ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN VİRÜLANS VE ANTİBİYOGRAM PROFİLİ İLE E. COLİ'NİN FİLOGENETİK GRUPLAŞMASININ UYGUNLUĞU

Dhurgham Abdulkadhim RAMADHAN ALFARHAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Dhurgham Abdulkadhim RAMADHAN ALFARHAN tarafından hazırlanan **"Farklı Klinik Örneklerden İzole Edilen Virülans ve Antibiyogram Profili ile E. Coli'nin Filogenetik Gruplaşmasının Uygunluğu"** adlı tez çalışması //2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN

Eş Danışman : Dr. Muslim Dhahr MUSA

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ
Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Gazi Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ebru GÜL
Orman MühendisliğiAnabilim Dalı
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 "**Farklı Klinik Örneklerden İzole Edilen Virülans ve Antibiyogram Profili ile E. Coli'nin Filogenetik Gruplaşmasının Uygunluğu**" 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 (01/03/2022).

Dhurgham Abdulkadhim RAMADHAN ALFARHAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN VİRÜLANS VE ANTİBİYOGRAM PROFİLİ İLE E. COLİ'NİN FİLOGENETİK GRUPLAŞMASININ UYGUNLUĞU

Dhurgham Abdulkadhim RAMADHAN ALFARHAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Eş Danışman: Dr. Muslim Dhahr MUSA

Escherichia coli, filogrup tipi veya biyofilm varlığı ve dolayısıyla patojenite adası gibi patogenez sürecine müdahale eden birçok faktörün bulunduğu, insan dahil olmak üzere hayvanlarda ciddi patojenezlere neden olan gram negatif bir bakteridir. Bakteri, idrar, dışkı ve hastane gibi farklı kaynaklardan alınan örneklerden izole edilmiştir. İzolasyon işlemi, izolatların laboratuarda seçici ve diferansiyel besiyerlerine yerleştirlmeleri ve aşılamada kullandığımız API20 gibi sıradan yöntemlerle yapılmıştır. Moleküler yöntemlerde ise (chuA, yjaA ve tsE4) genlerini bulmak için PCR kullanılmıştır. Bu çalışmada B2 (%70) en yüksek filogenetik gruplandırmayı gösterirken D en düşük (%0) gruplandırma oranına sahip olmuştur. Biyofilmde ise üç kategori ortaya çıkmıştır. Bunlar %50'den fazla olan güçlü, %43,3 orta ve %3,4 zayıf olarak belirlenmiştir. *E. coli'*nin Antibiyogramı incelendiğinde, antibiyotiklere karşı fazla direnç gösterdiği ortaya çıkmıştır. Belirlenen direnç oranları bakterilerin elde edildiği kaynaklara göre farklı değerler almıştır. Bunlar; İdrar izolatlarında %40 iken, dışkı ve hastane izolatlarında sadece %5,7 oranında tespit edilmiştir.

2022, 60 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Escherichia coli*, Biyofilm, Virülans faktörleri, Patojenite adaları

ABSTRACT

Master of Science Thesis

CORRESPONDANCE OF PHYLOGENETIC GROUPING OF E. COLI WITH VIRULENCE AND ANTIBIOGRAM PROFILE ISOLATED FROM DIFFERENT CLINICAL SAMPLES

Dhurgham Abdulkadhim RAMADHAN ALFARHAN

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Melda DÖLARSLAN
Co-Advisor: Dr. Muslim Dhahr MUSA

Escherichia coli is a gram-negative bacterium that causes severe pathogenesis in animals, including humans, with many factors interfering with the pathogenesis process, such as the phylogroup type or the presence of biofilms and thus the pathogenicity island. The bacteria has been isolated from samples taken from different sources such as urine, feces, and hospitals. The isolation process was carried out by placing the isolates in selective and differential media in the laboratory and using ordinary methods such as API20, which we used for inoculation. In molecular methods, PCR was used to find genes (chuA, yjaA and tsE4). In this study, B2 (70%) showed the highest phylogenetic grouping, while D had the lowest (0%) grouping rate. Three categories emerged in biofilm. These were determined as more than 50% strong, 43.3% moderate and 3.4% weak. When the Antibiogram of *E. coli* was examined, it was revealed that it showed high resistance to antibiotics. The determined resistance rates took different values according to the sources from which the bacteria were obtained. These; While it was 40% in urine isolates, it was detected only 5.7% in stool and hospital isolates.

2022, 60 pages

Keywords: *Escherichia coli*, Biofilm, Virulence factors, Pathogenecity islands

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hayatımdaki tüm zorluklara benimle göğüs geren, hayatımın her aşamasında bana destek olan, yakın ilgi ve önerileriyle her aşamada bana rehberlik eden en değerlilerim babam, annem, eşim ve kızım Layan'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımda her türlü yardımdan kaçınmayan, beni her zaman destekleyen, büyük bir anlayış gösteren ve bana yol gösteren değerli hocalarım Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN ve Dr. Muslim Dhahr MUSA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dhurgham Abdulkadhim RAMADHAN ALFARHAN
Çankırı, Mart 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **2**
2.1 Genel Özellikler **2**
2.2Sınıflandırma **2**
2.3 *E. coli* Tarihi ve Uygulamaları **4**
2.4 *E. coli* Epidemiyolojisi **5**
2.4.1 Filogenetik gruplama **5**
2.4.2 Çoklu lokus dizilim tiplemesi (MLST) **6**
2.4.3 Darbeli alan jel elektroforezi (PFGE) **6**
2.5 İnsan Patojeni Olarak *E. coli* **7**
2.5.1 Intestinal enfeksiyon **7**
2.5.2 Extraintestinal enfeksyion (ExPEC) **9**
2.6 Virülans Faktörleri **12**
2.6.1 Yüzey sınırlı virülans faktörleri **12**
2.6.2Salgılanan virülans faktörü **14**
2.7 *E. coli*'nin Antibiyotik DirençMekanizması **17**
2.8 Patojenite Adaları (PAI'lar) **18**
2.8.1 PAI'lerin dağılımı **18**
2.8.2 PAI'lerin tanımlanması **19**
2.9 Biyofilm **19**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **21**
3.1 Materyal **21**

3.1.1 Cihaz ve ekipman **21**
3.1.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler **22**
3.1.3 Kültür ortamı **22**
3.1.4 Kitler **23**
3.2 Yöntem **23**
3.2.1 Çalışma alanı **23**
3.2.2 Örnek toplama **24**
3.2.3 Kültür ortamının hazırlanması **24**
3.2.3.1 Eozin metilen mavisi (EMB) **24**
3.2.4 *E. coli*'nin tanımlanması **26**
3.2.5 Antibiyotik duyarlılık testi **26**
3.2.6 Biyofilm tahlili **28**
3.2.7 Moleküler çalışma **28**
3.2.8 Patojenite adası tespiti **34**
4. BULGULAR **37**
4.1 Geri Kazanım Yüzdesi **37**
4.2 *E. coli* Antibiyogramı **37**
4.3 Çoklu İlaç Dirençli İndeks **38**
4.4 Biyofilm üretimi **39**
4.5 Moleküler Çalışma **39**
4.5.1 Genomik DNA Ekstraksiyonu **39**
4.5.2 *E. coli* türlerinin moleküler tanımlanması **40**
4.6 Filogruplar **41**
4.7 Patojenite Adalarının Moleküler Tespiti **42**
4.8 Patojenite Adalarının Çoklu İlaç Direnç İndeksi ve Biyofilm Üretimi ile Arasındaki Korelasyon **43**
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **45**
KAYNAKLAR **48**
ÖZGEÇMİŞ **60**

