeksiyonlarına neden olmada önemlidir), biyofilm oluşumuna ve sitokin indüksiyonuna yardımcı olmaktadır (Emody *et al.*2003).

Bakteri hücre yüzeyi virülans faktörü ayrıca flagella, kapsüler lipopolisakkaritler ve dış zar proteinlerini içermektedir (Shah *et al.*2019). Bu virülans mekanizmalarının başarılı kullanımı, kısmen şu anda insanlar tarafından edinilen en yaygın bakteriyel enfeksiyonlar arasında yer alan idrar yolu enfeksiyonlarının (İYE'ler) prevalansı ile yansıtılmaktadır (Mulvey2002). Öte yandan hemolizin ve sideroforlar salgılanan virülans faktörleridir (Johnson 1991, Emody *et al.*2003). Bu virülans faktörleri, bakterilerin üriner sistemde kolonize olmasını ve etkin bir şekilde işleyen konak savunma mekanizmasına rağmen varlığını sürdürmesini sağlamada önemlidir (Vagarali *et al.*2008, Shah *et al.*2019).

2.6 Üropatojenik *Escherichia coli* Virülans Faktörleri

Virülans, (Latince zehirli kelimesinden) bir organizmanın konağı enfekte etme ve hastalığa neden olma yeteneği olarak adlandırılmaktadır (Johnson 1991). Virülans faktörleri, bir mikroorganizmanın belirli bir konakçı tür içinde kendini oluşturma ve çoğalma yeteneği anlamına gelir, bu da mikropun hastalığa neden olma yeteneğini arttırmaktadır (Bien *et al.*2012). Üremik patojen *Escherichia coli*'nin (UPEC) önemli virülans faktörleri, konak savunması üzerindeki etkilere direnç sağlamaktadır. Ek olarak, öldürücü bakteriler, konağın bağışıklık tepkisini aktif olarak baskılayan moleküller üretebilmektedir. Bu, artan bakteri direncine ve doku hasarına yol açmaktadır. UPEC virülans faktörlerini kodlayan genler, 'patojenite adaları' adı verilen kromozomal gen kümelerine çevrilmektedir (Navidinia *et al.*2013).

Ekstra-intestinal patojenik *E. coli* suşları, örneğin adezinler, kapsül, sitotoksinler ve sideroforlar gibi virülans faktörlerine (VF'ler) sahiptir ve bunlar konak savunmasının üstesinden gelmek, konak dokuları istila etmek ve bir lokal inflamatuar yanıtı tetiklemek için gerekmektedir (Johnson1991). Farklı virülans faktörleri uyum içindedir, ifadeleri enfeksiyon sırasında açılır veya kapanır ve çevresel sinyallerle düzenlenebilir

(Johnson *et al.*2005). Kolon virülans faktörleri iki gruba ayrılmaktadır: (1) bakteri hücre yüzeyine bağlı virülans faktörleri (adezyon faktörleri), (2) virülans faktörleri (toksinler) salgılanmakta ve etki bölgesine ihraç edilmektedir (Emody *et al.*2003).

Virülan *E. coli* ile ilişkili mikrobiyal özellikler arasında toksin üretimi, beş değerlikli ve beş değerlikli olmayan yapışma faktörleri, tip III salgılama sistemleri yer almaktadır, enterosit silinmesi (LEE),demir taşıyıcıları ve hemolizin lokusundaki bir gen tarafından kodlanmaktadır. Genler, epitel adezyonunda, vücut bariyerlerinin aşılmasında (gastrointestinal, böbrek ve beyin), demir emiliminde ve bağışıklık sistemi direncinde rol oynayan virülans faktörlerini kodlamaktadır (Fard *et al.*2019).

2.6.1 Biyofilm oluşumu

Biyofilm, polimerik bir matriste birbirine kenetlenen kümeler olarak hücrelerden oluşan ağırlıklı olarak bakteriyel bir yaşam tarzıdır. Biyofilm oluşumu, besin maddelerine erişim sağladığı ve hücreleri çevresel streslerden koruduğu için bakteri türleri için hayati öneme sahip olmaktadır (Miryala *et al.*2021).Biyofilmler, bakterilerin ürotelyum hücrelerine bağlanmasına yardımcı olan mikroorganizma toplulukları ve onların mikrobiyal ürünleridir (Zhao *et al.*2020). Biyofilmler, yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanan ve esas olarak bir polisakarit matrisi ile çevrili bir grup mikrobiyal hücreyi temsil etmektedir. Ayrıca biyofilmler, bakterileri mevcut besinleri verimli bir şekilde kullanacak şekilde yerleştirerek ve antimikrobiyal ajanlara, antikorlara ve beyaz kan hücrelerine erişimi engelleyerek bakteriler için bir hayatta kalma stratejisi sağlamaktadır (Katongole *et al.*2020).

İnce biyofilmler, idrar yolu patojeni *Escherichia coli*'yi (UPEC) insanlarda İYE'lerin birincil nedeni yapan faktörler arasındadır. Bu bakteri, hayvanlarda, insanlarda ve çevrede sayısız nişlerde kolonileşebilen ve varlığını sürdürebilen oldukça çeşitli bir türdür (Nikzad *et al.*2021). Biyofilm oluşumu, *Escherichia coli*'nin antimikrobiyal ilaçlara direnci ile yakından ilişkilidir, organizmayı konağın bağışıklık tepkisine karşı direnç göstermektedir (Mittal *et al.*2015).

2.6.2Sideroforüretme

Sideroforlar, mikroorganizmalar tarafından demir alımını artıran, düşük demir stresi altında büyüyen bakteri ve mantarlar tarafından hazırlanan nispeten düşük moleküler ağırlıklı, demir iyonuna özgü şelatlama ajanlarını temsil etmektedir (Khan *et al.*2018). Demir; DNA sentezi, elektron transferi ve merkezi metabolizma dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte önemli bir kofaktördür (Skaar and Raffatellu 2015). Enfeksiyon sırasında bakteri üremesi için genellikle demir alımı gerekmektedir (Frey and Reed 2012).

Doğuştan gelen bağışıklığın bir yönü, yani "beslenme bağışıklığı", kritik metal kofaktörlerine erişimi sınırlayarak bakteriyel enfeksiyonları kısıtlamaktadır (Cassat and Skaar2013). Memeli konakçı, laktoferrin, transferrin, ferritin ve hemoglobin gibi proteinlerde demiri sekestre ederek hücre içi ve serbest dolaşımdaki demiri sınırlamaktadır (Miethke and Marahiel2007). Özellikle, UPEC, ayırt edici özellikleri sentezleyerek yeni metal kompleksleri yaratmaktadır. (Sideroforlar) olarak adlandırılan daha yüksek metal iyon afinitelerine sahip yüksek afiniteli küçük moleküllü metal şelatlayıcılardır. UPEC'de dört tip siderofor vardır; enterobaktin, salmokelin, aerobaktin ve yersiniabaktin(Robinson *et al.*2018).

2.6.3 Enterobaktin

Enterobaktin (eskiden enterokelin olarak bilinir) *Salmonella spp.* ve *Klebsiella spp.* dahil olmak üzere neredeyse tüm *Escherichia coli* türleri tarafından üretilmektedir (Crosa and Walsh2002). Enterobaktin korunmuş *E. coli* sideroforudur.Çok sayıda araştırma hattı, enterobaktin sistemini insan İYE patogenezinde bir katılımcı olarak ima etmektedir. Enterobaktin, *E. coli* İYE hastalarından alınan idrarda doğrudan tespit edilmiştir(Shields-Cutler *et al.*2016).

Enterobaktin alt birimleri 2,3-dihidroksibenzoat ve DHBS'dir (Hantke1990). İki dış zar reseptörünün (Fiu ve CirA) insan UTI sırasında transkripsiyonun arttığı da gözlenmiştir (Brumbaugh *et al.*2015). Klinik *E. coli* izolatlarındaki korunmuş genlerin karşılaştırmalı

bir genomik analizi, idrar suşları arasında hem enterobaktin biyosentezinin (*entD, entF*) hem de alımın (*fepE*) bileşenlerini kodlayan genlerde pozitif seçimin kanıtını vermektedir (Chen *et al.*2006). Bu bulgular, enterobaktin sisteminin insan UTI sırasında aktif olduğunu ve idrar suşlarının evrimini etkilemek için *E. coli* uygunluğunu yeterince etkilediğini göstermektedir.

2.6.4 Salmokelin

Salmokelin virülansla ilişkili bir enterobaktin türevidir. Salmokelin, en çok tanımlanan UPEC sideroforudur ve katekollerin ayırt edici bir C-glukosilasyonu ve enterobaktin siklik trilakton iskelesinin hidrolizi ile üretilen enterobaktinin değiştirilmiş bir şeklidir (Hantke *et al.*2003, Bister *et al.*2004). Orijinal olarak Salmonella türlerinden tanımlanmış olup, genom veya plazmitlerde korunmamış *iroA* gen kümesini taşıyan UPEC tarafından da üretilmektedir (Johnson *et al.*2002). Bu gen kümesi, salmokelinin toplam sentezi için gerekli genleri kodlamaz, bunun yerine biyosentetik genleri, olağandışı bir karbon bağlantısıdır (*iroB*) (Hantke *et al.*2003).

Salgılamadan önce enterobaktin ve salmokelinin siklik versiyonlarını doğrusallaştıran bir periplazmik esteraz (*iroE*) yoluyla glukozu enterobaktine bağlayan bir enzimi kodlamaktadır. (Lin *et al.*2005, Zhu *et al.*2005). iroA kümesi ayrıca salmokelin aracılı demir alımı için gerekli olan ayrı bir ihracatçı, reseptör ve sitoplazmik esterazı da kodlamaktadır (Lin *et al.*2005).*Salmonella typhimurium*, enterobaktin alımında rol oynayan iki dış zar reseptör proteini olan *iroN* ve *FepA*'ya sahiptir. Her iki reseptörün de aynı substrat spesifikliklerine sahip olup olmadığını belirlemek için *fepA* ve *iroN* mutantları ve bir çift mutant karakterize edilmiştir.

iroN ve *FepA;*enterobaktini taşırken, corynebaktin ve miksokelin C alımına seçici olarak sırasıyla aracılık ederler. Bu iki dış zar enterobaktin reseptörlerinin mevcudiyeti, mevcut sideroforların sadece *FepA* veya *iroN* yoluyla kullanılabileceği koşullar altında avantajlı olabilir (Rabsch *etal.*1999). *iroN*, yakın zamanda tanımlanan siderofor reseptörüdür. Çeşitli çalışmalardan elde edilen moleküler epidemiyolojik kanıtlar, fekal izolatlara kıyasla İYE izolatları arasında artan bir *iroN* prevalansı olduğunu

göstermiştir. Bu kanıt, *iro N*'nin asterofor reseptörü olarak işlev gördüğünü ve UTI için aurovirülans faktörü olduğunu göstermektedir (Russo *etal.* 2002) ve üriner virülansa katkıda bulunan bir demir asit reseptörünü kodlayan *iroN* geni, ekstra-intestinal *Escherichia coli*'de tanımlanmıştır. *iroN* ayrıca *Salmonella enterica* suşlarında da bulunur (Okeke *etal.* 2004).

2.6.5 Aerobaktin

Aerobaktin, yapısal olarak enterobaktin, salmokelin ve Ybt'den farklı olan *Aerobacter aerogenes'*ten orijinal olarak izole edilen hidroksamat tipi bir siderofordur. Sentetik (*iucABCD*) ve dış zar reseptörü (*iucA*) genlerini içeren operon, UPEC'nin kromozom veya virülans ile ilişkili plazmitlerin yanı sıra çok çeşitli diğer tıbbi ve çevresel bakteri türleri bulunmaktadır (Johnson *et al.*1988, Schmidt and Hensel2004). Aerobaktin aracılı demir alımı, ferrik hidroksamatların alımında rol oynayan ayrı, korunmuş *E. coli*genlerini (fhuBCD) içermektedir (Braun *et al.*1984).

Enterobaktin ve salmokelinden farklı olarak, metalin aerobaktinden tahribatsız bir şekilde çıkarılabildiği ve hücrenin metal içermeyen aerobaktini geri dönüştürdüğü görülmektedir (Braun *et al.*1984). Aerobaktin, enterobaktine göre demir için daha düşük bir afiniteye sahip olmasına rağmen virülans ile ilişkisi, enfeksiyonlar sırasında önemli işlev kazanımları sağlama olasılığını yükseltmektedir(Harris *et al.*1979). Klinik İYE'ler sırasında aerobaktin ekspresyonunun kanıtı, kadın İYE hastalarından alınan bazı işemiş *E. coli*'de ilişkili dış membran aerobaktin ithalatçısı (*iucA*) için RNA'nın transkripsiyonel tespiti ile önerilmektedir (Hagan *et al.*2010).

Bununla birlikte, bazı iutA+ izolatları aerobaktin sentezlemediğinden, transkripsiyonel veriler UTI sırasında aerobaktin sistemi ekspresyonunun kesin kanıtı olmamaktadır (Henderson *et al.*2009). Epidemiyolojik çalışmalar, aerobaktin gen taşıyıcısının mesane, böbrek ve kan izolatlarında fekal izolatlara göre daha sık olduğunu göstermektedir (De Lorenzo and Martinez 1988). Diğer epidemiyolojik çalışmalar, aynı türden tekrarlayan enfeksiyonlara neden olan UPEC suşlarında aerobaktin prevalansının daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir (Soto *et al.*2006).

2.6.6 Yersiniabaktin

Yersiniabaktin (Ybt), adından da anlaşılacağı gibi, ilk olarak *Yersinia pestis*'te (kara veba etkeni) tanımlanmıştır. Yersiniabaktin bir enterobakteriyel siderofor ve metallofordur.Ybt sistem genleri, Klebsiella, Enterobacter ve Citrobacter dahil olmak üzere birçok üriner Enterobacteriaceae'de tanımlanmış Yersinia yüksek patojenite adası (HPI) olarak bilinen karmaşık, multioperon patojenite adasında kodlanmıştır (Perry and Fetherston2011). HPI'nin dört operonunun ifadesi, bir HPI kodlu transkripsiyon faktörü olan YbtA'ya bağlıdır (Fetherston *et al.*1996). Ferrik alım baskılayıcı tarafından ek bir transkripsiyonel kontrol seviyesi bulunmaktadır. Ybt yapısal olarak enterobaktin,salmokelin ve aerobaktinden farklıdır. Kapsamlı bir ribozomal olmayan peptit sentaz/poliketid sentaz sistemi, polisiklik Ybt'yi ve yakın zamanda takdir edilen escherikelin ürününü oluşturmak için salisilik asit, üç sistein ve malonik asidi birleştirmektedir (Miller *et al.*2010, Ohlemacher *et al.*2017).