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
µM	Mikromolar

KISALTMALAR DİZİNİ

API20	Analitik profil indeksi 20
BBB	Kan beyin bariyeri
BST	Bakteriyel kaynak takibi
CDT	Sitoletal şişen toksin
CNF1	Sitotoksik nekrotizan faktör 1
CNS	Merkezi sinir sistemi
E. coli	*Escherichia coli*
EMB	Eozin metilen mavisi
GIs	Genomik adalar
GIT	Gastrointestinal sistem
HC	Hemorajik kolit
HGT	Yatay gen transferi
HUS	Hemolitik üremik sendrom
LPS	Lipopolisakkarit
LT	Isıya dayanıksız toksin
MLST	Çoklu lokus dizilimi tipleme
NGS	Yeni nesil dizileme
OMPs	Dış zar proteinleri
OP	Optik yoğunluk
PBPs	Penisilin bağlayıcı proteinler
PFGE	Darbeli alan jel elektroforezi
PIs	Patojenite adaları
SPAT	*Enterobacteriaceae* serin proteaz ototransportörü
ST	Isıya dayanıklı toksin
TTP	Trombotik trombositopenik purpura
VFs	Virülans faktörleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *E. coli*'nin sınıflandırılması 3
Şekil 2.2 Biyofilm oluşum aşamaları 20
Şekil 3.1 Filogenetik gruplandırma ağacı 34
Şekil 4.1 *E. coli* izolatlarının Agaroz jel elektroforezi 40
Şekil 4.2 *E. coli* 16S rRNA geninin PCR ürünleri 40
Şekil 4.3 *E. coli'*nin (ChuA, YjaA ve TspE4C2) hedeflenen üç geninin multiplexed-PCR ürünleri 41
Şekil 4.4 A ürününün PCR reaksiyonu (PAI III536, PAI IV536 ve PAI IICFT073) jel elektroforezi 42
Şekil 4.5 B ürününün PCR reaksiyonu (PAI II 536 ve PAI ICFT073) jel elektroforezi 43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Cihaz ve ekipmanlar 21
Çizelge 3.2 Kimyasallar ve biyolojik bileşenler 22
Çizelge 3.3 Kültür ortamları 22
Çizelge 3.4 Bu çalışmada kullanılan kitler 23
Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan Antibiyotikler ve potensleri 23
Çizelge 3.6 16S rRNA primerinin nükleotid dizisi 30
Çizelge 3.7 16S rRNA PCR reaksiyon bileşenleri 31
Çizelge 3.8 16S rRNA gen amplifikasyonu 31
Çizelge 3.9 16S rRNA genlerinin dizilenmesi 32
Çizelge 3.10 Filogenetik gruplamada kullanılan genlerin primer dizileri ve ürün büyüklükleri 33
Çizelge 3.11 Filogenetik gruplamanın PCR reaksiyon bileşenleri 33
Çizelge 3.12 Patojenite adası markörü için primer diziler 35
Çizelge 3.13 Hem A hem de B reaksiyonları için PCR programı 35
Çizelge 3.14 PAI'lerin amplifikasyonu için adımlar ve sıcaklık 36
Çizelge 4.1 Farklı klinik örneklerde (idrar, hastane ve dışkı) E. coli izolasyon oranı 37
Çizelge 4.2 *E. coli* antibiyotik duyarlılık testinin sonuçları 38
Çizelge 4.3 *E. coli*'nin çoklu ilaca karşı direnç indeks değerleri 38
Çizelge 4.4 Biyofilm testinin sonuçları 39
Çizelge 4.5 *E. coli* optik yoğunluğu 39
Çizelge 4.6 *E. coli* filogrubu 41
Çizelge 4.7 Farklı klinik örnekler arasında patojenite adalarının dağılımı 42
Çizelge 4.8 Patojenite adalarının çoklu ilaç direnç indeksi ve biyofilm üretimi ile arasındaki korelasyonu 44

1. GİRİŞ

Escherichia coli gram negatif bakteridir ve insan dahil tüm canlılarda bulunabilir. *E. coli* zararsız halde bulunmasına rağmen, suşları bağırsakta ve bağırsak dışında ciddi hastalıklara neden olabilmektedir. *E. coli*, bulunduğu yere göre intestinal patojenik *E. coli* (InPEC) ve ekstraintestinal patojenik *E. coli* (EXPEC) olarak sınıflandırılabilir. Patojenik *E. coli* bağırsaklarda ishalli hastalıklara neden olurken, ekstraintestinal patojenik *E. coli*, idrar yolu enfeksiyonu (İYE), hemolitik üremik sendrom (HUS), insan sepsis ile ilişkili *E. coli* (SEPEC) ve neonatal menenjitle ilişkili *E. coli* (NMEC) gibi birden fazla hastalığa neden olabilir. *E. coli* filogenetik gruplardan A, B1, B2 ve D'de bulunabilir (Lecointre *et al.* 1998). A ve B1 grupları kommensal gruplardır ve daha çok intestinal *E. coli*'ye, B2 ve D grupları ise ekstraintestinal *E. coli*'ye aittir (Russo and Johnson 2000). *E. coli*, kapsül, flagella toksinleri ve lipopolisakkaritler gibi bazı virülans faktörlere (VF'ler) sahip olabilir. Bu faktörlerde hastalığa neden olma riskini arttırmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında; Thi-Qar hastanelerinde ve özel kliniklerde dolaşan *E. coli'*nin moleküler karakterizasyonu, *E. coli*'ye karşılık gelen filogenetik grupların ve virülans profilinin incelenmesi ve farklı hastanelerde, tıp merkezlerinde ve özel hastanelerde yapılan farklı klinik testlerden izole edilen E. coli suşları arasındaki genetik ilişkinin var olup olmamasının tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

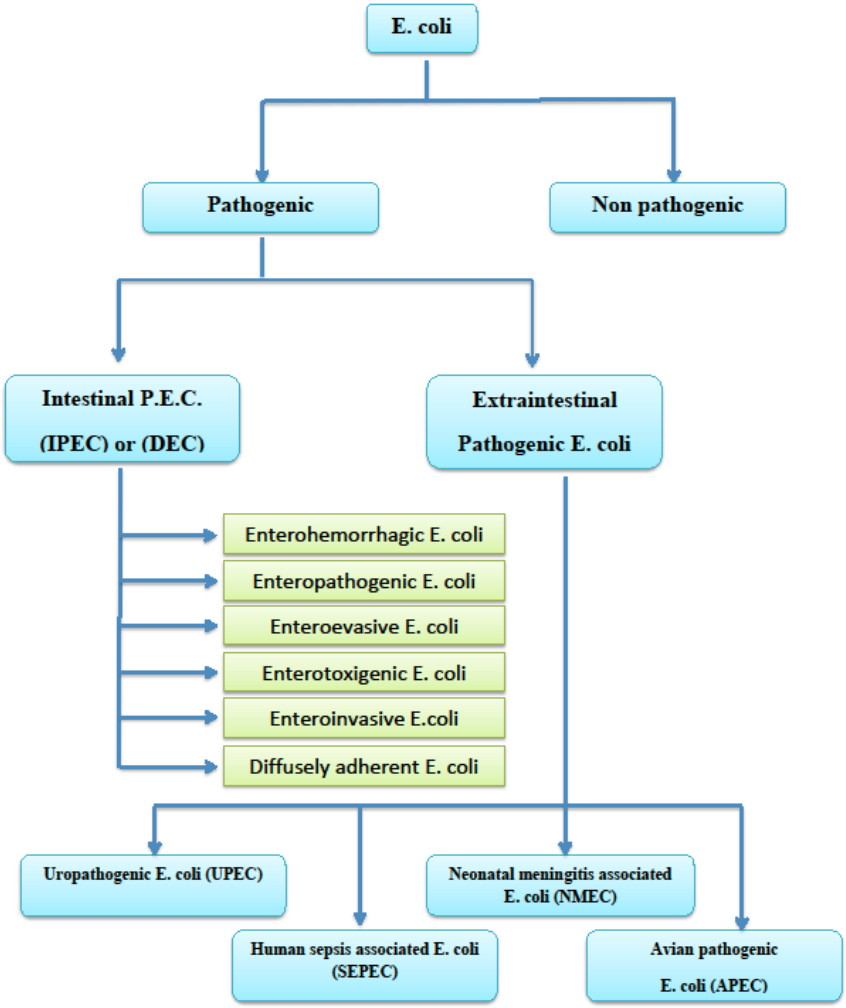
2.1 Genel Özellikler

Escherichia coli, çubuk şeklinde, yaklaşık 1 µm uzunluğunda ve 0,35 µm genişliğinde gram negatif basillerdir. *E. coli, Enterobacteriaceae* familyasına ait fakültatif anaerob, laktoz fermenter ve spor oluşturmayan bakterilerdir (Conway 1995). *Escherichia coli* cinsi geniş bir alana yayılmıştır ve insanlar da dahil olmak üzere çeşitli hayvanların bağırsaklarında bulunabilir. Ancak tüm suşlar zararsız değildir ve bazıları insanlarda, memelilerde ve kuşlarda ciddi ve sıklıkla ölümcül enfeksiyonlara neden olabilir (Wagenlehner *et al.* 2008). Bazı patojenik *E. coli* suşları, hem sağlıklı hem de bağışıklığı baskılanmış kişilerde (Levine 1987), idrar yolu enfeksiyonları (Kashef *et al.* 2010), kan dolaşımı enfeksiyonları (Turner *et al.* 2006), cilt enfeksiyonu ve ishal (Herzer *et al.* 1990) gibi gastrointestinal ve ekstraintestinal hastalıklara neden olabilir. *E. coli* en az yedi filogenetik gruba ayrılmaktadır (Bingen *et al.* 1998). Bunlar: A, B1, B2, C, D, E ve F grupları olarak sıralanmaktadır. Ayrıca, beş *Escherichia* sp. rutin mikrobiyolojik testlerde fenotipik olarak E. coli'den ayırt edilemeyen coli kriptik soyları keşfedilmiştir (Bingen *et al.* 1998). Virülans ve antibiyotik direnci de dahil olmak üzere birçok değişken bir hastalığın şiddetini etkilemektedir. Patojenik *E. coli* türleri bulunmaktadır. Bunlar: enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), diffüz yapışık *E. coli* (DAEC) ve enterohemorajik *E. coli* (EHEC) olarak sıralanmaktadır (Boyd and Hartl 1998). Virülansları ve yaşamı tehdit edici sonuçlarla olan ilişkileri nedeniyle, EHEC suşları en tehlikeli olan gruptur. (Boyd and Hartl 1998, Johnson and Stell 2000). Hemorajik kolit ve diğer ciddi klinik belirtiler (HS) ve hemolitik üremik sendrom (HUS) vb. sorunlar enterohemorajik *E. coli'*den (EHEC) kaynaklanmaktadır (Picard *et al.* 1999).

2.2 Sınıflandırma

Escherichia coli suşlarının gelişimi boyunca farklı virülans genlerini kodlamaktadır. Vücuttaki enfeksiyon bölgelerine ve bunların virülans faktörlerine göre patojenik *E. coli*, diyarejenik *E. coli* (DEC) ve ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) olarak

adlandırılan iki ana gruba ayrılır (Şekil 2.1). Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve diffüz yapışık *E. coli* (DAEC) genellikle ishale neden olan altı patotip olarak bilinmektedir (Gyles 2007). Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) kategorisi; üropatojenik *E. coli* (UPEC), insan sepsis ile ilişkili *E. coli* (SEPEC), neonatal menenjit ile ilişkili *E. coli* (NMEC) ve avian patojenik *E. coli* (APEC)'yi kapsamaktadır (Kaper *et al.* 2004). ExPEC patotipleri, izolasyon kaynağı tarafından belirlenir ve ExPEC patogenezinde bir rolü olduğu bildirilen çeşitli virülans faktörleri (VF'ler) gruplarında bulundurmaktadır (Nataro and Kaper 1998).



Şekil 2.1 *E. coli*'nin sınıflandırılması (Clermont *et al.* 2013)

ExPEC suşları, çeşitlilikleri nedeniyle UTIs, kan dolaşımı enfeksiyonları ve menenjit dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyonlara ve hastalıklara neden olabilmektedir (Leimbach and Hacker 2013). Yayılma hızı ve yaşamı tehdit eden sonuçlar doğurması nedeniyle enterohemorajik *E. coli* (EHEC) suşları en tehlikeli olarak adlandırılabilir (Johnson and Russo 2018, Bien *et al.* 2012). Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC) ve enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enteropatojenik *E. coli* (EaggEC) türleri patojeniteden ve diyarejenik/enterik semptomlardan sorumlu virülans faktörlerini içermektedir. Gastrointestinal sistem *E. coli* ile enfekte olabilmektedir. ExPEC suşları ise sorun yaratmadan bağırsakta yaşama kapasitelerini korurlar, ancak kan, merkezi sinir sistemi ve idrar yolu gibi diğer konak nişlerini kolonize ederek hastalığa neden olabilirler (Ambrosi *et al.* 2019). Bunların yaklaşık %80'i üropatojenik *E. coli'*den etkilenmektedir (Campos *et al.* 2021).

2.3 *E. coli* Tarihi ve Uygulamaları

E. coli, ilk kez 1885 yılında Alman-Avusturyalı doktor Theodor *Escherichia* tarafından sağlıklı insanların dışkısında tanımlanmıştır. E. coli önceleri ortak kolon komünü (Bacterium coli commune) olarak adlandırılmıştır. Prokaryot sınıflandırmalarında, bu bakteriler morfolojilerine bağlı olarak cinslere ayrılmıştır. 1895'te *Bacterium*'u inceledikten sonra, Migula onu *Bacillus coli* olarak sınıflandırdı ve daha sonra, adını koruyarak yeni kurulan *Escherichia* cinsine yerleştirmiştir (Poey *et al.* 2012). Bakteriler, 1996 yılında İskoçya'nın Wishaw kentinde yaklaşık 21 kişiyi öldüren en büyük *E. coli* gıda zehirlenmesi salgınının sebebi olarak ortaya çıkmıştır (Wiles *et al.* 2008). 2011'de bir *E. coli* O104; Almanya'da H4 salgınını ortaya çıkararak 53 kişinin hayatına mal olmuştur (Wurpel *et al.* 2013). *E. coli*'de bulunan çok çeşitli ekspresyon vektörleri, basit protein katlama teknikleri ve biyo-işleme teknolojileri nedeniyle, endüstriyel uygulamalar için özellikle tercih edilmektedir. Biyoteknoloji endüstrisinin ihtiyaçlarını karşılamak için; Heterolog proteinleri glikosile etme ve tam uzunlukta glikosile edilmiş antikorlar da dahil olmak üzere karmaşık proteinler üretme kapasitesi sergilemek için *E. coli*'yi genetik olarak değiştiren yeni tasarlanmış suşları geliştirilmiştir. Sonuç olarak, *E. coli* suşlarından birçok teknik geliştirlmiştir. Ribotipleme, rep-PCR ve antibiyotik direnç profilleri bunlara örnek olarak verilmektedir. Bu geliştirilen tekniklerde; bakteriyel

kaynakları izlemeden (BST) hayvanlarda dışkı kontaminasyonuna kadar birçok yerde faydalanılmaktadır (Farajnia *et al.* 2009).