Ybt alım yolunun dikkatli çalışmaları, UPEC'nin Ybt'yi tamamen geri dönüştürebildiğini, Ybt'yi metal yükünden tahribatsız bir şekilde ayırdığını ve serbest bırakılan Ybt'yi ek metal teslimat turlarından geçebileceği hücre dışı boşluğa geri döndürdüğünü göstermektedir (Koh *et al.*2017). *E. coli*'deki Yersinia HPI aktivitesi, doğrudan insan İYE patogenezi ile bağlantılıdır. Hem Ybt hem de escherikelin, *E. coli* İYE hastalarından alınan idrarda kütle spektrometrisi kullanılarak açık bir şekilde tespit edilmiştir (Ohlemacher *et al.*2017, Chaturvedi *et al.*2012). Voided *E. coli*'nin transkripsiyonel profili, dış membran ferrik Ybt ithalatçısının (fyuA) klinik UTI sırasında eksprese edildiğini düşündürmektedir (Hagan *et al.*2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Laboratuvar ekipmanları

Bu çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanları

Ekipmanlar	**Şirket**	**Ülke**
Otoklav	Rayap	İspanya
Santrifüj	GFL	Almanya
Dijital kamera	I phone 6s	Amerika
Jel elektroforez aparatı	BIO-RAD	İngiltere
Davlumbaz dolabı	Memmert	Kore
Kuluçka makinesi	Memmert	Almanya
Işık mikroskobu	Olympus	Japonya
Mikro santrifüj	Fison	İngiltere
Milipor filtre 0,22	Proway	Çin
PCR termal döngüleyici	MyGeneTM Model MG25+	Çin
Spektrofotometre	Biochrom	Almanya
ELISA	Biotek	Amerika
Petri kabı	Biozek	Hollanda
PCR tüpleri 50µL, DNA tüpleri 100 µL	Eppendorf	Oxford
Buzdolabı	Arcelik	Türkiye
Hassas elektronik terazi	A and D	Japonya
UV- transillüminatör	Cleaver	İngiltere
Girdap karıştırıcı	Gemmy	Tayvan
Çalkalamalı su banyosu	Julabo	ALmanya
Dönüştürme PCR	Isolab	Almanya
Derin dondurucu	GFL	Almanya
VITEK 2 kompakt	Biomerieux	Amerika
Mikrotiter plakası 96 kuyusu	Bio Basic	Kanada
Damıtıcı	AlabTech	Kore
DNA elektroforez cihazı	Hettich	Almanya

3.1.2 Reaktifler ve kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallarve solüsyonlar Çizelge 3.2'de göstermektedir.

Çizelge 3.2 Mevcut çalışmada kullanılan kimyasallar ve reaktifler

Kimyasallar	**Şirket**	**Ülke**
Agaroz tozu	Bio basic	Kanada
Etanol %99, %70	BDH	İngiltere
Gliserol	Scharlau	Espine
Gram boyama reaktifleri	Kimadia	Irak
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Panreac	İngiltere
TBE arabelleği (Tris-BorateEDTA)	Bio-basic	Kanada
N,N,N,N-Tetrametil-P-fenilendiaminodihiklorür	BDH	İngiltere
Normal saline	Braun	Almanya
Oksidaz reaktifi	Himedia	Hindistan
Kovacs reaktifi	Himedia	Hindistan
TE Tamponu	Himedia	Hindistan
Üre çözeltisi reaktifi	MastDiagnostic	İngiltere
Tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür	B.D.H	İngiltere
Immersiyon yağı	Syrbio	Suriye
Boya Çözeltisi Yükleme	Promega	Amerika
Glikoz	B.D.H	İngiltere
a-Naftol	B.D.H	İngiltere
Pepton	B.D.H	İngiltere
Tripton	B.D.H	İngiltere
Kırmızı metil	B.D.H	İngiltere
Üre	B.D.H	İngiltere
Kloroform	Sigma	Amerika
İzopropanol	Sigma	Amerika
RNase Zap RNase Dekontaminasyon Çözeltisi	Applied Biosystems	Amerika

3.1.3 Antibiyotikler

İYE'li hastalarda yaygın olarak kullanılan antibiyotikler Çizelge 3.3'te listelenmiştir.

Çizelge 3.3İYE'li hastalarda yaygın olarak kullanılan antibiyotikler

Antibiyotik Grupları	**Uluslararası kısa antibiyotik kodlaması**	**Disk (mg/tablet)**
Aminoglycosides	Amikacin (AK)	30
Aminoglycosides	Gentamicin (CN)	10
Quinolones	Ciprofloxacin (CIP)	10
Quinolones	Nalidixic acid (NA)	30
Aminopenicillin	Ampicillin (AM)	30
Nitrofurans	Nitrofurantoin (F)	10
β-Lactamase inhibitor	Amoxicillin Clavulanica (AMC)	30
Cephalosporin III	Ceftriaxone (CRO)	10
Tetracyclines	Tetracycline (T)	10

3.1.4 Kültür ortamı

Bu çalışmada kullanılan kültür besiyerleri Çizelge 3.4'te listelenmiştir. Kültür ortamı, üreticinin talimatlarına göre hazırlandı ve 121°C'de (15 lb) 15 dakika boyunca otoklavlanarak sterilize edildi.

Çizelge 3.4 Bu çalışmada kullanılan kültür besiyerleri

Ortam	**Üretici**	**Ülke**
Beyin kalp infüzyon suyu	Neogen	Birleşik Krallık
Kanlı agar	Neogen	Birleşik Krallık
Mueller-Hinton ağarı	Neogen	Birleşik Krallık
MacConkey ağarı	Acumedia	Birleşik Krallık
Üçlü şekerli demir agar	Himedia	Hindistan
Simmon sitrat agar	Himedia	Hindistan
Eozin Metilen Mavisi SuperMix	Oxoid	Birleşik Krallık

3.2 Yöntem

3.2.1 Deneysel tasarım ve çalışma grupları

Bu çalışma Mart ile Haziran 2021 arasında yürütülen bir vaka kontrol çalışmasıdır. Yaşları 15 ile 60 arasında değişen hastalardan (kadın ve erkek) toplam 230 idrar örneği alınarak bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Bunlardan 109'u *E. coli* ile enfekte olmuş, 70'i diğer bakterilerle enfekte olmuştur. Ayrıca kontrol grubu olarak sağlıklı bireylerden 51 idrar örneği alınmıştır. Tüm katılımcılar için toplanan veriler şunları içermektedir: İsim, cinsiyet, yaş, diğer hastalıklar, tedavi, ağırlık, vücut kitle indeksi, tıbbi geçmiş ve numune alma tarihi. Örnekler Bağdat kentindeki Abu Ghraib Hastanesi'nden toplanmıştır.

3.2.2 İdrar örneklerinden üropatojenik *Escherichia coli*'nin mikroskobik ve kültürel incelemeleri

3.2.2.1 İdrar örneğinin mikroskobik inceleme

Bir test tüpündeki idrar örneğinin bir kısmı, beş dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüjlendi. Çökeltinin bir damlası temiz bir cam lam üzerine aktarıldı, daha sonra üzerine lam kapağı yerleştirilerek ışık mikroskobu ile 40x büyütmede incelendi (MacFaddin2000).

3.2.2.2 Kültür ortamının hazırlanması

Üreticinin talimatlarına göre bir grup genel kültür ortamı hazırlandı ve bu ortamların tümü otoklavda 121°C'de 15 dakika 15 psi'de sterilize edildi. Bakteriyel izolatların tanımlanması için kullanılan kültürel besiyerleri aşağıda verilmiştir.

MacConkey agar: MacConkey agar plakaları bakteri ile kültürlendi ve gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon periyodundan sonra agar üzerinde pembe kolonilerin görülmesi laktoz fermantasyonu için olumlu sonuç verdi(Mossel *et al.*1962).

Eozin metilen mavisi (EMB) agar: Steril bir öze kullanılarak, bakteriler EMB agarın yüzeyine çizildi ve ardından gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Agar yüzeyinde yeşil-metalik parlak koloniler görüldüğünde sonuçlar olumlu kabul edildi (Leininger2001).

Besin agar ortamı: Besin agar ortamı, üreticinin talimatlarına göre hazırlandı (28 gm/L). Genel deneylerde, kültürde ve gerektiğinde bakteri izolatlarının aktivasyonunda kullanıldı (MacFaddin2000).

Kanlı agar ortamı: Kanlı agar besiyeri, 40 g kanlı agar bazının 1000 mL distile su içinde çözülmesiyle hazırlandı. Bu besiyeri 121°C, 15 psi'de 15 dakika otoklavlandı ve daha sonra 50°C'ye soğutuldu, ardından %5 taze insan kanı eklendi.Bu besiyeri, belirli büyüme gereksinimleri olan müşkülpesent bakterileri kültürlemek için kullanıldı(Forbes *et al.*2007).

Mueller hinton agar ortamı: Mueller-Hinton agar besiyeri, üreticinin talimatlarına göre hazırlandı. Antibakteriyel duyarlılık testi için kullanıldı (MacFaddin2000).

Beyin-kalp infüzyon broth: 37 g besiyerinin 100 mL distile su içinde çözülmesiyle hazırlandı. pH 7,2'ye ayarlandı ve daha sonra otoklavda 121^{o}C'de 15 dakika sterilize edildi (MacFaddin2000).

Üre agar ortamı: Bu besiyeri, 121^{o}C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilen ve 50°C'de soğutulan 100 mL üre agar bazına filtrasyon ile sterilize edilen 15 mL üre solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır. pH 7,1'e ayarlandı ve ortam sterilize edilmiş test tüplerine dağıtıldı ve eğimli bir şekilde katılaşmasına izin verildi. Bu ortam, bakterilerin üreaz enzimi üretme yeteneğini test etmek için kullanıldı (MacFaddin2000).

Eozin metilen mavisi (EMB) ortamı: Bu besiyeri, üretici tarafından önerilen yönteme göre hazırlandı. Mor renk, asit varlığında oluşan eozin-metilen mavisi kompleksinin absorpsiyonundan kaynaklanır. Bazı *E. coli* temsilcileri, yansıyan ışıkta yeşilimsi metalik bir parlaklık sergiler (Murray *et al.* 2003).

3.3 Çözeltilerin, Tamponların ve Reaktiflerin Hazırlanması

Üre çözeltisi (%20): 20g üre 10mL distile suda çözülerek hazırlandı ve 100mL'yedistile su ile tamamlandı. Ardından Millipore filtre (0,22µm) ile süzüldü. Üreaz enziminin tespiti için üreaz testinde kullanıldı (MacFaddin2000).

Tris-BorateEDTA (TBE) (0,5 X)tampon (pH 8,30): Stok TBE tamponu (10X) distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır. 500mL distile suya 50mL (10X) TBE tamponu eklenerek bir litre hazırlandı, pH 8,3'e ayarlandı ve ardından hacim 1L'ye tamamlandı (Al-Guranie and Al-Mayahie2020)

Etidyum bromür (EtBr) (5mg/mL): 0,05g EtBr'nin 10mL steril distile su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında karanlık bir kapta saklandı (Al-Guranie and Al-Mayahie2020).

McFarland standart çözümü: Bu çözelti, Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü CLSI'ye (Wayne 2011) göre aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

Çözelti A için1,175 g $BaCl_2.2H_2O$, 100 mL distile suya ilave edildi. Çözelti B için 99 mL distile suya 1 mL sülfürik asit eklendi.Daha sonra 0,5 mL (A) solüsyonu 99,5 mL (B) solüsyonuna eklendi, iyice karıştırıldı ve solüsyonun buharlaşmaması için kapakları sıkı cam tüplere 4-5 mL boyutlarında dağıtıldı ve bulanıklık 625 nm'de spektrofotometre ile belirlendi. Böylece okuma, 1,5×108 hücre/mL bakteri hücresini simüle eden 0,08 – 0,1 olmuştur.Kullanılıncaya kadar karanlık bir yerde saklandı ve antibiyotik duyarlılık testindeki bakteri hücre konsantrasyonu ile karşılaştırmalı olarak kullanılmadan önce iyice çalkalandı (Vandepitte*et al.*2003).

Oksidaz reaktifi:0,1 mg Tetra-p-parafenilen diamin dehidroklorürün 10 mL damıtılmış su içinde çözülmesiyle doğrudan hazırlandı ve bakterilerin bir oksidaz enzimi üretme yeteneğini saptamak için karanlık bir kapta saklandı (Forbes *et al.* 2007).

Hidrojen peroksit: Katalaz testi için kullanıldı, reaktif kullanıma hazırlandı.H_2O_2'nin %3'ü, bakterilerin katalaz enzimi üretme yeteneğini saptamak için karanlık bir kapta saklandı (Forbes *et al.* 2007).

Voges-Proskauer reaktifi (Barritt reaktifi): Bakteriler tarafından asetil-metilkarbinol üretimini tespit etmek için kullanıldı. İki kısımdan oluştu: α-neftol (5g) 100 mL %99 etanol içinde çözüldü, daha sonra ışıktan uzakta karanlık bir kapta saklandı ve KOH (40g) 100 mL damıtılmış suda çözüldü (Collee *et al.*1996).

Kovac reaktifi: 5 g P-Dimetil amino Benz aldehitin (DMAB) 75 mL izoamil alkol içinde çözülmesiyle hazırlandı. Daha sonra bu karışıma yavaş yavaş 25 mL konsantre HCL ilave edildi. Bakteriler tarafından indol üretimini tespit etmek için kullanıldı (MacFaddin 2000).

Metil kırmızı reaktif: Metil kırmızısı reaktifi, 0,1 g metil kırmızısının 300 mL %95 etanol içinde çözülmesiyle hazırlandı. Daha sonra hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı. Tam glikoz hidrolizini saptamak için kullanıldı (MacFaddin 2000).

Biyofilm için kristal menekşe çözümü: 10 mL distile suya 0,1 g kristal viyole tozu eklenerek hazırlanmış ve Millipore filtreleri ile sterilize edilmiş ve biyofilm üretiminin tespiti için kullanılmıştır (Christensen *et al.*1985).

3.4 Üropatojenik *Escherichia coli* İzolatlarının Tanımlanması için Biyokimyasal Testler

Katalaz testi: Bu test lam üzerine birkaç damla %3 H_2O_2 eklenerek ve üzerine steril öze tek koloni *E. coli* transferi kullanılarak yapıldı. Oksijen kabarcıklarının üretimi olumlu sonuç kabul edildi (Brown2012).

Oksidaz testi: Tahta bir çubukla 24 saatlik bir koloni kültürü alındı ve substrat (%1 tetra-metil-p-fenilendiamin dihidroklorür, TMPD) ile nemlendirilmiş filtre kağıdına ovuşturularak 10 saniye beklendi ve inoküle edilen alanın renginde herhangi bir değişiklik gözlenmedi (Brown and Smith 2014).

IMVC testi: MacFaddin (2000)'egöre aşağıdaki gibi yapılmıştır.

1. **İndol test:** Triptofan broth besiyerine bakteri inoküle edildi ve 37^{o}C'de 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. Pembe şarap rengi halkasının tüp oluşumlarına bazı Kovac reaktif damlaları eklendi, bu da olumlu değerlendirildi.

2. **Metil kırmızısı testi:** Test edilen bakteri kültürü, MR-VP ortamına inoküle edildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi.Hazırlanan metil kırmızısı solüsyondan birkaç damla et suyuna ilave edildi. Ortamın renginin sarıdan kırmızıya değişmesi, bakterinin glikozu fermente etme ve nihai ürün olarak asit üretme yeteneğini göstermektedir.

3. **Voges-Proskauer testi:** MR-VP ortamı, test edilen bakteri kültürü ile aşılandı ve 24 saat inkübasyondan sonra 0,6 mL VP1 ve 0,2 mL önceden hazırlanmış VP2 eklendi. 37°C'de 15 dakika sonra kırmızı, pozitif bir sonucu gösterirken, değişmeyen renk negatif bir sonucu göstermektedir. Bu tahlilin amacı, bakterinin glikozu fermente etme ve aseton üretme yeteneğini saptamaktır.

4. **Simmon sitrat testi:** Test edilen bakteri kültürünü eğimli Simmons sitrat agar üzerinde hatlar döşenerek aşılamak için steril bir öze kullanıldı.37°C'de 24-48 saat inkübasyon periyodundan sonra, mavi renkli ortam pozitif bir sonuç gösterirken, değişmeyen yeşil negatif sonuç verdi.Test bakterinin karbon kaynağı olarak sodyum sitratı kullanma yeteneğini kontrol etmek için kullanıldı.