2.4 *E. coli* Epidemiyolojisi

E. coli (EXPEC), İntestinal *E. coli* (InPEC) ve ekstraintestinal patojenik *E. coli* (EPEC), olarak iki gruba ayrılmıştır. Diyareojenik *E. coli* suşları dünyanın her yerinde bulunur (Levine and Edelman 1984). Su ve yiyeceklerin ağız yoluyla kontaminasyonu veya yiyecek hazırlama sırasında çapraz kontamine olmuş enfekte bir kişiyle doğrudan temas edilmesi halinde çok çabuk bulaşmaktadır. Çoğu *E. coli* suşunun inkübe olması için 10 saat ile 6 gün arasında bir sürenin geçmiş olması gerekir (Byrne *et al.* 2014). *E. coli*, maternal vajinal sistem, yenidoğan enfeksiyonları ve diğer gram-negatif kaynaklı bakterilerin kaynağıdır. Gram-negatif organizmalar, hastanelerde kreş çalışanlarından veya çevresel alanlardan kişiden kişiye transfer yoluyla geçebilmektedir. Enfeksiyonun başlaması doğumdan ile doğumdan sonraki birkaç haftaya kadar değişebildiğinden, bu nedenle kuluçka süresi tahmin edilememektedir. Mısır'da bebeklerde görülen en yaygın ishal vakalarının sebebi olarak tespit edilmiştir. İncelenen vakalarda kadınların erkeklerden daha düşük bir insidansa sahip olduğu bulunmuştur (Rao *et al.* 2003). 1982 ve 2002 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde 8.598 *E. coli* O157 enfeksiyonu ile sonuçlanan 350 salgın belgelenmiştir (Griffin and Tauxe 1991).

2.4.1 Filogenetik gruplama

Escherichia coli dört ana filogenetik gruba (A, B1, B2 ve D) (Herzer *et al.* 1990) ve yedi alt gruba (A, B1, B2, C, D, E ve F) ayrılmaktadır (Clermont *et al.* 2013). A ve B1 grupları kardeş gruplarıdır, B2 grubu ise A ve B1 gruplarının soyundan gelmektedir. Bu filogenetik gruplar; ekolojik nişleri, yaşam öyküleri ve çeşitli şeker kaynaklarını kullanma kapasiteleri gibi belirli özellikleri bakımından farklılık göstermektedir (Müller *et al.* 2009). Öte yandan, ekstraintestinal patojenik suşlar genellikle B2 veya D filogenetik gruplarına aittir ve kommensal bakterilerden daha yüksek virülans faktörlerine sahiptirler (Johnson *et al.* 2006). Extraintestinal patojenik suşlar yaygın olarak B2 ve D gruplarında bulunurken, intestinal patojenik suşlar A ve B1 gruplarında yer almaktadır. Birçok

çalışma, A ve B1 filogrupları birkaç virülans gene ancak daha yüksek direnç modeline sahiptir. B2 ve D filogrupları ise birçok patojenite adası, yapışma faktörleri, biyofilm oluşumu ve yüksek yüzey hidrofobikliği gibi çeşitli virülans faktörlerine de sahiptir (Smith *et al.* 2007).

2.4.2 Çoklu lokus dizilim tiplemesi (MLST)

DNA dizilerine dayalı bakteri tanımlamada yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. Çoklu lokus dizilim tiplemesi (MLST), laboratuvarlar tarafından ve yeni nesil dizilemeden (NGS) elde edilen verileri kullanan klinik teşhisler için giderek daha fazla tercih edilmektedir. MLST sistemi, *E. coli* popülasyonunu kategorize etmek ve analiz etmek için oluşturulmuştur. *E. coli* için iki temel MLST şeması vardır: Altı gen hedefini kullanan Institute Pasteur yöntemi ve Birleşik Krallık'ta yerleşik yedi alternatif gen hedefi kullanan Achtman şemasıdır. Bu yöntem, bakterilerin taksonomik organizasyonunu ve evrimsel gelişimini ortaya koymak için güçlü bir filogenetik metodoloji olarak geliştirilmiştir. Aynı zamanda, Polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı doğrudan nükleotid dizilemesinin çağdaş bir tekniği olarak karşımıza çıkamkatdır (Maiden 2006).

2.4.3 Darbeli alan jel elektroforezi (PFGE)

Darbeli alan jel elektroforezi (PFGE yöntemi), bakteri izolatlarının DNA parmak izini oluşturmak için kullanılır. Bu izolatlar aynı tip bakteriye sahiptir. PFGE, bakteri tiplemesi için mikrobiyolojide yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır (Feiková *et al.* 2007). DNA'daki türler arası, ve genler arası varyasyonun tümü PFGE kullanılarak araştırılmıştır.bu yöntemde, kısıtlama enzimleri, DNA'yı belirli kısıtlama bölgelerinde kırar. Bunun sonucunda kısıtlama bölgelerinin ve polimorfizmlerin sayısına bağlı olarak değişen uzunluklarda DNA bantları oluşmaktadır. Bu bantları ayırmak için alternatif bir elektrik akımının kullanılması ile büyük DNA parçalarının optimum çözünürlüğüne sağlanmış olmaktadır.

2.5 İnsan Patojeni Olarak *E. coli*

Escherichia coli'nin neden olduğu Intestinal ve extraintestinal enfeksiyonların neden olduğu semptomlar erken yaşlarda hayati tehlikelere neden olmaktadır. Virülans ve antibiyotik direnci de dahil olmak üzere birçok değişken bir hastalığın şiddetini etkilemektedir. Hastalar da hemolitik-üremik sendrom (HUS) ve trombositopenik trombotik purpura (TTP) dahil olmak üzere katastrofik bozukluklar gelişebilmekte hatta semptomların aşırı olması durumunda ölümle sonuçlanmaktadır. Virülans faktörlerinin üretimi ve patojenik *E. coli* suşlarının hastalığa neden olduğu süreçlerin keşfi, onları normal floradan ayırarak, patotipler halinde sınıflandırılmalarını sağlamaktadır (Tivendale *et al.* 2010).