3.5 Vitek2

Vitek2 otomatik yöntemi, bakterileri tanımlamak için en hızlı ve en doğru yöntemdir. Vitek2 sistemi, organizma teşhisi için biyokimyasal bir profil sağlayan 47 kuyuda çeşitli biyokimyasal test ortamlarının kantitatif mikrolitrelerini içeren plastik reaktif kartlarından oluşmaktadır (Maina and Kagotho 2014).

İnokulum, otomatik olarak karta aktarılan kültür örneklerinden toplandığından, fotometre, mikrobun metabolik aktivitesinin neden olduğu karttaki renk değişimini aralıklı olarak ölçmektedir. Veriler bilgisayarlı bir veritabanında analiz edilmektedir, saklanmakta ve yazdırılmaktadır. Bakterilerin gram negatif (GN) ve gram pozitif (GP) tanımlanması için olanlar da dahil olmak üzere çeşitli kart türleri bulunmaktadır (Maina and Kagotho2014).

3.6 Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Bu tahlil, Mueller-Hinton agar üzerinde Kirby-Bauer işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Bir inokulum izolatı, kolonilerin steril normal salin içinde bir gecelik kültürden 0,50 McFarland solüsyon standardına eşdeğer bir türbiditeye kadar emülsifikasyonu yoluyla üretildi. Mueller-Hinton agarına steril bir sürüntü kullanılarak bakteriyel süspansiyon sürmesi eşit şekilde uygulandı ve kurumaya bırakıldı. Antibiyotik tabletler steril forseps kullanılarak plak üzerine bırakıldı. Plakalar 24 saat 37°C'de inkübe edildi ve inhibisyon bölgesinin çapı ölçüldü ve sonuçlar Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI (2017) temelinde yorumlandı.

3.7 UPEC İzolatlarından Biyofilm Üretiminin Ölçümü

Üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC) biyofilm oluşumu Patel vd. (2016) tarafından tarif edildiği gibi değerlendirildi. Tüm izolatlar, 37°C'de Brain Heart Infusion (BHI) broth içinde gece boyunca kültürlendi. Her izolat, %1 glikoz içeren Triptofan soya suyuna (TSB) aktarıldı. Bakteriyel izolatların süspansiyonu, bulanıklık için McFarland standardı No. 0,5'e ayarlandı. Her kültürün bir hacmi (200 µL), steril bir 96 oyuklu düz tabanlı mikrotitre plakasına üç kopya halinde ilave edildi. Plaka kapakları ile kapatıldı ve aerobik koşullar altında 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

Kuluçka döneminden sonra, ilgisiz bakterileri uzaklaştırmak için planktonik hücreler iki kez damıtılmış su ile durulandı. Her kuyudaki yapışık bakteri hücreleri, oda sıcaklığında 20 dakika boyunca 200 µL mutlak metanol ile sabitlendi. Yapışkan hücreler, her bir oyuğa 15 dakika boyunca 200 µL %0,1 kristal viyole eklenerek boyandı. Boyama reaksiyonu tamamlandıktan sonra, fazla leke, distile su ile tekrar tekrar yıkama (2-3 yıkama) ile çıkarıldı. Plaka, tamamen kuru olduğundan emin olmak için yaklaşık 30 dakika oda sıcaklığında kurutuldu ve son olarak boyamayı sabitlemek için %33 asetik asit ilave edildi.

Optik yoğunluk (OD), 630 nm dalga boyunda otomatik bir ELISA okuyucusu kullanılarak belirlendi. Steril ortam için ortalama O.D değerleri hesaplandı ve tüm test değerlerinden çıkarıldı. İzolatların biyo-ürün olarak sınıflandırılmasını sağlayabilecek bir cut-off değeri (O.Dc) hesaplanmıştır (Kirmusaoğlu2019).Burada ODc, Negatif kontrolün ortalama OD'si + Negatif kontrolün (3 × standart sapması (SD) şeklinde hesaplanmaktadır. OD izolatı iseizolatın ortalama OD'si – ODc şeklindedir.Bakteriyel bireyler için elde edilen OD değerlerine dayalı olarak Çizelge 3.5'te özetlenen bakteri yapışmasının sınıflandırılması gösterilmektedir.

Çizelge 3.5 Bakteriyel yapışmanın sınıflandırılması

Ortalama OD630	**Biyofilm yoğunluğu**
OD ≤ ODc*	Biyofilm olmayan
ODc < OD ≤ 2ODc	Zayıf

2ODc < OD ≤ 4ODc	Orta
OD > 4ODc	Güçlü

3.8 Bakteri İzolatlarının Saklanması

Bakteri izolatlarının saklanması kısa ve uzun süreli olmak üzere yapılmıştır.

Kısa süreli saklama: İzolatlar, Parafilm ile sıkıca kaplanmış besleyici eğimli buzdolabında 4°C'de saklandı.

Uzun süreli saklama: İzolatlar, 37 °C'de 18 saat boyunca beyin-kalp infüzyonu besiyerinde büyütüldü ve daha sonra steril gliserolün %20'si ilave edilerek -20°C'de tutuldu (Green2008).

3.9 UPEC İzolatları Tarafından Siderofor Üretiminin Tespiti

UPEC izolatlarında siderofor üretimi, Krom azurol sülfonat (CAS) analizi kullanılarak tespit edildi (Saleem and Shah 2017).Krom azurol sülfonat (CAS) ortamı, 60,5 mg CAS'ın 50 mL deiyonize su içinde çözülmesi ve 20 mL Fe3+ solüsyonu (1 mm FeCl3 – 6H2O, 10mM HCl) ile karıştırılmasıyla hazırlandı.Daha sonra bu solüsyon 40 mL distile suda çözülen 72,9mg hekzadesil trimetil amonyum bromür (HDTMA) ile karıştırılarak, solüsyonun rengi koyu mavi olduğunda otoklavlandı ve 900 mL distile suda eritilmiş otoklavlanmış 15g agar ile karıştırıldı.Daha sonra 30,24g 1,4-piperazin dietan sülfonik asit (PIPES) ve %50 NaOH'den oluşan 12g solüsyon pH'ı PIPES'in Pka'sına yükseltmek için ilave edildi.Bir jel zımba kullanılarak, modifiye edilmiş CAS agar plakası 2,5-5 mm çapında çukurcuklarla delindi.Bundan sonra, her oyuk, 2,5 mm'den iki kat seri olarak seyreltilmiş bakteri kültürü içeren 25-35 µL sıvı besi-yeri ile doldurulduu, plakalar 4-8 saat 37°C'de inkübe edildi.Renk maviden turuncuya veya sarıya döndüğünde ve her çukurun etrafında bir hale göründüğünde, bu renk değişimi olumlu bir sonuç olarak kabuledilir.

3.10 UPEC İzolatlarında Siderofor Genlerinin Saptanması için Moleküler Analiz

3.10.1 UPEC izolatlarından DNA ekstraksiyonu

Genomik DNA, Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, ABD) protokolüne göre ekstrakte edildi.

Bakteri hücrelerinden pelet elde etmek için, 1 mM Fe 3+ ile Krom azurol sülfonat (CAS) sıvı besi-yeri takviyesi üzerindeki UPEC izolatlarının gecelik kültüründen 1 mL, 2 dakika 13.000 rpm'de santrifüjlendi.Süpernatant atıldı, 600 µL nükleer lizis solüsyonu eklendi ve karıştırmak için hafifçe pipetlendi.Tüm karışımlar 80°C'de 5 dakika inkübe edildi ve ardından oda sıcaklığına soğutuldu. RNA'yı çözümlemek için, 3µL RNase solüsyonu karıştırıldı ve daha sonra 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.Sonra, hücre lizatına 200 µL protein çökeltme çözeltisi eklenerek protein çöktürüldü, vorteksle iyice karıştırıldı, -30°C'de inkübe edildi, daha sonra 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüjlendi. Seyreltilmiş DNA, 37ºC'de 600µL izopropanol içeren temiz bir tüpe aktarıldı. Dikkatlice karıştırıldıktan sonra, 2 dakika 13000 rpm'de bir santrifüj işlemi yapıldı, daha sonra süpernatany döküldü, 600 µL %70 etanol eklendi ve 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi.

3.10.2 DNA konsantrasyonunun belirlenmesi

Ekstrakte edilen DNA konsantrasyonunu belirlemek için Quantus Florometer kullanıldı.1 µL DNA 199 µL seyreltilmiş QuantyFlour Dye ile karıştırılarak yapıldı, ardından karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve daha sonra DNA konsantrasyon değerleri belirlendi.

3.10.3 UPEC izolatlarında siderofor genlerinin (irp2, iroN ve iucA) PCR ile belirlenmesi

UPEC izolatlarında siderofor üretimini kodlayan genlerin araştırılması için, Salehi *et al.* (2008) tarafından açıklanan yönteme bağlı kalındı. İlk olarak, 3µL şablon DNA'dan oluşan bir solüsyon karışımı hazırlandı.Her siderofor geni için 1 µL1,6 mikromolar primer oligonükleotit solüsyonu (Çizelge 3.6), 2,5 µL 10X PCR tamponu, 2mM $MgCl_2$, 0,4mM her nükleotid ve 25µL PCR reaksiyon karışımında 0,2 birim Smart Taq termostabil DNA polimeraz kullanıldı.İkinci olarak, bu karışım için amplifikasyon, bir TC-512 termocycler (Techne, Cambridge, UK) içinde gerçekleştirildi. Isısal döngü cihazı için program parametreleri başlatma için 30 saniye 94 °C, 7 saniye 42°C ve 70 saniye 72°C olmak üzere 2 döngü ve uzama için, 1 saniye 94°C, 7 saniye 42°C ve 70 saniye 72°C'lik 38 döngü ve son uzatma için 5 dakika 72°C kullanıldı.

PCR ürünleri, 75 dakika boyunca 80 V'ta %1,5 agaroz jel üzerinde elektroforez ile analiz edildi. Jeller, 15 dakika boyunca 0,5µg/mL etidyum bromür solüsyonunda boyandı.

Çizelge 3.6 UPEC izolatlarında Irp2, iroN ve iucA genlerinin PCR amplifikasyonu için primer çiftleri

Primer Adı	Dizilim	Ürün boyutu (bp)	Tavlama sıcaklığı (°C)
iucA	F: 5'-CCCGCCAGACGAATTGATTA-3' R: 5'-TGACCAGATGAGCAGGAAATG-3'	113	55
iroN	F:5'-GGAGTTCACCTGGGAAGATTAC-3' R: 5'-AAGCGGTTTGCCCGATAA-3'	101	55
irp2	F:5'-AAGGATTCGCTGTTACCGGAC-3' R: 5'-AACTCCTGATACAGGTGGC-3'	413	58

3.11 Demir İyonlarının UPEC İzolatlarında Siderofor Üretimini Kodlayan İfade Genleri Üzerindeki Etkisi

3.11.1 Fe 2+ ve Fe 3+ stok çözeltilerinin hazırlanması

1 mMFe2+ stok solüsyonunun (20mM) hazırlanması için, 556 mg demir sülfat ($FeS04.7H_2O$, Merck, Almanya) 100 mL damıtılmış su içinde çözüldü.Hazırlamak için, 1 mMFe3+, 541 mg demir klorür ($FeCl_3$, $6H_2O$, Merck, Almanya) stok solüsyonu (20mM) 100 mL damıtılmış su içinde çözüldü.Her iki stok çözelti de 0,4 mikron gözenek boyutuna sahip bir filtre kullanılarak filtrelendi (Khasheii *et al.* 2016).

3.11.2 Kültür ortamı

UPEC izolatları, CAS ortamına önceden hazırlanmış her bir demir stok solüsyonundan 2500µL eklenerek 1 mM demir iyonları ile ayrı ayrı takviye edilmiş Krom azurol sülfonat (CAS) sıvı besi-yerinde kültürlendi ve 37ºC'de 18 saat inkübe edildi. Bakteriyel büyümenin bulanıklığı, bir spektrofotometre kullanılarak optik yoğunluk (OD600) ile ölçülmüştür (Khasheii et al. 2016).

3.11.3 Gerçek zamanlı PCR ile UPEC izolatlarında siderofor üretimini kodlayan ifade genlerinin (*irp2, iroN* ve *iucA*) tespiti

3.11.3.1 RNA ekstraksiyonu

UPEC izolatlarından RNA ekstraksiyonu için, demir iyonlarının varlığında ve yokluğunda beyin kalp kültürleri, üstel büyüme fazına (OD600 = 0,2) ulaşılana kadar 37°C'de çalkalayıcı bir inkübatörde inkübe edildi. RNA sentezi ve bozunması 1:5 hacim durdurma solüsyonu (%90 etanol / %10 fenol) eklenerek bloke edildi.Ardından, üreticinin talimatlarına göre RNA saflaştırma kiti (Promega, ABD) kullanılarak RNA saflaştırması yapıldı. RNA miktarı, bir Nanodrop 1000 spektrofotometrede 260 nm absorbansta ölçülmüştür (Searle *et al.* 2015).

3.11.3.2 cDNA sentezi

Tamamlayıcı DNA (cDNA), sabit hacimde (15µL) konsantrasyonda (1000ng/µL) sentezlendi ve cDNA, tedarikçinin talimatlarına göre bir yüksek kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Kiti (Biosystems Applied™, ABD) kullanılarak ekstre edilmiş RNA'dan sentezlendi (Gomes *et at.* 2018).

3.11.3.3 Kantitatif PCR (qPCR)

Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR), 7500 Real-Time PCR Enstrümanında (Applied Biosystems™, ABD) elde edildi.20µl'lik reaksiyon karışımları şunları içeriyordu: 2×Power SYBR Green Mastermix (Termo Scientifc, ABD), 300nM nihai konsantrasyonda ileri ve ters primerler (Çizelge 3.7) ve 4µL seyreltilmiş (1:3) RT sonrası karışım cDNA (Searle *et al.* 2015).qPCR, şu koşullar altında gerçekleştirilmiştir: başlangıç adımı 95 °C'de 7 dakika, 95 °C'de 20 saniyelik ilk denatürasyon, 40 döngüde 59 °C'de 60 saniyelik bağlanma ve uzamadır.Toplam RNA'nın bağıl ifade verileri 2−ΔΔCt prosedürüne göre hesaplandı ve kat değişimi olarak sunuldu (Livak and Schmittgen 2001). Her qRT-PCR deneyi bir multipleks reaksiyon içermiştir ve *rpoB* dahili kontrol olarak kullanılmıştır (Soltanloo *et al.* 2010, El-Maraghy *et al.* 2020).

Çizelge 3.7 Bu çalışmada gerçek zamanlı PCR için kullanılan primerler

Siderofor Genleri	Dizilim	Ürün boyutu (bp)
Aerobactin *(iucA)*	F: 5'-CCCGCCAGACGAATTGATTA-3' R: 5'-TGACCAGATGAGCAGGAAATG-3'	113
Salmochelin *(iroN)*	F:5'-GGAGTTCACCTGGGAAGATTAC-3' R: 5'-AAGCGGTTTGCCCGATAA-3'	101
Yersiniabactin *(irp2)*	F:5'-AAGGATTCGCTGTTACCGGAC-3' R: 5'-AACTCCTGATACAGGTGGC-3'	413

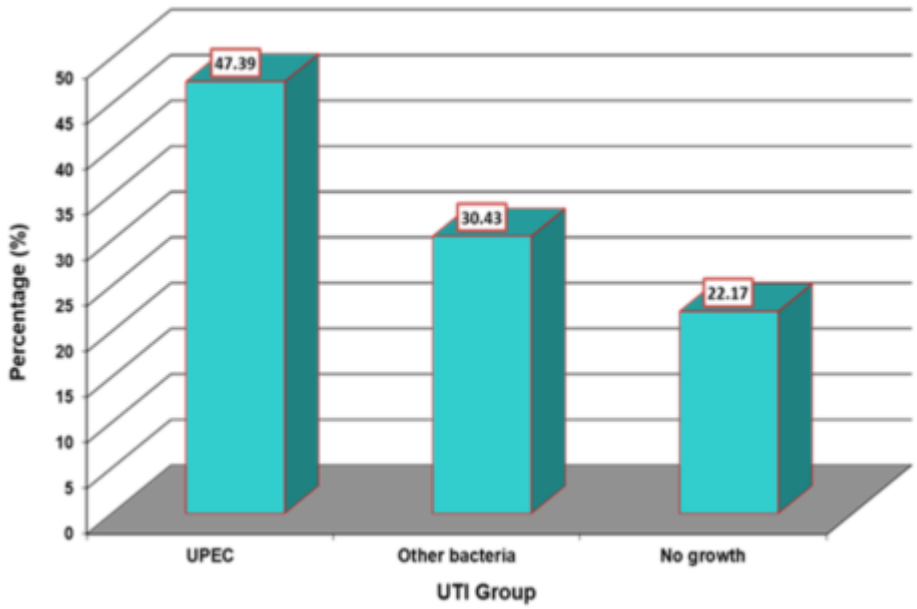
3.12 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz, ortalamaları karşılaştırmak için Tukey'nin test versiyonu 11.0 kullanılarak SAS programı ile yapıldı ($P > 0,05$).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

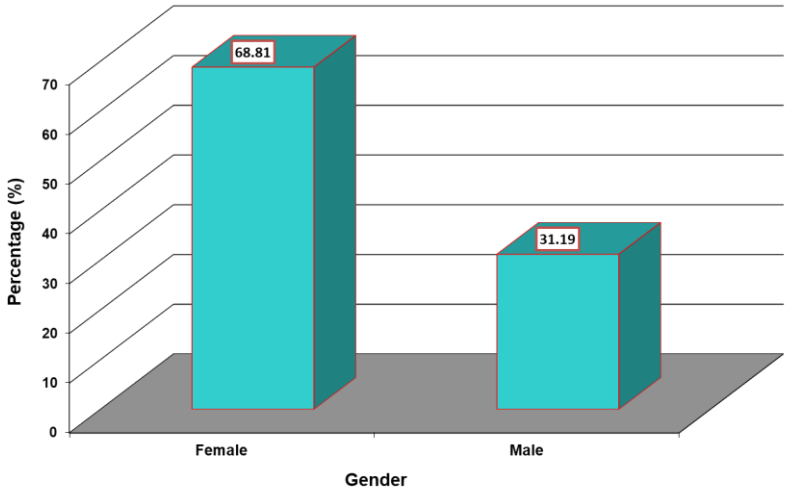
4.1 Hastalarda Üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC) Dağılımı

İdrar yolu enfeksiyonu (İYE) şüphesi olan hastalardan alınan 230 idrar örneğinin primer kültürü yapıldıktan sonra, 109 (%47,39) numunenin *Escherichia coli* ile enfekte olduğu, 70 (%30,43) numunenin diğer bakteriyel patojenlerle enfekte olduğu ve 51 (%22,17) numunede bakteri üremesi olmadığı (viral veya mantar enfeksiyonları olasılığı)gösterilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1İdrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan alınan idrar numunelerinde enfeksiyon yüzdesi

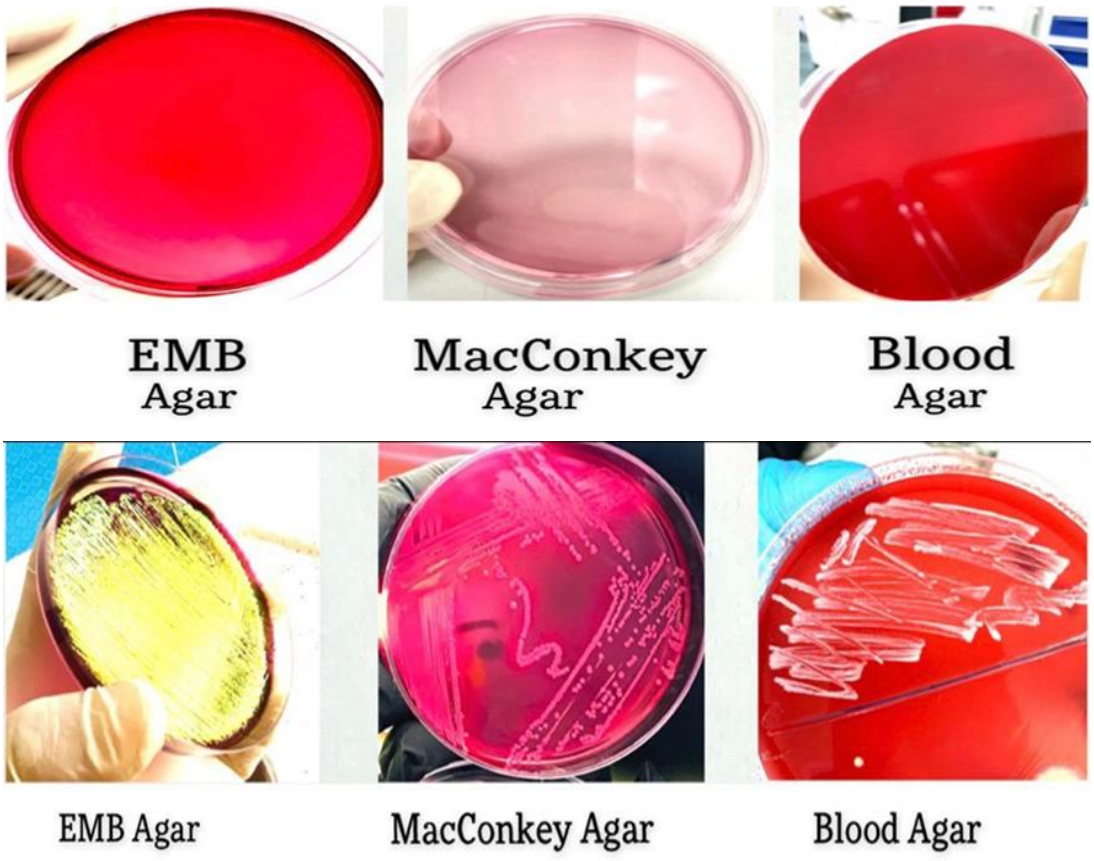
Cinsiyete göre İYE insidansı incelenip, sonuçlar karşılaştırıldığında kadınlarda(%68,81, $p \leq 0,05$) erkeklere (%31,19) oranla daha yüksek İYE prevalansı olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.2).Gerçekten de, üretranın kısalığı ve anüse yakınlığı nedeniyle kadınlarda bakterilerin rektumdan üretraya geçişi kolaydır, bu da bakterilerle enfeksiyon olasılığını artırır (Kolawole *et al.* 2009, Turay *et al.* 2014).



Şekil4.2 Cinsiyete göre hastalarda İYE yüzdesi ve dağılımı

4.2 UPEC İzolatlarının Kültürel Özellikleri

109 UPEC izolatının kültürel özellikleri, üç farklı kültür ortamı (Eosin Metilen Mavisi agar, MacConkey agar ve Blood agar) kullanılarak belirlendi (Şekil 4.3). Eosin Metilen Mavisi (EMB) ortamı üzerinde koyu merkez *E. coli* izolatları kolonileri ile yeşilimsi metalik parlaklığı gösterirken, MacConkey plakalarındaki koloniler ise laktoz fermantasyonu için pembe renkle ortaya çıkmıştır.Öte yandan, koloniler Kan plakalarında nemli ve gri dairesel olarak görünmüştür. Ayrıca, ışık mikroskobu altında UPEC izolatları gram negatif, kısa çubuklu ve sporsuz eski hücrelerdi (Levinson 2016, Al-Saadi and Abdullah 2019).



Şekil 4.3 Farklı kültür ortamlarında UPEC izolatlarının özellikleri

4.3 UPEC İzolatlarının Biyokimyasal Özellikleri

Çizelge 4.1, UPEC izolatlarının biyokimyasal özelliklerini göstermektedir.İzolatlar katalaz testi için pozitiftir, yani *E. coli* izolatları katalaz enzimini üretebilmektedir.Bu enzim, hidrojen peroksiti su ve oksijen gazına parçalayarak detoksifiye eder (Sharmin *et al.*2010).Ancak bu izolatlar oksidaz testi için negatiftir; kolonilerin rengi mora dönüşmemiştir çünkü bakteri hücrelerinde elektronları elektron taşıma zincirinden oksijene (son elektron alıcısı) aktaran ve onu suya indirgeyen sitokrom oksidaz bulunmamaktadır.

UPEC izolatları üreaz testine tabi tutulduğunda, sonuç negatif çıkmıştır, bu da izolatların üreyi amonyak ve CO_2'ye hidrolize edemedikleri anlamına gelmektedir.

IMViC testinin sonuçlarına göre, UPEC izolatları indol testine pozitif çıkmıştır, indol salınımı ile amino asit triptofanın parçalanması nedeniyle besiyerinin yüzeyinde kırmızı bir halka oluşmuştur.Bu, genellikle "triptofanaz" olarak adlandırılan bir sistem olan bir dizi farklı hücre içi enzim zinciri tarafından gerçekleştirilir.

Bu tahlil, bağırsak bakterileri ve UPEC bakterileri arasında ayrım yapmak için çok önemlidir. Ayrıca UPEC izolatları metil kırmızısı testinde pozitif sonuç göstermiştir, glikozu piruvik aside metabolize edebilmiş, bu da 'karışık asit yolu ile daha da metabolize edilerek stabil asidi üretmiştir ve bunun sonucu pH'ı 4,5 veya altına düşürmüştür ve bu metil kırmızısının renginin sarıdan kırmızıya değişmesiyle gösterilmektedir

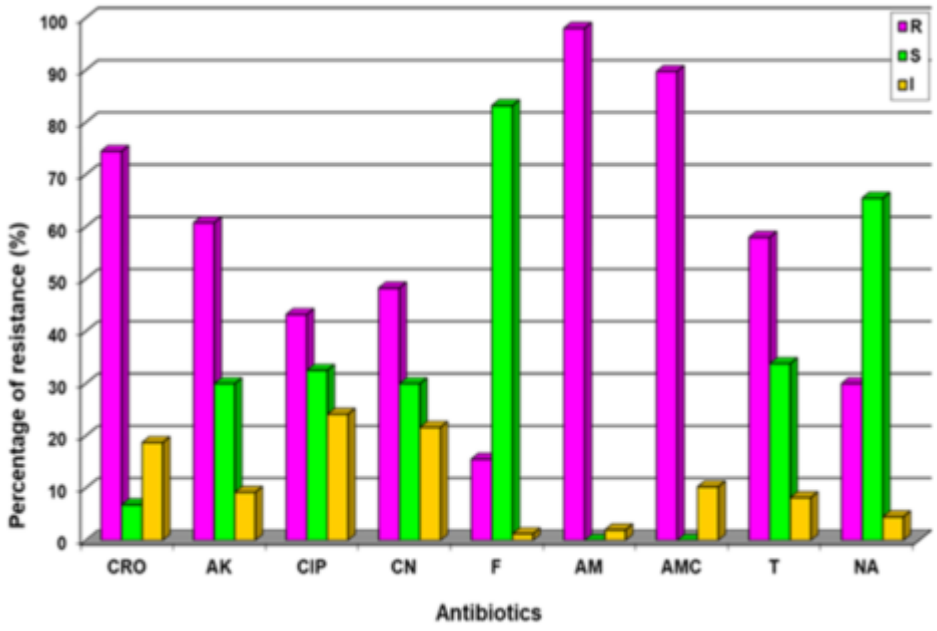
Voges-Proskauer testinin sonuçlarıyla ilgili olarak, pembe-kırmızı renk eksikliği, UPEC izolatlarının glikoz fermentasyonundan asetilmetil karbinol üretemediği anlamına gelen negatif sonucu yansıtmaktadır.UPEC izolatları da sitrat testine negatif çıkmıştır, besiyerinin yeşil rengi maviye değişmemiş olup bu sonuç, test bakterilerinin sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanma yeteneğinin olmadığını göstermektedir (Al-Saadi and Abdullah 2019).Ayrıca, yukarıdaki sonuçları doğrulamak için Vitek 2 testi de kullanılmıştır. Vitek 2 cihazı, UPEC izolatlarının tanımlanması için %99,0 doğruluk göstermiştir.

Çizelge 4.1 UPEC izolatlarının biyokimyasal özellikleri

Test	Sonuç
Katalaz	+
Oksidaz	-
Motilite testi	+
Üreaz testi	-
Sitrat kullanımı	-
Vogues-proskauer	-
Metil kırmızısı	+
İndol testi	+
H2S üretimi	-
Laktoz fermantasyonu	+
Gaz üretimi ile glikoz fermantasyonu	+

4.4 UPEC İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı

UPEC izolatlarının antibiyotiklere olan duyarlılığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4). *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için birçok bakterinin tedavisinde sık kullanılmaları nedeniyle 9 antibiyotik seçilmiştir.CRO = Seftriakson, AK = Amikasin, CIP = Siprofloksasin, CN = Gentamisin, F = Nitrofurantoin, AM = Ampisilin, AMC = Amoksisilin klavulanik asit, T = Tetrasiklin, NA = Nalidixi asit.



Şekil 4.4 UPEC izolatlarında antibiyotiklere direnç

UPEC'nin amikasin (AK) ve gentamisin (CN) tarafından temsil edilen Aminoglikozitlere karşı direnci sırasıyla %60 ve %48,3 idi.Bir antibiyotiğe karşı klasik direnç mekanizması, antibiyotiğin hedefinin bakteriyel modifikasyonudur. Aminoglikozitler (AG'ler) için, bakteriyel ribozomun A bölgesi hedef bölgeyi temsil eder. Bakterilerin AG'ler tarafından inhibisyonundan kaçınmak için kazanılmış iki potansiyel direnç mekanizması vardır: ribozomun mutasyonları veya ribozomun enzimatik modifikasyonları.AG direnci, AG bağlanmasını engelleyen 16S rRNA'yı kodlayan ribozomal RNA'lar *(rrs)* genindeki mutasyonlardan kaynaklanabilir. Ancak bu mutasyonlar, bu hayati hücresel mekanizmadaki değişiklikler olarak çok yaygın değildir (Garneau-Tsodikovaa and Labby 2016).

İzolatların bu antibiyotiklere karşı direnç oranlarının yüksek olmasını mutasyona uğramış izolatların ortaya çıkmasına neden olan subterapötik dozların kullanılması nedeniyle bakterilerin neden olduğu direncin kendi lehine gelişmesine ek olarak gelişigüzel antibiyotik kullanımının artmasıyla da açıklamak mümkündür (Magnet and Blanchard 2005).

UPEC izolatlarının siprofloksasin(CIP) ve nalidiksik asit(NA) ile temsil edilen kinolonlara duyarlılığı ile ilgili olarak, sonuçlar izolatların %43,23'ünün siprofloksasine direnç gösterdiğini ve izolatların %30'unun nalidiksik aside dirençli olduğunu göstermiştir. Ancak *qnr* genlerinin varlığı ile kinolon direnci arasında bir ilişki gözlenmiştir (Malekzadegan *et al.* 2019).*Qnr* ailesinin *E. coli*'deki kinolon direncinin ana mekanizması olmadığı ve *gyrA* ve *parC* genlerindeki nokta mutasyonları gibi diğer mekanizmaların direncin desteklenmesinde rol oynayabileceği görülmektedir (Correia *et al.* 2017).