2.5.1 Intestinal enfeksiyon

Bağırsak tarafını etkileyen patojenik *E. coli* tipine intestinal patojeni *Escherichia coli* (InPEC) denir. EPEC, EHEC, EIEC, EAEC, DAEC ve ETEC, *E. coli*'nin ishale neden olan altı patotipidir (Fratamico *et al.* 2016). Robinson and McKillip 2010 tarafından; *E. coli* enteropatotiplerinin virülans faktörleri, enfeksiyon mekanizmaları, enterosit ile etkileşimi, doku tropizmi, semptomları ve sendromları sınıflandırılmıştır. İntestinal patojeni *Escherichia coli* (InPEC), bu hastalıkların dünya çapında en yaygın nedenlerinden biridir. InPEC'ler bağırsak hastalıklarının yayılmasında çok önemli bir role sahiptir. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) ve enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), az gelişmiş ülkelerde yaygın bağırsak patojenleridir ve ETEC suşları, bu ülkeleri ziyaret edenler arasında en yaygın diyare nedenidir (Garmendia *et al.* 2005). Öte yandan enterohemorajik *E. coli* (EHEC), dünya genelinde önemli salgınların kaynağıdır ve çoğunlukla sanayileşmiş ülkeleri etkiler ve hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom (HUS) gibi ciddi klinik sekellere neden olmaktadır (Goldwater and Bettelheim 2012). Dizanteri, ateş, baş ağrısı ve kusma, enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) enfeksiyonunun tüm belirtileridir. Belirli bir tedavi veya ilaçlar olmadan hastalık 5 güne kadar devam edebilir, ancak ölümcül vakalar gençlerde daha sık görülmektedir (Radlovic *et al.* 2015). ETEC, kontamine su, gıda ve doğrudan insan teması yoluyla bulaşmaktadır (Berger *et al.* 2010).

2.5.1.1 Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)

ETEC, sulu ishale neden olan bakteri türüdür. Semptomlar kendi kendini sınırlayan ishalden şiddetli ishale kadar değişmektedir. Bakteriler, yoksul bölgelerdeki çocuklarda ve ayrıca gelişmekte olan ülkelere seyahat edenlerde ishal nedenidir (Mainil 2013). Isıya dayanıksız toksin (ST) ve ısıya dayanıklı toksin (HLT), ETEC suşlarında bulunan iki enterotoksin türüdür.

2.5.1.2 Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)

Çeşitli kolonizasyon ve etiyolojik moleküler mekanizmalara sahiptir. ST ve LT olmamasına rağmen, intimin adı verilen bir yapışma yoluyla konakçı bağırsak hücrelerine yapışırlar. Bağırsak mukozasına yapışma, konakçı hücredeki aktilerin yeniden düzenlenmesine neden olarak deformasyona neden olur. EPEC hücreleri biraz invazivdir ve onlarla temas ettiklerinde inflamatuar reaksiyona neden olurlar. EPEC hastalarında en sık görülen ishal nedeni, "bağlanma ve silinme"nin neden olduğu bağırsak hücre yapısındaki değişikliklerdir.

2.5.1.3 Yapışık-invaziv *E. coli* (AIEC)

Crohn hastalığı ile sıklıkla bağlantılı olan yeni rapor edilen bir patotiptir. Şimdiye kadar belirli virülans genleri bulunmadığından, bu patotip sadece fenotipik özelliklerle karakterize edilebilir. AIEC suşlarının bağırsak epitel hücrelerine bağlanma ve sızma yeteneğinin yanı sıra hayatta kalma ve makrofajların içinde çoğalma yetenekleri onları tanımlamak için kullanılmaktadır (Darfeuille-Michaud 2004).

2.5.1.4 Enteroagregatif *E. coli* (EAEC)

Hem yoksul hem de gelişmiş ülkelerde, çocuklarda ve yetişkinlerde ve sanayileşmiş ülkelerde kronik ishalin bir nedeni olarak karşımıza sıklıkla çıkmakta ve dünya çapında bir dizi salgınla ilişkilendirilmektedir (Nataro and Kaper 1998).

2.5.1.5 Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC)

Shigella spp., EIEC suşları ile genetik ve patojenik olarak bağlantılıdır (Vidal *et al.* 2005). EIEC, invaziv inflamatuar kolit ve dizanteriye neden olabilse de, çoğunlukla diğer *E. coli* bakterileri tarafından üretilen ishale benzer sulu diyare üretmektedir (Nataro and Kaper 1998).

2.5.1.6 Enterohemorajik *E. coli* / *Shiga* toksini üreten *E. coli* (STEC)

0157.H7 suşu en çok bilineni olup kanlı ishal, kusma ve varsa düşük ateş üretmektedir. STEC suşlarının hemolitik üremik sendrom (HUS) ve trombotik trombositopenik puerperal gibi yaşamı tehdit eden komplikasyonlara neden olma yetenekleri, onları tanımlamak için kullanılabilir (TTP). STEC enfeksiyonları, çocuklarda ve yaşlılarda yetişkinlere göre daha yaygındır (Timm *et al.* 2007).

2.5.2 Extraintestinal enfeksyion (ExPEC)

ExPEC grubu, üç ana özelliği olan en çeşitli suş gruplarından biri ile temsil edilmektedir. Bunlar: i) herhangi bir hastalığa neden olmadan konakçılarının gastrointestinal kanalında (GIT) kommensaller olarak bulunabilir ii) konakçının (GIT)'sinden kaçtıktan sonra vücudun diğer kısımlarını kolonize ederek enfeksiyona neden olabilir ve iii) virülans faktörleri patojenite adaları (PAI'ler) olarak adlandırılır (Vila 2016). Konak ve NMEC ile ilişkili oldukları hastalığa bağlı olarak, Hemolitik Üremik Sendrom ve Avian Patojenik sendrom meydana getirirler.

2.5.2.1 Hemolitik üremik sendrom (HUS)

İntravasküler hemoliz, trombositopeni ve akut böbrek yetmezliği, bir trombotik mikroanjiyopati (TMA) olan hemolitik üremik sendromu (HUS) tanımlar. HUS ya tipik atipik (kontrolsüz kompleman aktivasyonunun neden olduğu) ya da *Shiga* toksini üreten *Escherichia coli* (STEC) enfeksiyonu tarafından oluşturulan ikincil (başka bir hastalık

tarafından tetiklenen) olarak sınıflandırılır. Klinik pratikte en yaygın TMA'lar şunlardır: *Shiga* toksini üreten *E. coli* enfeksiyonuna (STEC-HUS) bağlı HUS ve trombotik trombositopenik purpura (TTP), ardından atipik HUS (aHUS) ve eşzamanlı hastalığı olan HUS (ikincil HUS olarak adlandırılır) (Mele *et al.* 2014). HUS'un en yaygın nedeni gastrointestinal sistemdeki EHEC enfeksiyonudur. Hemorajik kolit ve kanlı ishalin eşlik edebileceği ishalin başlamasını takip eden 2-12 gün içinde ortaya çıkmaktadır. EHEC ile ilişkili gastroenterit hastalarının yaklaşık %15'i HUS'a doğru ilerlemektedir (Tarr *et al.* 2005). EHEC ile ilişkili HUS'de akut böbrek yetmezliğine neden olan patojenetik süreçler, glomerüllerde tıkayıcı mikrotrombüs üretimine neden olan protrombotik vasküler hasarı ve ayrıca yukarıda açıklandığı gibi akut toksin kaynaklı tübüler hasarı içermektedir (Trachtman *et al.* 2006). Bu durmlarda zehir kendi kendine böbreğe ulaşmaktadır (Burlaka *et al.* 2013).

2.5.2.2 Üropatojenik *E. coli* (UPEC)

UPEC'nin ek virülans faktörleri elde etmek için kromozomal veya plazmit seviyesinde DNA'yı yatay olarak transfer ederek patojenik olmayan suşlardan kaynaklanmaktadır (Johnson *et al.* 2006). İnsanlarda, UPEC bakterileri, idrar yolu enfeksiyonlarından (UTIs) en sık izole edilen bakteridir. İdrar yolu enfeksiyonları oldukça sıktır ve nüfusun kabaca %10'unu etkilemektedir (Farajnia *et al.* 2009). Kadınların yarısı hayatlarının bir bölümünde mutlaka enfeksiyona maruz kalmaktadır. Hem üst hem de alt üriner sistemler enfeksiyona karşı hassastır. Üst idrar yolu enfeksiyonunda piyelonefrit (böbrek), alt idrar yolu enfeksiyonunda sistit (mesane) olarak bilinmektedir (Müller *et al.* 2009). İdrar, üropatojenik *Escherichia coli* suşları tarafından üriner sistemin mikrobiyal kolonizasyonu için birincil araçtır. Bu patojenik suşlar, enfeksiyon sürecinin ilerlemesine yardımcı olan adezinler, toksinler ve sideroforlar gibi virülans faktörleri üretmektedir (Terlizzi *et al.* 2017). Bakterilerin genitoüriner sistemde kolonizasyonu idrar yolu enfeksiyonuna (UTI) neden olmaktadır (Shatalov *et al.* 2015). *Escherichia coli*, hem toplum hem de hastane bağlamında idrar yolu enfeksiyonuna neden olan en yaygın üropatojenik bakteridir (Moroh *et al.* 2014). Yaş, cinsel aktivite, cinsiyet, kontrasepsiyon kullanımı, önceki UTI geçmişi ve temizlik sorunları dahil olmak üzere birçok değişken toplumdaki yüksek UTI sıklığı ile bağlantılı olarak karşımıza çıkan etmenlerdendir

(Kashef *et al.* 2010). Asemptomatik bakteriüri durumu, idrar örneğinin önemli miktarda bakteri içermesi ancak semptom olmaması olarak tanımlanmaktadır (Lane and Takhar 2011). Kadınlarda üretra önemli ölçüde daha kısa ve anüse daha yakın olduğu için, kadınlar erkeklere göre idrar yolu enfeksiyonlarına daha yatkındır (Dielubanza and Schaeffer 2011). Kadınlarda idrar yolu enfeksiyonları (UTIs), kadınları hayatlarının farklı dönemlerinde etkileyen en yaygın hastalıklardan biridir. UTI ile birlikte oluşan birkaç sorun bulunmaktadır. Bunlar; renal bakteriyel enfeksiyonlar, böbrek fonksiyonunu etkileyebilen ve/veya renal tübülde interstisyel nefrite neden olabilen yaygın bulaşıcı bozukluklar olarak sıralanmaktadır. Bakteriler böbreklere kan dolaşımı veya lokal retrograd enfeksiyon yoluyla girebilmektedir. Önemli böbrek yetmezliğine neden olabilirler ve enfeksiyon sonrası glomerülonefritli hastalarda IgA nefropatisi, renal vaskülit ve lupus nefropatisi dahil olmak üzere bir dizi böbrek hastalığıyla bağlantılıdır. UTI'ler üreterler yoluyla mesaneden böbreğe geçerek, onarılamaz böbrek hasarına ve ölüme yol açabilen piyelonefrit üretebilmektedir (Scholes *et al.* 2005).

2.5.2.3 Yenidoğan menenjiti ile ilişkili *E. coli*

Bebekleri etkileyen bir durum olan yenidoğan menenjitine neden olan bir tür *Escherichia coli* vardır. K1 kapsüler antijeni içeren bir *E. coli* serotipi tarafından üretilir. Bakteriyemi, annenin vajinal bölgesinde bulunan bu suşlar yenidoğanın bağırsaklarını kolonize ederek menenjite yol açtığında ortaya çıkmaktadır (Croxen and Finaly 2010). *E. coli* K1'in neden olduğu menenjit, önemli ölüm ve morbidite oranlarına sahip tehlikeli bir enfeksiyon hastalığıdır (Glode *et al.* 1977). *E. coli* K1 menenjitinde ilerleme çok aşamalı ve karmaşık olarak karşımıza çıkmaktadır (Kim 2003). Hastalığın en erken evreleri, mukozada patojen kolonizasyonu ve intravasküler boşluğa mikrobiyal invazyon, ardından intravasküler hayatta kalma ve büyümeyi içermektedir. Yüksek düzeyde bakteriyemi oluşmasının ardından mikroplar kan-beyin bariyerini geçmektedir. Ayrıca merkezi sinir sistemi (CNS) istila edilmektedir (Kim 2001). CNS'nin bakterileri; enfeksiyon, iltihaplanma ve pleositoz, kan-beyin bariyerinin (BBB) bozulması ve nöronal hasar gibi kafa içi problemlere neden olmaktadır (Scheld *et al.* 2002).

2.5.2.4 İnsan sepsisiyle ilişkili *E. coli*

Klinik olarak, *E. coli*'nin neden olduğu neonatal septisemi veya menenjit, diğer ajanların neden olduğu hastalıklardan ayırt edilemez. Septisemi semptomları ateş, ateş tutarsızlığı, nabız hızı anormallikleri, solunum güçlükleri, apne, siyanoz, uyuşukluk, ajitasyon, bilirubin, mide bulantısı olarak sıralanmaktadır.

2.5.2.5 Avian patojenik *E. coli* (APEC)

Avian patojenik *E. coli* suşları, lokal veya sistemik enfeksiyonlar olarak kuşlarda çok çeşitli ekstraintestinal bozukluklara neden olmaktadır. Bunlar kuş kolibasilozu olarak bilinmektedir (Mcdougald *et al.* 2008). Aynı zamanda, insanlardan gelen ExPEC, kuş türlerinde hastalıklara neden olabilmektedir (Skyberg *et al.* 2006).

2.6 Virülans Faktörleri

E. coli virülans faktörleri; hücre yüzeyinde üretilenler ve hücre içinde üretilip daha sonra etki bölgesine göre ihraç edilenler olarak iki kategoriye ayrılmaktadır. Fimbria veya pili, kapsüller, lipopolisakkaritler ve kamçılıların tümü hücre yüzeyinde üretilenlere örnek olarak verilmektedir.

2.6.1 Yüzey sınırlı virülans faktörleri

2.6.1.1 Fimbria

Fimbria'ya, Tip 1 fimbria, P fimbria ve S fimbria örnek olarak verilmektedir. Bu türler, doku invazyonu, biyofilm oluşumu ve sitokin üretimi gibi diğer işlevlerin yanı sıra, konak hücre yüzeylerine yapışmada kilit bir role sahiptir. Bu fimbrialardan ikisi, Tip 1 ve Pare, idrar yolu kolonizasyonunda rol oynayan UPEC'in en belirgin yüzey virülans faktörleridir (Wurpel *et al.* 2013). Bu virülans elementleri ifade edildiğinde, bir kommensal suş, bir üropatojen haline gelmektedir. Enfekte olmayan bir kişinin idrarı,