UPEC izolatının %98'i ampisiline (AMP) direnç göstermesi dikkate değer bir bulgudur.Yarı sentetik bir β-laktam antibiyotik olan ampisilin, bakteri hücre duvarının sentezini engelleyerek bakterilerin aktif replikasyon aşamasında çalışır. Bakteriler genellikle böyle bir antibiyotiğe şu yollarla direnç gösterirler: β-laktamazı kodlar, hücre duvarındaki hedef proteini değiştirir, dış zarın geçirgenliğini azaltır ve ilaç akış pompasının ifadesini arttırır (Kot 2019, Li *et al.* 2019).Ayrıca nitrofurantoin ile temsil edilen Nitrofuranlara karşı %15,54 UPEC izolatı direnç göstermiştir.Nitrofurantoin (F) komplike olmayan sistit tedavisi için önerilmektedir ve şu anda UPEC'nin nitrofurantoine direnci çok düşüktür. Nitrofurantoine direnç, bakteri hücresindeki çoklu hedeflerde bu antimikrobiyal etkiler nedeniyle diğer ilaçlar kadar hızlı gelişmemiştir (Shaktiand Veeraraghavan 2015).

Sandegren vd. (2008), nitrofurantoine direnç kazandıran mutasyonları tanımlayıp ve mutasyon sıklığının *E. coli*'de yaklaşık 10−7/hücre olduğunu bulmuştur. Oksijene duyarsız nitroredüktazları kodlayan *nsfA* ve *nfsB* genlerindeki mutasyonlar nitrofurantoin direncinden sorumludur. Ayrıca, terapötik konsantrasyonlarda nitrofurantoin varlığında bakteri hücrelerinin büyümesinin, nitrofurantoine dirençli

mutantlarda büyük ölçüde azaldığı bulunmuştur. Nitrofurantoin varlığında dirençli mutantların muhtemelen bir enfeksiyon oluşturamadığını gösterebilir (Sandegren *et al.* 2008).

Amoksisilin-Klavulanat ile temsil edilen β-laktamaz inhibitörüne direnç de test edildi ve sonuçlar UPEC izolatlarının %89,75'inin amoksisilin-klavulanata dirençli olduğunu gösterdi.Aslında, seçilmemiş büyük bir klinik veri setinde düzenli olarak görülen amoksisilin-klavulanata (AMC) direnç mekanizmaları, çok kopyalı beta-laktamaz genlerinin kombinasyonlarından, direnç geni ile ilişkili promotörlerdeki mutasyonlardan ve inhibitör direnç mekanizmalarından kaynaklanan çok faktörlüydü (Davies *et al.* 2020).Ayrıca, UPEC izolatlarının %74,46'sı Seftriakson (CRO)'ya dirençlidir. Seftriakson, *E. coli* gibi Enterobacteriaceae'nin neden olduğu invaziv enfeksiyonları tedavi etmek için sıklıkla kullanılan üçüncü nesil bir sefalosporin antibiyotiktir (Chua and Stewardson 2019).Enterobacteriaceae arasında seftriakson direncinin en yaygın mekanizmaları geniş spektrumlu ß-laktamazlar (ESBL'ler) ve AmpC ß-laktamazlardır. Bu enzimleri kodlayan genler bakteriler arasında yatay olarak bulaşabilir ve direncin yayılmasını kolaylaştırır (Iredell *et al.* 2016).

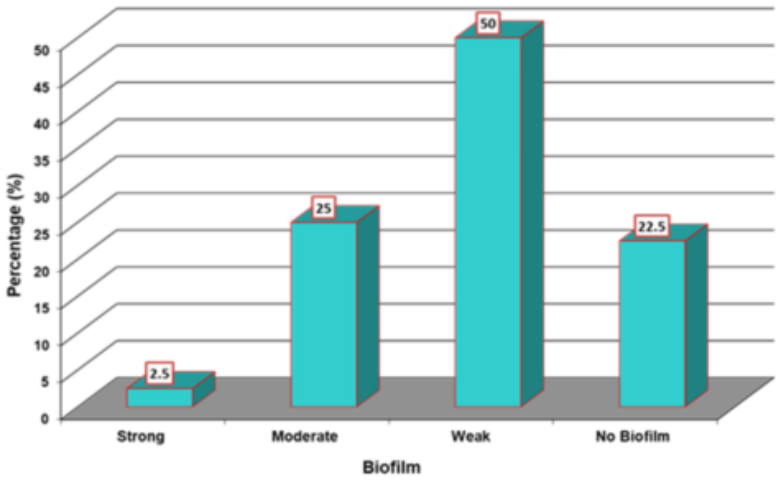
Öte yandan UPEC izolatlarının %58'i tetrasikline (T) dirençlidir. Tetrasiklin direnç genleri genellikle plazmitlerde ve transpozonlarda kodlanır ve konjugasyon yoluyla iletilir (Jahantigh *et al.* 2020).Ancak bazı izolatlarda ilgili genler kromozomda da bulunur (Oppegaard *et al.* 2001).*Tet* genlerinin kazanılması yoluyla tetrasikline direnç mekanizmaları temel olarak dışa akış pompalarını, ribozomal korumayı ve enzimatik deaktivasyonu içerir.Mutasyonlar ayrıca antibiyotik direncine de katkıda bulunur (Koo and Woo 2011). Gram negatif bakterilerde en yüksek frekansta bulunan *tet* genleri, *tetA, tetB, tetC, tetD* ve *tetG* genleri tarafından kodlanan akış pompalarıyla ilişkilidir (Skockova *et al.* 2012).

4.5 UPEC İzolatları Tarafından Biyofilm Oluşumu

80 UPEC izolatında biyofilm oluşumu Microtiter plate yöntemi kullanılarak belirlendi. Şekil 4.5 izolatların 62'sinin (%77,5) farklı profillerde biyofilm oluştuğunu

göstermektedir; 2 (%2,5) izolat güçlü biyofilm, 20 (%25) izolat orta düzeyde biyofilm ve 40 (%50) izolat zayıf biyofilm ile ortaya çıkmıştır. Ayrıca 18 (%22,5) izolatta biyofilm üretimi bulunmamaktadır.

Waksman ve Hultgren (2009), UPEC suşlarının ve diğer patojenik *E. coli* türlerinin, şaperon usher yolu (CUP) tarafından birleştirilen çok alt birimli yapışkan organeller olan tip 1 pili'ye büyük ölçüde bağımlı olduğunu doğrulamıştır.UPEC, bir dizi CUP pili sistemini barındırır ve farklı ifadesinin farklı nişlerin kolonizasyonunu kolaylaştırdığı düşünülür (Spurbeck *et al.* 2011).Tip 1 pili, büyük ölçüde biyotik ve abiyotik yüzeylerde mannosillenmiş kısımları bağlayan FimH uç yapışması yoluyla yapışmaya aracılık eder.Hadjifrangiskou vd. (2012) FimH'nin mesane epiteline UPEC bağlanmasına aracılık ettiğini ve ayrıca mesane epitel hücrelerinde biyofilm benzeri hücre içi bakteri topluluklarının (IBC'ler) uygun oluşumu için gerekli olduğunu bildirmiştir.



Şekil 4.5UPEC adalarında biyofilm oluşumunun yüzdesi

4.6 UPEC İzolatlarında Ürovirülans Belirteci Olarak Siderofor

4.6.1 UPEC izolatlarından DNA ekstraksiyonu

DNA, üç UPEC izolatından ekstre edildi; R5'i güçlü biyofilm oluşumu ile izole, R32'yi zayıf bir biyofilm üreticisi olarak izoleve R40'ı biyofilm üretimi olmadan izole şeklinde.

DNA konsantrasyonu 50 ile 360 mg/µL arasında, saflığı ise 1,8 ile 2,0 arasında değişmiştir.

4.6.2 UPEC izolatları ile siderofor üretimi

Üç UPEC izolatında ürovirülans belirteci olarak siderofor üretimi (güçlü bir biyofilm üreticisi izolatı R5, zayıf bir biyofilm üreticisi izolatı R32 ve biyofilm üretmeyen izolat R40)PCR kullanılarak sideroforu kodlayan genlerin *(irp2, iroN ve iucA)* amplifiye edilmesiyle araştırıldı.Çizelge 4.2 güçlü ve zayıf biyofilm üreten izolatlar olan R5 ve R32'nin yersiniabaktin geni *(irp2),* salmokelin geni *(iroN)* ve siderofor üretimini kodlayan aerobaktin geni *(iucA)* için pozitif sonuç verdiğini ortaya koymuştur.Buna karşılık, biyofilm üretmeyen izolat R40, siderphore üretimini kodlayan genlere sahip değildir.

Çizelge 4.2 Farklı biyofilm formasyonu profiline sahip UPEC izolatlarında sideroforu

UPEC izolatları	**Biyofilm oluşumu**	**Siderofor genleri**		
		irp2	***iroN***	***iucA***
R5	Güçlü	+	+	+
R32	Zayıf	+	+	+
R40	biyofilm yok	-	-	-

kodlayan genler

Aslında demir, bakteriler de dahil olmak üzere neredeyse tüm canlı organizmalar için gerekli metaldir. Patojenik bakteriler tarafından demir elde edilmesi, büyümeleri ve biyofilm oluşumu için kesinlikle gerekliydi (Razzi *et al.* 2019).

İdrar yolu enfeksiyonları sırasında, UPEC izolatları, demirin sınırlı olduğu çevre ortamından verimli demir alımı için farklı stratejiler uygular. Bakterilerin çevrede yaşaması ve büyümesi için önemli stratejilerden biri, sideroforlar adı verilen düşük moleküler ağırlıklı, yüksek afiniteli demir şelatlayıcı ajanların sentezidir (Mann *et al.*

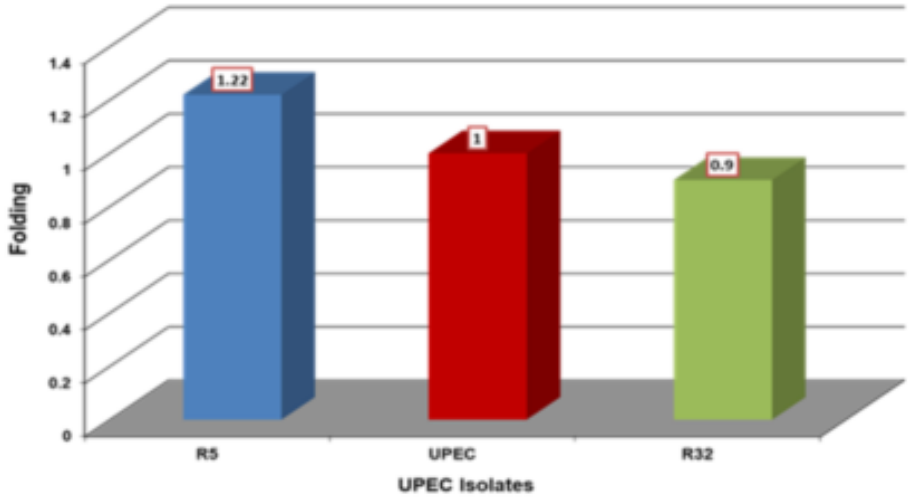
2017).Enfeksiyon sırasında *E. coli* suşları dört tip siderofor ile ifade edilebilir; enterobaktin, aerobaktin, salmochelin ve yersiniabactin (Khasheii *et al.* 2016).Elde ettiğimiz sonuçlarla ilgili olarak, biyofilm oluşumu ile siderofor üretimi arasında bir ilişki olduğu söylenebilir. Dikkate değer, hücre morfolojisi ve moleküler biyoloji çalışmaları, idrar yolu enfeksiyonuna neden olan *E. coli* suşlarına özgü UPEC ekspres fimbria, pili ve siderofor üretimini ortaya çıkarmıştır (Vagarali *et al.* 2008). Bununla birlikte, daha önceki bir çalışmada, İYE'li hastalardan alınan *E. coli'de* sideroforlar ve p-fimbriaların yaygın olarak birlikte bulunduğunu doğrulamıştır (Stapleton *et al.* 1991).

4.6.3 Demir iyonlarının (Fe2+, Fe3+) UPEC izolatları tarafından siderofor üretimini kodlayan genlerin ifadesi üzerindeki etkisi

1 mM demir iyonlarının (Fe2+, Fe3+) siderofor genlerinin (*irp2, iroN ve iucA*) ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi, iki UPEC izolatında, izolat R5'in güçlü bir biyofilm üreticisi ve izolat R32'de zayıf bir biyofilm üreticisi olarak şu şekilde belirlendi:

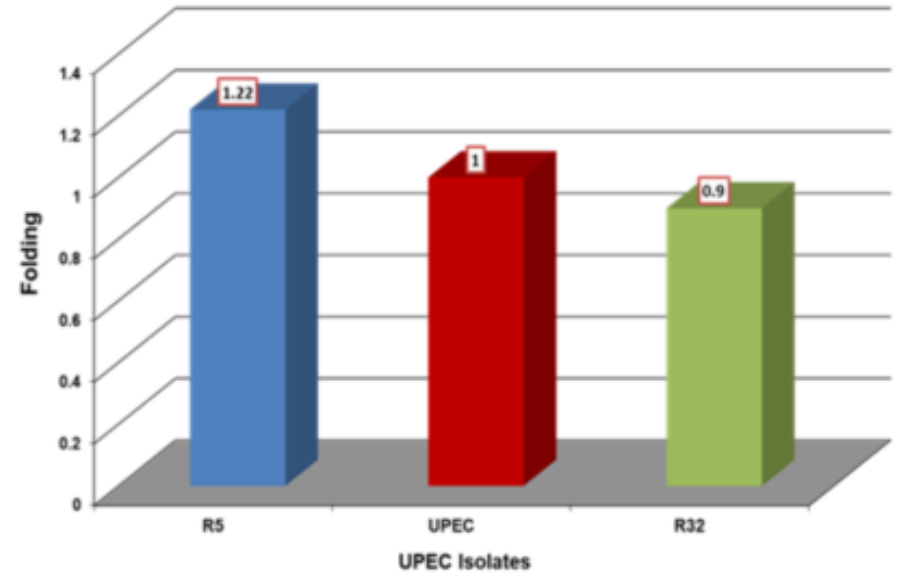
4.6.3.1 Demir iyonunun UPEC izolatlarında yersiniabaktin geni, salmokelin geni ve aerobaktin geninin (iucA) ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi

1 mM Fe2+ varlığında, sonuç Şekil 4.6'da gösterilmektedir. Kontrole kıyasla güçlü biyofilm üreten izolat R5'te yersiniabaktin geni, *irp2*'nin ekspresyon seviyesinde anlamlı olmayan ($p \leq 0,05$) bir yukarı regülasyonu gösterdi, katlama değeri 1,22 idi.Zayıf biyofilm üreten izolat R32, *irp2*'de kontrol ile karşılaştırıldığında önemli olmayan farklılıklarla aşağı regülasyon ile ortaya çıkarken, katlama değeri sırasıyla 0,9 ve 1'di.



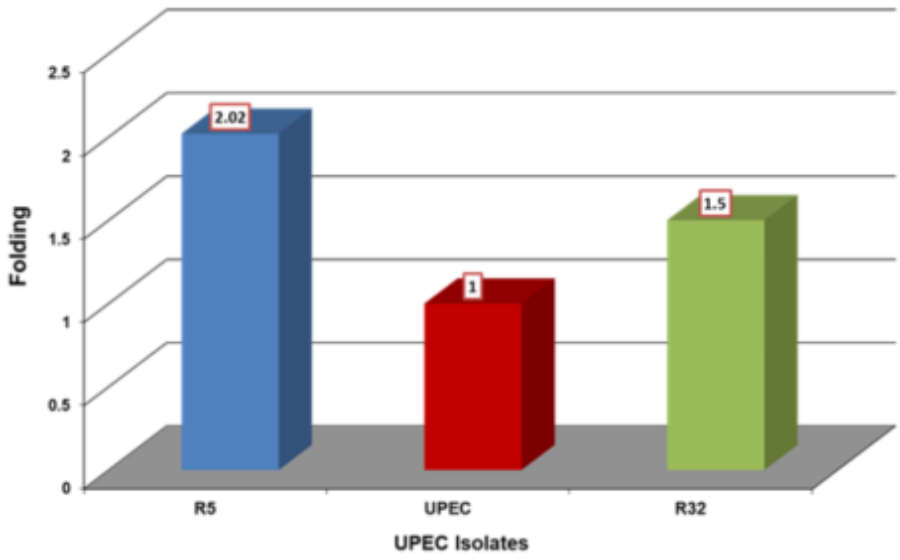
Şekil 4.6UPEC izolatlarında 1 mM Fe 2+'nın irp2 ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi

Salmokelin geni, iroN'nin ekspresyonu ile ilgili olarak, sonuçlar, UPEC izolatlarının ferröz iyon varlığında kültivasyonunun, her iki izolatta, R5 ve R32'de iroN geninin ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir.Kayda değer, güçlü biyofilm üreten izolat R5'te, zayıf biyofilm üreten izolat R32 ile karşılaştırıldığında, iron ekspresyon seviyesi önemli ölçüde ($p \leq 0,05$) yukarı doğru düzenlenmiştir, katlama değeri sırasıyla 1,22 ve 0,9'dur.(Şekil 4.7). Mavi renk: R5 izolatı, kırmızı renk: rpoB kontrol geni, Yeşil renk: R32 izolatını göstermektedir.



Şekil 4.7 UPEC izolatlarında 1 mM Fe 2+'nın demirN ekspresyon düzeyine etkisi

Demir iyonu ayrıca, hem UPEC izolatlarında, R5 hem de R32'de aerobaktin geninin (iucA) ekspresyonunu arttırdı. Zayıf biyofilm üreten izolat R32 ile karşılaştırıldığında, güçlü biyofilm üreten izolat R5'te iucA'nın ekspresyon seviyesinde önemli bir artış ($p \leq 0,01$) tespit edildi; katlama değeri sırasıyla 2,02 ve 1,5 idi (Şekil 4.8).



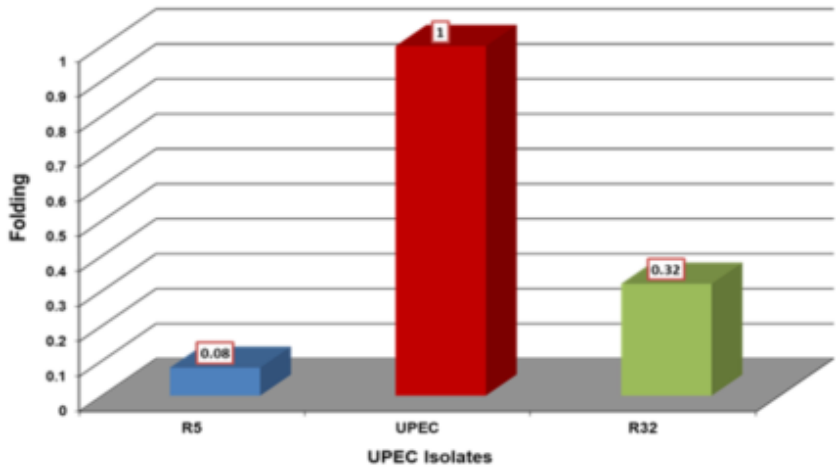
Şekil 4.8UPEC izolatlarında 1 mM Fe2+'nın *iucA* ekspresyon düzeyine etkisi

4.6.3.2 Ferrik iyonun UPEC izolatlarında yersiniabaktin geni (irp2),salmokelin geni (iroN) ve aerobaktin geninin (iucA) ifade seviyesi üzerindeki etkisi

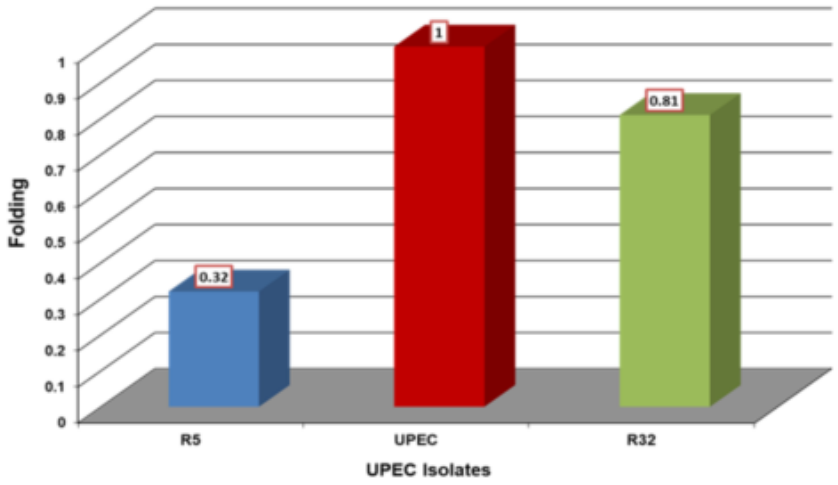
UPEC izolatlarında 1 mM Fe 3+'nın yersiniabaktin geni *irp2*'nin ekspresyon düzeyine etkisi tespit edildi. Kontrol ile karşılaştırıldığında her iki UPEC izolatında (R5 ve R32) *irp2'*de bir aşağı regülasyon tespit edildi (Şekil 4.9). Ayrıca, *irp2*'nin R5 izolatındaki ekspresyon seviyesi, R32 izolatındaki seviyesine kıyasla önemli ölçüde azalmıştır ($p \leq 0,05$), katlama değeri sırasıyla 0,08 ve 0,32 idi.

Öte yandan, Şekil 4.10'daki sonuçlar, zayıf biyofilm üreten izolat R32 ile karşılaştırıldığında, güçlü biyofilm üreten izolat R5'te ferrik iyonun önemli ölçüde ($p \leq 0,05$) aşağı regüle edilmiş salmochelin geni,iroN olduğunu göstermiştir; katlama değeri sırasıyla 0,32 ve 0,81 idi.

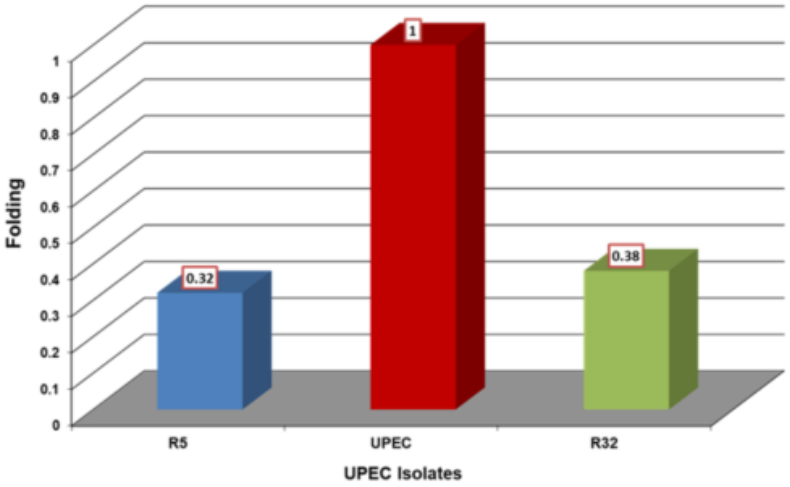
Ek olarak, 1 mM Fe3+, kontrol ile karşılaştırıldığında, çalışılan her iki UPEC izolatında da aerobaktin geni, *iucA*'yı önemli ölçüde ($p \leq 0,05$) aşağı regüle etmiştir (Şekil 4.11). Kayda değer, R5 ve R32 izolatında ekspresyon geni *iucA* seviyesinde önemli ($p \leq 0,05$) farklılıklar bulunmamaktadır, katlama değeri sırasıyla 0,32 ve 0,38 idi.



Şekil 4.9UPEC izolatlarında 1 mM Fe 3+'nın *irp2* ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi



Şekil 4.10 UPEC izolatlarında 1 mM Fe 3+'nın *iroN* ekspresyon düzeyine etkisi.



Şekil 4.11UPEC izolatlarında 1 mM Fe3+'nın *iucA* ekspresyon düzeyine etkisi

Yukarıdaki sonuç, UPEC izolatları tarafından siderofor üretiminin demir ve demir iyonları (Fe2+) ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. 1 mM demirli iyon, siderofor genleri, yersiniabaktin *(irp2),* salmokelin *(iroN)* ve aerobaktin *(iucA)* ekspresyon seviyesini indükledi, özellikle aerobaktinde (*iuc*A) önemli ($p \leq 0,05$) bir yükselme tespit edildi.Bu bulgu, ferrik iyonun siderofor genlerinin promotöründe demetilasyonu indüklediğini ve bunun da bakterilerde siderofor üretimini kodlayan ekspresyon genlerini yukarı regüle ettiğini düşündürebilir (Weigele and Raleigh 2016).

Buna karşılık, 1 mMferrik iyonu (Fe3+), UPEC izolatlarında siderofor genleri, yersiniabaktin (*irp2),* salmokelin *(iroN)* ve aerobaktin *(iucA)* önemli ölçüde ($p \leq 0,05$) aşağı regüle olmuştur. Bu demir iyon konsantrasyonunun bakteri üremesi üzerinde toksik bir etkiye sahip olabileceği, büyüme hızının azaldığı, ardından bakterilerde siderofor üretimi dahil tüm biyolojik aktivitenin inaktif olacağı önerilebilir (Kalantari and Ghaffari2008).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

E. coli, İYE'ye neden olan bakteriler arasında en baskın türdür. Kadınlar İYE'ye erkeklerden daha duyarlıdır. UPEC izolatları, özellikle Ampisilin ve Amoksisilin-Klavulanik asit başta olmak üzere İYE'lerin tedavisi için yaygın olarak reçete edilen antimikrobiyallere karşı çoğunlukla yüksek direnç oranlarıdır. Çoğu izolat üropatojenik *Escherichia coli* bir biyofilm oluşturur.Ayrıca, siderofor üretimini kodlayan genler, iucA, iroN ve irp2, güçlü biyofilm ve zayıf biyofilm üreten izolatlarda bulunur. UPEC izolatlarının siderofor üretimi, demir ve demir iyonları ile güçlü bir şekilde ilişkili bulunmuştur. 1 mM demir iyonu(Fe2+), siderofor genlerinin, yersinibaktin (irp2), salmolelin (iroN) ve aerobaktin (iucA) ekspresyon seviyesini indüklemiştir. Aynı 1 mM demir iyon konsantrasyonu önemli ölçüdeyken ($p \leq 0,05$), UPEC izolatlarında siderofor üretimini kodlayan çalışılan genleri down-regüle etmiştir.

Mevcut çalışmanın bulgularından, UPEC'in biyofilmler oluşturmak ve konakçıda bulunan besinden yoksun ortamda hayatta kalmak için siderofor aracılı bir demir edinme stratejisine dayandığına dair kanıtlar incelenmelidir. Ek olarak, *Escherichia coli* biyofilmi ile ilişkili enfeksiyonlara karşı yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi için uygun bir hedef olarak siderofor biyosentezinin potansiyeli araştırılmalıdır. *Escherichia coli'de* demir homeostazı ve virülans faktörlerinin düzenlenmesi için küçük düzenleyici RNA'nın (sRNA) önemine dayanarak, patojenik *E. coli* ve diğer bakteriyel patojenlere karşı bir hedef olarak sRNA önerilebilir. Ayrıca, ekspresyonu DNA metilasyonu ile düzenlenen *E. coli*genlerinin tanımlanması ve bu metilasyonda yer alan düzenleyici sistemlerin tanımlanması, epigenetik düzenleme yoluyla *E. coli* hücre adaptasyonunun biyolojik olarak anlaşılmasına katkıda bulundukları için saptanmalıdır. Ayrıca gelecekteenterobaktin üzerinde de benzer çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

Al-Guranie, D. R. and Al-Mayahie, S. M. 2020. Prevalence of *E. coli* ST131 among Uropathogenic *E. coli* Isolates from Iraqi Patients in Wasit Province, Iraq. International Journal of Microbiology, 41: e8840561.

Al-Saadi, Z. H. A. and Abdullah, R. M. 2019. Phenotypıc And Molecular Detectıon Of Escherıchıa Colı Efflux Pumps From Utı Patıents. Biochemical and Cellular Archives, 19(1): 2371-2376.

Bien, J., Sokolova, O. and Bozko, P. 2012. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. International journal of nephrology, 23: 67-73.

Bister, B., Bischoff, D., Nicholson, G. J., Valdebenito, M., Schneider, K., Winkelmann, G. and Süssmuth, R. D. 2004. The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of Salmonella enterica. Biometals, 17(4): 471-481.

Bonkat, G., Bartoletti, R., Bruyère, F., Cai, T., Geerlings, S. E., Köves, B. and Wagenlehner, F. 2021. Urological infections—2021. Kidneys, 10(3): 169-172.

Braun, V., Brazel-Faisst, C. and Schneider, R. 1984. Growth stimulation of *Escherichia coli* in serum by iron (III) aerobactin. Recycling of aerobactin. FEMS microbiology letters, 21(1): 99-103.

Brown, A. 2012. Benson's microbiological applications: laboratory manual in general microbiology, complete version. International edition, McGraw-Hill, USA.

Brown, A. and Smith, H. 2014. Benson's Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology, Short Version. McGraw-Hill, USA.

Brumbaugh, A. R., Smith, S. N., Subashchandrabose, S., Himpsl, S. D., Hazen, T. H., Rasko, D. A. and Mobley, H. L. 2015. Blocking yersiniabactin import attenuates extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in cystitis and pyelonephritis and represents a novel target to prevent urinary tract infection. Infection and immunity, 83(4): 1443–1450.

Cassat, J. E. and Skaar, E. P. 2013. Iron in infection and immunity. Cell host & microbe, 13(5): 509-519.

Chaturvedi, K. S., Hung, C. S., Crowley, J. R., Stapleton, A. E. and Henderson, J. P. 2012. The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. Nature chemical biology, 8(8): 731-736.

Chen, S. L., Hung, C. S., Xu, J., Reigstad, C. S., Magrini, V., Sabo, A. and Gordon, J. I. 2006. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(15): 5977-5982.

Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M. and Beachey, E. H. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of clinical microbiology, 22(6): 996-1006.

Chua, K. Y. and Stewardson, A. J. 2019. Individual and community predictors of urinary ceftriaxone-resistant *Escherichia coli* isolates, Victoria, Australia. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 8(1): 1-11.

Collee, J., Fraser, A., Marmion, B. and Simmons, A. 1996. Practical Medical Microbiology. 14th ed. Churchill Livingston Inc. New York., pp. 84-90.

Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J. L. and Igrejas, G. 2017. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand?. Journal of medical microbiology, 66(5): 551-559.

Crosa, J. H. and Walsh, C. T. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. Microbiology and molecular biology reviews, 66(2): 223-249.

Dadi, B. R., Abebe, T., Zhang, L., Mihret, A., Abebe, W. and Amogne, W. 2020. Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia. BMC infectious diseases, 20(1): 1-12.

Davies, T. J., Stoesser, N., Sheppard, A. E., Abuoun, M., Fowler, P., Swann, J. and Walker, A. S. 2020. Reconciling the potentially irreconcilable? Genotypic and phenotypic amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 64(6): e02026-19.

De Lorenzo, V. and Martinez, J. L. 1988. Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 7(5): 621-629.