idrar akışı ve ürik asidin antibakteriyel etkisi nedeniyle sterildir. Düzenli idrar akışı, mikroorganizmaların üriner sistemde kolonize olmasını önlemektedir. *E. coli*'nin üro-epitelyal hücrelere yapışması ise onların idrar akışının etkisinin üstesinden gelmelerini sağlamaktadır (Spencer *et al.* 2014). Bu virülans faktörlerinin UPEC tarafından sentezi, belki de UTI semptomlarına yol açan bir inflamatuar yanıtı tetiklemektedir (Bien *et al.* 2012). Tip 1 fimbriaları kodlayan genler, *E. coli* suşlarının %99'unda bulunabilmektedir (Vigil *et al.* 2011). Tip 1 fimbria, UPEC'de bulunan ve bakterinin üriner sistem boyunca birçok hücre tipine yapışmasını sürdürebilen virülans faktörleridir. P fimbria, offimbria'nın ikinci türüdür ve insanlarda artan UTI'lerin ve piyelonefritin patofizyolojisinde rol oynamaktadır (Plos *et al.* 1995). Mukozal ve doku matriksine yapışmanın yanı sıra sitokin üretiminden sorumludurlar (Godaly *et al.* 2000). P fimbria'nın erken tübüler epitelyal kolonizasyonu teşvik ettiği, Tip 1 fimbria'nın ise interbakteriyel etkileşim ve biyofilm oluşumunu içeren bir süreç yoluyla tübül merkezi kolonizasyonunu kolaylaştırdığı görülmüştür (Rhen *et al.* 1983). Oysa sıklıkla sepsis, menenjit ve artan UTI'lere neden olan *E. coli* suşları ile bağlantılı olan S fimbria, konakçı dokular içinde bakterilerin yayılmasına yardımcı olabilmektedir (Marre *et al.* 1990).

2.6.1.2 Kapsül

Kapsüler polisakkarit, patojenik *E. coli'*nin en önemli VF'sidir. Kapsül, lipopolisakkaritler gibi çoğu yapı için dış koruma oluşturur ve konakçı bağışıklık tepkisi için blok görevi görür (Holst 2009). *E. coli*, K-antijenleri olarak adlandırılan yaklaşık 80 serolojik kapsüler polisakkarite sahiptir (Jann and Jann 1983). Kapsül, konağı fagositik, yutma ve tamamlayıcının neden olduğu bakterisidal etkilerden korumaktadır. K1 ve K5 dahil olmak üzere belirli kapsüler tipler, moleküler olarak doku bileşenlerine benzer ve enfekte olmuş konağın normal bir hümoral bağışıklık tepkisi üretmesini engellemektedir (Johnson 1991). Hücre zarından moleküllerin akışını yönetme kapasiteleri nedeniyle, kapsüllerin *E. coli* bakterilerinde bir antibiyotik direnci kaynağı olduğu düşünülmektedir (Ganal *et al.* 2007).

2.6.1.3 Lipopolisakkarit (LPS)

Şeker kalıntıları ve tekrarlayan alt birimler içindeki bağlantı paternleri nedeniyle suşlar arasında büyük farklılıklar gösteren yüksek oranda korunmuş (lipit A-çekirdeği ve tekrarlayan O-antijen) alt birimlerinden oluşan bir hücre duvarı iç bileşeni olarak tanımlanmaktadır (Sarkar *et al.* 2014). LPS'nin konak yanıtını aktive etme ve nitrik oksit ve sitokinlerin üretimini indükleme yeteneği iyi bilinir (IL-1 ve TNF-) ve bu da inflamatuar yanıtı güçlendirmektedir (Bien *et al.* 2012). Aynı zamanda, somatik antijene karşı spesifik antikorların oluşumunu indükleyerek diğer hastalık antijenlerine karşı bağışıklık tepkisini teşvik eden bir immünolojik adjuvan görevi görmektedirler. Öte yandan, LPS'nin belirli antijenik formları, patojenin normal insan serumunun öldürücü etkisine karşı direncinde rol oynamaktadır (Cirl *et al.* 2008).

2.6.1.4 Kamçı

In vitro ve in vivo, kemotaksis, bakterilerin bir yönde göç etmesine izin vermektedir. Enteropatojenik *E. coli* patogenezi için hücre dışı flagella yoluyla hareket etme yeteneği gereklidir. Enteropatojenik ve enterohemorajik *E. coli* suşları, yapışkan olarak H6 ve H7 alt tiplerinin flagellinlerini kullanarak kolon epitel hücrelerine bağlanabilir (Hall-Stoodley *et al.* 2004). Menenjitle ilişkili *E. coli*, beyin mikrovasküler epitel hücrelerini istila etmek için flagellaya sahip olmalıdır. Bunun nedeni, hareket eden bir organel olan kamçının olmasından kaynaklanmaktadır (Lane *et al.* 2005).

2.6.2 Salgılanan virülans faktörü

2.6.2.1 Toksinler

Birçok tehlikeli kimyasal ve protein *E. coli* tarafından salınır ve UTI 'lerde virülans faktörleri olarak kabul edilmektedir. Öte yandan, konak hücrenin sinyal yolunu değiştirme gücüne sahiptirler. Birçok in vitro ve in vivo araştırmaya göre, üriner sistem

içindeki daha derin dokulara erişime izin vererek, konak hücre ölümünün desteklenmesini ve temel besinlerin salınımını etkilemektedir (Agarwal *et al.* 2012).

2.6.2.1.1 α-Hemolizin

HlyA toksini, Gram-negatif bakterilerde bulunan RTX (toksinde tekrar eder) toksin ailesine ait gözenek oluşturucu bir toksindir (Eberspacher *et al.* 1989). Hemolizin (HlyA), salgılanan en önemli virülans faktörü olan üropatojenik *E. coli* tarafından salınan bir lipoproteindir. HlyA, piyelonefrit dahil üst idrar yolu enfeksiyonlarıyla bağlantılıdır (Johnson 1991). HlyA, eritrositleri ve çekirdekli konakçı hücreleri yüksek dozlarda parçalayabildiğinden, UPEC gibi ekstraintestinal patojenler mukozal bariyerlere daha iyi nüfuz edebilir, efektör immün hücrelerini bozabilir ve konakçı beslenmesine ve demir depolarına daha fazla erişim sağlayabilir (Johnson 1991). HlyA, düşük dozlarda T lenfositlerde, nötrofillerde ve böbrek hücrelerinde apoptozu tetikleyebilir ve ayrıca mesane epitel hücre eksfoliasyonunu teşvik edebilir (Chen *et al.* 2006).

2.6.2.1.2 Sitotoksik nekrotizan faktör 1 (CNF1)

Bu toksin ayrıca idrar yolu enfeksiyonlarında (UTIs) tespit edilir ve zar kıvrımlarının ve aktin stres liflerinin üretimine neden olur (Bower *et al.* 2005). Toksinin, büyük vakuollerin üretimi ve HEp-2 hücrelerinin aktin hücre iskeleti üzerinde önemli bir etkisi vardır (Soltani *et al.* 2018). Bu protein, polimorfonükleer fagositozu baskılar ve çeşitli çalışmalara göre, mesane epitel hücrelerinin apoptotik olarak ölmesine neden olarak, belki de mesane hücresi eksfoliasyonuna ve alttaki dokuya erişimin artmasına neden olmaktadır (Mills *et al.* 2000).

2.6.2.1.3 Salgılanan ototransporter toksin (SAT)

Bu bir serin proteaz ototransportörüdür ve (SPATE) serin proteaz ototransporteri olarak sınıflandırılır ve pilonefretik *E. coli* suşlarına bağlanmıştır (Guyer *et al.* 2002). Bu toksinin sitopatik bir etkisi vardır, konak dokuya zarar verir ve UPEC'in üreme

kapasitesini arttırmaktadır. Bu toksin, proksimal tübül ve glomerulus hasarının bir sonucu olarak piyelonefritik suşların kan dolaşımına girmesine yardımcı olmaktadır (Guyer *et al.* 2002).