Delcaru, C., Alexandru, I., Podgoreanu, P., Grosu, M., Stavropoulos, E., Chifiriuc, M. C. and Lazar, V. 2016. Microbial biofilms in urinary tract infections and prostatitis: etiology, pathogenicity, and combating strategies. Pathogens, 5(4): 65-72.

Desilets, M., Deng, X., Rao, C., Ensminger, A. W., Krause, D. O., Sherman, P. M. and Gray-Owen, S. D. 2016. Genome-based definition of an inflammatory bowel disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* pathovar. Inflammatory bowel diseases, 22(1): 1-12.

Diaz, Y., Govasli, M. L., Zegeye, E. D., Sommerfelt, H., Steinsland, H. and Puntervoll, P. 2019. Immunizations with enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin conjugates engender toxin-neutralizing antibodies in mice that also cross-react with guanylin and uroguanylin. Infection and immunity, 87(7): e00099-19.

Eisenstein, B. I. and Jones, G. W. 1988. The spectrum of infections and pathogenic mechanisms of *Escherichia coli*. Advances in internal medicine, 33: 231-252.

Ellis, S. J., Yasir, M., Browning, D. F., Busby, S. J. and Schüller, S. 2019. Oxygen and contact with human intestinal epithelium independently stimulate virulence gene expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. Cellular microbiology, 21(6): e13012.

El-Maraghy, S. A., Adel, O., Zayed, N., Yosry, A., El-Nahaas, S. M. and Gibriel, A. A. 2020. Circulatory miRNA-484, 524, 615 and 628 expression profiling in HCV mediated HCC among Egyptian patients; implications for diagnosis and staging of hepatic cirrhosis and fibrosis. Journal of advanced research, 22: 57-66.

Emody, L., Kerenyi, M. and Nagy, G. 2003. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. International journal of antimicrobial agents, 22: 29-33.

Estrada-Garcia, T. and Navarro-Garcia, F. 2012. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 66(3): 281-298.

Fetherston, J. D., Bearden, S. W. and Perry, R. D. 1996. YbtA, an AraC- type regulator of the Yersinia pestis pesticin/yersiniabactin receptor. Molecular microbiology, 22(2): 315-325.

Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M. and Hultgren, S. J. 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature reviews microbiology, 13(5): 269-284.

Forbes, B. A., Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. 2007. Diagnostic microbiology. St Louis: Mosby.

Foxman, B. 2013. Urinary tract infection. Women and health, 12: 553-564.

Foxman, B., Zhang, L., Tallman, P., Palin, K., Rode, C., Bloch, C. and Marrs, C. F. 1995. Virulence characteristics of *Escherichia coli* causing first urinary tract infection predict risk of second infection. Journal of Infectious Diseases, 172(6): 1536-1541.

Frey, P. A. and Reed, G. H. 2012. The ubiquity of iron.ACS Chem Biol, 7:1477–1481.

Gardette, M., Le Hello, S., Mariani-Kurkdjian, P., Fabre, L., Gravey, F., Garrivier, A. and Jubelin, G. 2019. Identification and prevalence of in vivo-induced genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Virulence, 10(1): 180-193.

Garneau-Tsodikova, S. and Labby, K. J. 2016. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. Medchemcomm, 7(1): 11-27.

Gomes, A. É. I., Stuchi, L. P., Siqueira, N. M. G., Henrique, J. B., Vicentini, R., Ribeiro, M. L. and Ferraz, L. F. C. 2018. Selection and validation of reference genes for gene expression studies in Klebsiella pneumoniae using Reverse Transcription Quantitative real-time PCR. Scientific reports, 8(1): 1-14.

Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., Guth, B. E., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. and Martinez, M. B. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. brazilian journal of microbiology, 47, 3-30.

González, E., Ribas-Aparicio, R. M., Montealegre, G. E. R., Belmont-Monroy, L., Ortega-García, Y., Aparicio-Ozores, G. and Molina-López, J. 2021. Isolation and characterization of novel bacteriophages as a potential therapeutic option for *Escherichia coli* urinary tract infections. Applied microbiology and biotechnology, 105(13): 5617-5629.

Grabe, M., Bishop, M., Bjerklund-Johansen, T., Botto, H., Çek, M., Lobel, B. and Tenke, P. 2008. Management of urinary and male genital tract infections. European Association of Urology, 182: 237-257.

Green, L. H. 2008. Culturing and preserving microorganisms. Practical handbook of microbiology, IIth edn. CRC Press, Boca Raton, pp. 31-35.

Hadjifrangiskou, M., Gu, A. P., Pinkner, J. S., Kostakioti, M., Zhang, E. W., Greene, S. E. and Hultgren, S. J. 2012. Transposon mutagenesis identifies uropathogenic *Escherichia coli* biofilm factors. Journal of bacteriology, 194(22): 6195-6205.

Hagan, E. C., Lloyd, A. L., Rasko, D. A., Faerber, G. J. and Mobley, H. L. 2010. *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. PLoS pathogens, 6(11): e1001187.

Hamzah, W. K. and Khan, M. Y. 2017. Isolation And Molecular Characterizatıon Of Bacteria From Urinary Tract Infections.World Journal Of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,6(9): 810-825.

Hantke, K. 1990. Dihydroxybenzolyserine—a siderophore for *E. coli*. FEMS Microbiology Letters, 67(1-2): 5-8.

Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W. and Winkelmann, G. 2003. Salmochelins, siderophores of Salmonella enterica and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(7): 3677-3682.

Harris, W. R., Carrano, C. J. and Raymond, K. N. 1979. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 16. Isolation, characterization, and formation constants of ferric aerobactin. Journal of the American Chemical Society, 101(10): 2722-2727.

Henderson, J. P., Crowley, J. R., Pinkner, J. S., Walker, J. N., Tsukayama, P., Stamm, W. E. and Hultgren, S. J. 2009. Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. PLoS pathogens, 5(2): e1000305.

Hu, J. and Torres, A. G. 2015. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander. Clinical Microbiology and Infection, 21(8): 729-734.

Ibrahim, S. A., Mohamed, D. A. and Suleman, S. K. 2020. Microbial causes of urinary tract infection and its sensitivity to antibiotics at Heevi pediatric teaching hospital/Duhok City. Medical Journal of Babylon, 17(1): 109-115.

Ifergan, J., Pommier, R., Brion, M. C., Glas, L., Rocher, L. and Bellin, M. F. 2012. Imaging in upper urinary tract infections. Diagnostic and interventional imaging, 93(6): 509-519.

In, J., Foulke-Abel, J., Zachos, N. C., Hansen, A. M., Kaper, J. B., Bernstein, H. D. and Kovbasnjuk, O. 2016. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* reduces mucus and intermicrovillar bridges in human stem cell-derived colonoids. Cellular and molecular gastroenterology and hepatology, 2(1): 48-62.

Iredell, J., Brown, J. and Tagg, K. 2016. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. Bmj, 352: 37-44.

Jackson, E. C. 2015. Urinary tract infections in children: knowledge updates and a salute to the future. Pediatrics in review, 36(4): 153-64.

Jahantigh, M., Samadi, K., Dizaji, R. E. and Salari, S. 2020. Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. BMC Veterinary Research, 16(1): 1-6.

Jhang, J. F. and Kuo, H. C. 2017. Recent advances in recurrent urinary tract infection from pathogenesis and biomarkers to prevention. Tzu-Chi Medical Journal, 29(3): 131-7.

Johnson, J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clinical microbiology reviews, 4(1): 80-128.

Johnson, J. R. and Russo, T. A. 2002. Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non–urinary tract extraintestinal infections. The Journal of infectious diseases, 186(6): 859-864.

Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., O'bryan, T. T., Colodner, R. and Raz, R. 2005. Virulence genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among *Escherichia coli* urine sample isolates from Israeli women with acute uncomplicated cystitis. Antimicrobial agents and chemotherapy, 49(1): 26-31.

Johnson, J. R., Moseley, S. L., Roberts, P. L. and Stamm, W. E. 1988. Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. Infection and immunity, 56(2): 405-412.

Kalantari, N. and Ghafari, S. 2008. Evaluation of toxicity of heavy metals for *Escherichia coli* growth. IJEHSE, 15: 173-178.

Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature reviews microbiology, 2(2): 123-140.

Karam, G., Chastre, J., Wilcox, M. H. and Vincent, J. L. 2016. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. Critical Care, 20(1): 1-9.

Karigoudar, R. M., Karigoudar, M. H., Wavare, S. M. and Mangalgi, S. S. 2019. Detection of biofilm among uropathogenic *Escherichia coli* and its correlation with antibiotic resistance pattern. Journal of laboratory physicians, 11(01): 017-022.

Karmali, M. A. 2016. Emerging public health challenges of Shiga toxin–producing *Escherichia coli* related to changes in the pathogen, the population, and the environment. Clinical Infectious Diseases, 64(3): 371-376.

Katongole, P., Nalubega, F., Florence, N. C., Asiimwe, B. and Andia, I. 2020. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical isolates in Uganda. BMC Infectious Diseases, 20(1): 1-6.

Khan, A., Singh, P. and Srivastava, A. 2018. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator–Siderophore: A review. Microbiological research, 212: 103-111.

Khasheii, B., Anvari, S. and Jamalli, A. 2016. Frequency evaluation of genes encoding siderophores and the effects of different concentrations of Fe ions on growth rate of uropathogenic *Escherichia coli*. Iranian journal of microbiology, 8(6): 359-364.

Kim, K. S. 2013. Meningitis-associated *Escherichia coli*. In *Escherichia coli*, pp. 305-330. Academic Press.

Kirmusaoğlu, S. 2019. The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. In ExopolysaccharidesMethods of Preparation and Application. Technology Open.https://www.intechopen.com/chapters/65613. Erişim tarihi: 12 Kasım 2021.

Koh, E. I., Robinson, A. E., Bandara, N., Rogers, B. E. and Henderson, J. P. 2017. Copper import in *Escherichia coli* by the yersiniabactin metallophore system. Nature chemical biology, 13(9): 1016-1021.

Kolawole, A. S., Kolawole, O. M., Kandaki-Olukemi, Y. T., Babatunde, S. K., Durowade, K. A. and Kolawole, C. F. 2010. Prevalence of urinary tract infections (UTI) among patients attending Dalhatu Araf Specialist Hospital, Lafia, Nasarawa state, Nigeria. International journal of medicine and medical sciences, 1(5): 163-167.

Komala, M. and Kumar, K. S. 2013. Urinary tract infection: causes, symptoms, diagnosis and it's management. Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology, 1(2): 226-231.

Koo, H. J. and Woo, G. J. 2011. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. International journal of food microbiology, 145(2-3): 407-413.

Kot, B. 2019. Antibiotic resistance among uropathogenic *Escherichia coli*. Polish journal of microbiology, 68(4): 403-8.

Larzabal, M., Baldoni, H. A., Suvire, F. D., Curto, L. M., Gomez, G. E., Da Silva, W. M. and Enriz, D. 2019. An inhibitory mechanism of action of coiled- coil peptides against type three secretion system from enteropathogenic *Escherichia coli*. Journal of Peptide Science, 25(3): e3149.

Lee, D. S., Lee, S. J. and Choe, H. S. 2018. Community-acquired urinary tract infection by *Escherichia coli* in the era of antibiotic resistance. BioMed research international, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30356438/. Erişim tarihi 14 Kasım 2021.

Lee, H. S. and Le, J. 2018. Urinary Tract Infections: a review. Pharmacotherapy Self-Assessment Program 2018 Book 1. Infectious Diseases, pp. 7-28.

Leininger, T. 2001. New Negro Artists in Paris. Rutgers University Press, USA.

Levinson, W. 2016. Review of Medical Microbiology and Immunology. 14th ed. McGraw-Hill education, Inc. pp. 821.

Li, D., Li, P., Yu, X., Zhang, X., Guo, Q., Xu, X. and Wang, M. 2021. Molecular Characteristics of *Escherichia coli* Causing Bloodstream Infections During 2010–

2015 in a Tertiary Hospital, Shanghai, China. Infection and Drug Resistance, 14: 2079-85.

Li, X., Pei, G., Zhang, L., Cao, Y., Wang, J., Yu, L. and Wang, Q. 2019. Compounds targeting YadC of uropathogenic *Escherichia coli* and its host receptor annexin A2 decrease bacterial colonization in bladder. EBioMedicine, 50: 23-33.

Lin, H., Fischbach, M. A., Liu, D. R. and Walsh, C. T. 2005. In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. Journal of the American Chemical Society, 127(31): 11075-11084.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. methods, 25(4): 402-408.

MacFaddin, J. F. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria, Williams and Wilkins. Philadelphia, PA, pp. 113.

Magnet, S. and Blanchard, J. S. 2005. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. Chemical reviews, 105(2): 477-498.

Maina, D. and Kagotho, E. 2014. Suitability of Vitek 2 System in Identification and Susceptibility Testing of Gram Negative Bacteremias by Direct Inoculation. East African medical journal, 91(4): 115-118 .

Malekzadegan, Y., Rastegar, E., Moradi, M., Heidari, H. and Ebrahim-Saraie, H. S. 2019. Prevalence of quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in south Iran. Infection and drug resistance, 12: 1683-90.

Manges, A. R. 2016. *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. Clinical Microbiology and Infection, 22(2): 122-129.

Mann, R., Mediati, D. G., Duggin, I. G., Harry, E. J. and Bottomley, A. L. 2017. Metabolic adaptations of uropathogenic *E. coli* in the urinary tract. Frontiers in cellular and infection microbiology, 7: 241-247.

Mattoo, T. K., Shaikh, N. and Nelson, C. P. 2021. Contemporary Management of Urinary Tract Infection in Children. Pediatrics, 147(2): 112-8.

Medina, M. and Castillo-Pino, E. 2019. An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. Therapeutic advances in urology, 11: 175-183.

Micenková, L., Bosák, J., Vrba, M., Ševčíková, A. and Šmajs, D. 2016. Human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains differ in prevalence of

virulence factors, phylogroups, and bacteriocin determinants. BMC microbiology, 16(1): 1-8.

Mickymaray, S. and Al Aboody, M. S. 2019. In vitro antioxidant and bactericidal efficacy of 15 common spices: novel therapeutics for urinary tract infections?. Medicina, 55(6): 289-293.

Miethke, M. and Marahiel, M. A. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiology and molecular biology reviews, 71(3): 413-451.

Miller, M. C., Fetherston, J. D., Pickett, C. L., Bobrov, A. G., Weaver, R. H., DeMoll, E. and Perry, R. D. 2010. Reduced synthesis of the Ybt siderophore or production of aberrant Ybt-like molecules activates transcription of yersiniabactin genes in Yersinia pestis. Microbiology, 156(7): 2226-31.

Miryala, S., Nair, V. G., Chandramohan, S. and Srinandan, C. S. 2021. Matrix inhibition by Salmonella excludes uropathogenic *E. coli* from biofilm. FEMS Microbiology Ecology, 97(1):214-220.

Mirza, N. 2015. Immune response to Shiga toxin producing *Escherichia coli*: Detection of antibodies against outer membrane proteins of the bacteria in healthy population of Bangladesh, Doctoral dissertation, 89 pages, Brac University, Bangladesh.

Mittal, S., Sharma, M. and Chaudhary, U. 2015. Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. Pathogens and global health, 109(1): 26-29.

Mossel, D. A. A., Mengerink, W. H. J. and Scholts, H. H. 1962. Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of Enterobacteriaceae. Journal of Bacteriology, 84(2): 381-382.

Moynié, L., Milenkovic, S., Mislin, G. L., Gasser, V., Malloci, G., Baco, E. and Naismith, J. H. 2019. The complex of ferric-enterobactin with its transporter from Pseudomonas aeruginosa suggests a two-site model. Nature communications, 10(1): 1-14.

Mulvey, M. A. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. Cellular microbiology, 4(5): 257-271.

Munhoz, D. D., Nara, J. M., Freitas, N. C., Moraes, C. T., Nunes, K. O., Yamamoto, B. B. and Piazza, R. M. 2018. Distribution of major pilin subunit genes among

atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and influence of growth media on expression of the ecp operon. Frontiers in microbiology, 9: 942-7.

Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A. and Yolen, R. H. 2003. Manual of clinical microbiology. 8th. ed., American Society for Clinical Microbiology, Washington, USA.

Nagy, A., Xu, Y., Bauchan, G. R., Shelton, D. R. and Nou, X. 2016. Aggregative adherence fimbriae I (AAF/I) mediate colonization of fresh produce and abiotic surface by Shiga toxigenic enteroaggregative *Escherichia coli* O104: H4. International journal of food microbiology, 229: 44-51.

Navidinia, M., Peerayeh, S. N., Fallah, F., Bakhshi, B., Adabian, S., Alimehr, S. and Gholinejad, Z. 2013. Distribution of the Pathogenicity Islands Markers (PAIs) in Uropathogenic *E. coli* Isolated from Children in Mofid Children Hospital. Arch Pediatr Infect Dis,1(2): 75-79.

Naziri, Z., Kilegolan, J. A., Moezzi, M. S. and Derakhshandeh, A. 2021. Biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*: a complicating factor for treatment and recurrence of urinary tract infections. Journal of Hospital Infection, 11: 90-95.

Nicolle, L. E. 1997. A practical guide to the management of complicated urinary tract infection. Drugs, 53(4): 583-592.

Nikzad, M., Mirnejad, R. and Babapour, E. 2021. Evaluation of Antibiotic Resistance and Biofilm Formation Ability Uropathogenic *E. coli* (UPEC) Isolated From Pregnant Women in Karaj. Iranian Journal of Medical Microbiology, 15(2): 195-211.

O'Brien, V. P., Joens, M. S., Lewis, A. L. and Gilbert, N. M. 2020. Recurrent *Escherichia coli* Urinary Tract Infection Triggered by Gardnerella vaginalis Bladder Exposure in Mice. Journal of visualized experiments: Jove, 166: 55-61.

O'brien, V. P., Hannan, T. J., Yu, L., Livny, J., Roberson, E. D., Schwartz, D. J. and Hultgren, S. J. 2016. A mucosal imprint left by prior *Escherichia coli* bladder infection sensitizes to recurrent disease. Nature microbiology, 2(1): 1-10.

Ohlemacher, S. I., Giblin, D. E., d'Avignon, D. A., Stapleton, A. E., Trautner, B. W. and Henderson, J. P. 2017. Enterobacteria secrete an inhibitor of Pseudomonas virulence during clinical bacteriuria. The Journal of clinical investigation, 127(11): 4018-4030.

Okonko, I. O., Ijandipe, L. A., Ilusanya, A. O., Donbraye-Emmanuel, O. B., Ejembi, J., Udeze, A. O. and Nkang, A. O. 2010. Detection of urinary tract infection (UTI) among pregnant women in Oluyoro Catholic Hospital, Ibadan, South-Western Nigeria. Malaysian journal of Microbiology, 6(1): 16-24.

Oppegaard, H., Steinum, T. M. and Wasteson, Y. 2001. Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. Applied and environmental microbiology, 67(8): 3732-3734.

Orskov, I. and Orskov, F. 1985. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. Epidemiology & Infection, 95: 551-575.

Pasqua, M., Michelacci, V., Di Martino, M. L., Tozzoli, R., Grossi, M., Colonna, B. and Prosseda, G. 2017. The intriguing evolutionary journey of enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward pathogenicity. Frontiers in microbiology, 8: 2390-6.

Patel, I. R., Gangiredla, J., Lacher, D. W., Mammel, M. K., Jackson, S. A. and Lampel, K. A. 2016. FDA-*Escherichia coli* Identification (FDA-ECID) Microarray: A Pan-Genome Molecular Toolbox for Serotyping, Virulence Profiling, Molecular Epidemiology, and Phylogeny. Applied and environmental microbiology, 82(11):3384–94.

Perry, R. D. and Fetherston, J. D. 2011. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in Yersinia pestis pathogenesis. Microbes and infection, 13(10): 808-817.

Pollann, M. 2019. CBD Oil For Urinary tract infection (UTI): A Comprehensive Guide to Treating UTI Using CBD Oil. Independently published, 44 pages.

Ramos, S., Silva, V., Dapkevicius, M. D. L. E., Caniça, M., Tejedor-Junco, M. T., Igrejas, G. and Poeta, P. 2020. *Escherichia coli* as commensal and pathogenic bacteria among food-producing animals: Health implications of extended spectrum β-lactamase (ESBL) production. Animals, 10(12): 2239.

Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Myers, G. S., Mongodin, E. F., Fricke, W. F., Gajer, P. and Ravel, J. 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. Journal of bacteriology, 190(20): 6881-6893.

Reigstad, C. S., Hultgren, S. J. and Gordon, J. I. 2007. Functional genomic studies of uropathogenic *Escherichia coli* and host urothelial cells when intracellular

bacterial communities are assembled. Journal of Biological Chemistry, 282(29): 21259-21267.

Robinson, A. E., Heffernan, J. R. and Henderson, J. P. 2018. The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: the role of transition metal control in virulence. Future microbiology, 13(07): 745-756.

Rodriguez-Siek, K. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J. and Nolan, L. K. 2005. Characterizing the APEC pathotype. Veterinary research, 36(2): 241-256.

Rogawski, E. T., Guerrant, R. L., Havt, A., Lima, I. F., Medeiros, P. H., Seidman, J. C. and Mal-Ed Network Investigators. 2017. Epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. PLoS neglected tropical diseases, 11(7): e0005798.

Rubini, D., Varthan, P. V., Jayasankari, S., Vedahari, B. N. and Nithyanand, P. 2020. Suppressing the phenotypic virulence factors of Uropathogenic *Escherichia coli* using marine polysaccharide. Microbial pathogenesis, 141:e103973.

Saberianfar, R., Chin-Fatt, A., Scott, A., Henry, K. A., Topp, E. and Menassa, R. 2019. Plant-produced chimeric VHH-sIgA against enterohemorrhagic *E. coli* intimin shows cross-serotype inhibition of bacterial adhesion to epithelial cells. Frontiers in plant science, 10: 270-6.

Saleem, M. and Shah, M. 2017. Detection of Siderophore production in Uropathogenic Escherichia. coli in patients with Type 2 Diabetes Mellitus. Int J Med Microbiol Trop Dis, 3: 176-177.

Sandegren, L., Lindqvist, A., Kahlmeter, G. and Andersson, D. I. 2008. Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 62(3): 495-503.

Santos, A. K. S., de Medeiros, P. H. Q., Bona, M. D., Prata, M. M., Amaral, M. S., Veras, H. N. and Lima, A. A. 2019. Virulence-related genes and coenteropathogens associated with clinical outcomes of enteropathogenic *Escherichia coli* infections in children from the Brazilian semiarid region: a case-control study of diarrhea. Journal of clinical microbiology, 57(4): e01777-18.

Schmidt, H. and Hensel, M. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clinical microbiology reviews, 17(1): 14-56.

Searle, L. J., Méric, G., Porcelli, I., Sheppard, S. K. and Lucchini, S. 2015. Variation in siderophore biosynthetic gene distribution and production across environmental and faecal populations of *Escherichia coli*. PloS one, 10(3): e0117906.

Shah, C., Baral, R., Bartaula, B. and Shrestha, L. B. 2019. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. BMC microbiology, 19(1): 1-6.

Shakti, L. and Veeraraghavan, B. 2015. Advantage and limitations of nitrofurantoin in multi-drug resistant Indian scenario. Indian journal of medical microbiology, 33(4): 477-481.

Sharmin, S., Alamgir, F., Begum, F. and Jaigirdar, M. Q. H. 2010. Use of chromogenic agar media for identification of uropathogen. Bangladesh Journal of Medical Microbiology, 4(1): 18-23.

Shields-Cutler, R. R., Crowley, J. R., Miller, C. D., Stapleton, A. E., Cui, W. and Henderson, J. P. 2016. Human metabolome-derived cofactors are required for the antibacterial activity of siderocalin in urine. Journal of Biological Chemistry, 291(50): 25901-25910.

Skaar, E. P. 2010. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. PLoS Pathog. 6: e1000949.

Skaar, E. P. and Raffatellu, M. 2015. Metals in infectious diseases and nutritional immunity. Metallomics, 7(6): 926-928.

Skockova, A., Cupakova, S., Karpískov, R.and Janstova, B. 2012 Detection of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* from raw cow's milk. J Microbiol Biotechnol, 1:777–784.

Slayton, R. B., Turabelidze, G., Bennett, S. D., Schwensohn, C. A., Yaffee, A. Q., Khan, F. and Gieraltowski, L. B. 2013. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157: H7 associated with romaine lettuce consumption. PLoS One, 8(2): e55300.

Slinger, R., Lau, K., Slinger, M., Moldovan, I. and Chan, F. 2017. Higher atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (a-EPEC) bacterial loads in children with diarrhea are associated with PCR detection of the EHEC factor for adherence 1/lymphocyte inhibitory factor A (efa1/lifa) gene. Annals of clinical microbiology and antimicrobials, 16(1): 1-6.

Soltanloo, H., Khorzoghi, E. G., Ramezanpour, S., Arabi, M. K. and Pahlavani, M. H. 2010. The Expression Profile of'Chi-1, Glu-2, Glu-3 and PR1. 2'Genes in Scab-resistant and Susceptible Wheat Cultivars during Infection by'Fusarium Graminearum'. Plant Omics, 3(5): 162-166.

Soltanloo, H., Khorzoghi, E. G., Ramezanpour, S., Arabi, M. K. and Pahlavani, M. H. 2010. The Expression Profile of'Chi-1, Glu-2, Glu-3 and PR1. 2'Genes in Scab-resistant and Susceptible Wheat Cultivars during Infection by'Fusarium Graminearum'. Plant Omics, 3(5): 162-166.

Soto, S., Smithson, A., Horcajada, J. P., Martinez, J. A., Mensa, J. P. and Vila, J. 2006. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology and infection, 12(10): 1034-1036.

Spurbeck, R. R., Stapleton, A. E., Johnson, J. R., Walk, S. T., Hooton, T. M. and Mobley, H. L. 2011. Fimbrial profiles predict virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strains: contribution of ygi and yad fimbriae. Infection and immunity, 79(12): 4753-4763.

Stapleton, A., Moseley, S. and Stamm, W. E. 1991. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* isolates causing first-episode and recurrent cystitis in women. Journal of Infectious Diseases, 163(4): 773-779.

Swerkersson, S., Jodal, U., Åhrén, C. and Hansson, S. 2014. Urinary tract infection in small outpatient children: the influence of age and gender on resistance to oral antimicrobials. European journal of pediatrics, 173(8): 1075-1081.

Tanimoto, Y., Tamai, S., Matsuzaki, T., Takeuchi, N., Noju, T., Yanagida, S. and Nishikawa, Y. 2018. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from healthy carriers suppress cytokine secretions of epithelial cells stimulated by inflammatory substances. Infection and immunity, 87(1): e00683-18.

Terlizzi, M. E., Gribaudo, G. and Maffei, M. E. 2017. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. Frontiers in microbiology, 8: 1566-9.

Tibo, L. H. S., Bertol, J. W., Bernedo-Navarro, R. A. and Yano, T. 2016. Cytotoxic factor (SPF) secreted by *Escherichia coli* associated with sepsis (SEPEC)

facilitates transcytosis through human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) monolayers.The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 20: 298-302.

Turay, A. A., Eke, S. O., Oleghe, P. O. and Ozekhome, M. C. 2014. The prevalence of urinary tract infections among pregnant women attending antenatal clinic at Ujoelen primary health care centre, Ekpoma, Edo state, Nigeria. International Journal of Basic, Applied and Innovative Research, 3(3): 86-94.

Vagarali, M. A., Karadesai, S. G., Patil, C. S., Metgud, S. C. and Mutnal, M. B. 2008. Haemagglutination and siderophore production as the urovirulence markers of uropathogenic *Escherichia coli*. Indian Journal of Medical Microbiology, 26(1): 68-70.

Vagarali, M. A. 2009. Siderophore production by uropathogenic *Escherichia coli*. Indian Journal of Pathology and Microbiology, 52(1): 126-131.

Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Piot, P., Heuck, C. C., Rohner, P. and Heuck, C. C. 2003. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization.https://apps.who.int/iris/handle/10665/42696. Erişim tarihi: 29 Aralık 2021.

Vasudevan, R. 2015. Emergence of UTI causing Staphylococcus aureus as a superbug: has the pathogen reduced the options of antimicrobial agents for treatment. EC Microbiol, 1: 88-112.

Vidal, R. M., Muhsen, K., Tennant, S. M., Svennerholm, A. M., Sow, S. O., Sur, D. and Levine, M. M. 2019. Colonization factors among enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from children with moderate-to-severe diarrhea and from matched controls in the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). PLoS neglected tropical diseases, 13(1): e0007037.

Waksman, G. and Hultgren, S. J. 2009. Structural biology of the chaperone–usher pathway of pilus biogenesis. Nature Reviews Microbiology, 7(11): 765-774.

Walczuk, U., Sobieszczańska, B., Turniak, M., Rzeszutko, M., Duda-Madej, A. and Iwańczak, B. 2019. The prevalence of mucosa-associated diffusely adherent *Escherichia coli* in children with inflammatory bowel disease. Advances in Clinical and Experimental Medicine, 28(7): 919-925.

Waller, T. A., Pantin, S. A. L., Yenior, A. L. and Pujalte, G. G. 2018. Urinary tract infection antibiotic resistance in the United States. Primary Care: Clinics in Office Practice, 45(3): 455-466.

Wayne, P.A., 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.30th edition. Clinical and laboratory standards institute.https://vchmedical.ajums.ac.ir/_vchmedical/documents/CLSI%202011.pdf. Erişim tarihi: 16 Kasım 2021.

Weigele, P. and Raleigh, E. A. 2016. Biosynthesis and function of modified bases in bacteria and their viruses. Chemical reviews, 116(20): 12655-12687.

Wiles, T. J., Kulesus, R. R. and Mulvey, M. A. 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Experimental and molecular pathology, 85(1): 11-19.

Xu, Y., Bai, X., Zhao, A., Zhang, W., Ba, P., Liu, K. and Xiong, Y. 2016. Genetic diversity of intimin gene of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from human, animals and raw meats in China. PLoS One, 11(3): e0152571.

Zare, F., Mohammadzadeh Rostami, F. and Shahsafi, M. 2018. Prevalence and pattern of antibiotic resistance of gram-negative bacteria isolated from urinary tract infections in patients referring to Neka Laboratories-Iran. International Journal of Biomedicine and Public Health, 1(1): 30-36.

Zhai, J., Yan, Z., Ping, F., Lei, Q., Chen, X. and Qi, Y. 2020. Establishment and application of isothermal amplification techniques for the detection of heat-stable I enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. PloS one, 15(4): e0230881.

Zhao, F., Yang, H., Bi, D., Khaledi, A. and Qiao, M. 2020. A systematic review and meta-analysis of antibiotic resistance patterns, and the correlation between biofilm formation with virulence factors in uropathogenic *E. coli* isolated from urinary tract infections. Microbial pathogenesis, 144:e104196.

Zhu, M., Valdebenito, M., Winkelmann, G. and Hantke, K. 2005. Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. Microbiology, 151(7): 2363-2372.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Raed Amer Ali ALSAHOO

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020-Halen
Lisans	Al-Rasheed Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2013-2018