2.6.2.1.4 Cytolethal distending toxin (CDT)

Bu toksin, hücrenin DNA'sına zarar vermek için benzersiz bir özelliğe sahiptir (Soltani *et al.* 2018). CDT, hücre döngüsünü durdurma ve UTI'lerin patogenezinde ilerleme yeteneğine sahiptir (Toth *et al.* 2003). Sitoletal genişleyen toksin, CdtA, CdtB ve CdtC dahil olmak üzere üç proteini kodlayan bir operon ürünüdür ve bu proteinler İYE'lerin 12 mikrobiyolojisi için kodlanmıştır. Bu toksinin benzersiz özelliği, DNA'ya saldırarak hedef hücreye zarar vererek hücrenin ölümüne yol açmaktadır (Agarwal *et al.* 2012).

2.6.2.1.5 Isıya dayanıksız (LT) ve ısıya dayanıklı (ST) toksinler

Bu iki tip enterotoksin, enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) tarafından üretilir. Bu toksinlerin yapıları, etki mekanizmaları ve antijeniteleri farklıdır (Acheson 1992). LT'nin iki sınıfı vardır; LT-I ve LT-II olarak sıralanmaktadır. Bu sınıflar çok benzerdir ancak B alt biriminde bazı farklılıkları vardır. Kolera toksinine benzer şekilde LT, bir A alt birimi ve beş B alt biriminden oluşan, B alt birimi bağırsak reseptörüne zor bağlanan ve enzim toksininin aktivitesinden sorumlu A alt biriminden oluşan bir oligomerik proteindir. Konak hücreye bağlandıktan sonra, LT, siklik AMP'nin birikmesine yol açan bir endositik süreç yoluyla hücreye girer, bu kümelenme, kript hücre içinde salgılamayı kolaylaştırır ve villus ucu hücreleri tarafından absorpsiyonu azaltır (Gaastra and Svennerholm 1996). LT'nin aksine ısıya dayanıklı toksin (ST) vardır ve insanlarda hastalıklara neden olan iki tip ST vardır, STh ve STp (133). Olgun toksin, iki molekül içi disülfid bağı oluşturan sistein içerir, bu yapılar memeli peptitlerini, uroguanilin ve guanilini paylaşır. Bu peptitler guanilat siklaz c ile birleşerek hücre içi cGMP ile bir yükselme ile sonuçlanır (Field *et al.* 1978). Bunlar, protein kinazların aktivasyonuna yol açar ve sodyum-hidrojen iyonunun değişimini azaltır (Zachos *et al.* 2005). Tüm bu değişiklikler bağırsakta su ve tuz kayıplarına ve sonuçta ishale yol açmaktadır.

2.6.2.1.6 *Shiga* toksini üreten *E. coli*

Stx ailesi Stx1 ve Stx2 olarak iki gruba ayrılmaktadır (Muthing *et al.* 2009). Stx2, immünolojik reaktiviteleri, biyolojik aktiviteleri ve bağlanma reseptörü bakımından farklıdır. Stx1 ve Stx2 aynı yapısal özelliklere ve enzimatik aktiviteye sahip olmalarına rağmen immünolojik olarak farklıdırlar. İnsanda, Stx2, Stx1'den daha etkilidir ve (HUS) ve hemorajik kolit (HC) ile ilişkilidir (Nishikawa *et al.* 2000). Stx, A alt birimine bağlanan beş B alt biriminden oluşmaktadır (Fraser *et al.* 1994). Stx, sistemik dolaşıma emilerek ve böbreğe girerek epitelin tamamına girmektedir (Tarr *et al.* 2004). Sonuç olarak Stx, protein sentezini engelleyerek hücre apoptozisine neden olmaktadır.

2.7 *E. coli*'nin Antibiyotik DirençMekanizması

Genellikle dört antibiyotik direnç mekanizması kullanan tüm bakteriler ve *E. coli*' de aynı mekanizmayı kullanmıştır. Bu mekanizmalar, ilacın hedefini değiştirmek, ilaç alımını azaltmak, ilacı devre dışı bırakmak ve ilaç geçişini etkinleştirmekten sorumludur (Mehrad *et al.* 2015). Bu mekanizmalar bakteri kromozomu üzerinde bulunabileceği gibi doğal olarak var olabilir veya bakteri plazmitinden kazanılarak gelebilir. *E. coli*, hücre duvarının lipopolisakkaritinden (LPS) bazı moleküllere sağladığı doğal bariyer nedeniyle ilaçlara direnç gösterme avantajına sahiptir. LPS hidrofobiktir ve β-laktamlar gibi küçük hidrofilik ilaçlara erişimi engeller (Delcour 2009). Hidrofilik ilaçlar, dış zar proteinlerinden (OMP'ler) geçerek erişim sağlar. Kloramfenikol florokinolonlar ve tetrasiklin gibi bazı ilaçlar β-laktamlara ek olarak porin kanallarını kullanır. İlaçlara erişimi engellemek için iki mekanizma kullanımı vardır, birincisi gözenekleri düşürmek ve ikincisi porin kanalındaki yükü değiştirmektir (Delcour 2009). *E. coli* dahil gram negatif bakteriler, pincillin bağlayıcı proteinler (PBP'ler) üretme yeteneğine sahiptir ve bunlar β-laktam ilaçlara dirençlidir. Bakteri *E. coli*, β-laktam ilaçları inaktive etmek için β-laktamaz enzimlerini kullanırken, aminoglikozid ilaçlar kimyasal gruplardan birini ilaca aktaran enzimlerle inaktive edilmektedir (Ramirez and Tolmasky 2010).

2.8 Patojenite Adaları (PAI'lar)

(i) PAI'lar, aynı veya yakından ilişkili türlerin patojenik suşların genomlarında bulunan büyük sürekli virülans gen bloklarıdır. Yakın zamanda çok çeşitli bakteriyel patojenlerde keşfedilen PAI'lar, sadece bu türler tarafından kullanılan çeşitli virülans faktörlerini ortaya çıkarmakla kalmamış, aynı zamanda bakteriyel patojenite evrimi hakkında bilinenleri de değiştirmiştir. PAI'lar, *E. coli* genomik adalarıdır (GI'lar). 1980'lerin sonlarında Jörg Hacker ve Werner Goebel'in Würzburg Üniversitesi'ndeki grubu tarafından icat edilmiştir. G + C içeriğine, doğrudan tekrarlara (uçlarında), integral determinantlarına veya diğer mobilite lokuslarına ek olarak PAI'lar, genomun geri kalanından farklı olan büyük genomik bölgelerdir. PAI'lar, zararlı mikroorganizmaların ve hastalıkların gelişimindeki işlevleriyle iyi bilinmektedir. tRNA genlerini çevreleyen büyük DNA parçaları (> 10 kb) PAI'ları oluşturur (Schmidt and Hensel 2004). PAI'lar, çoğu çevreye bağımlı olan çeşitli işlevleri kodlamaktadır. PAI'lardaki genetik havuz çeşitli fonksiyonel gruplara ayrılabilir. Bunlar: S-fimbria, P ile ilişkili pilus, intimin ve Vibrio cholerae toksin çekirdekli pilus (TCP) gibi yapışma faktörleridir. Bu malzemeler, mikropların konakçılara bağlanmasına izin vererek enfeksiyonu kolaylaştırmaktadır.

(ii) Aero baktin ve yersinia baktin gibi sideroforlar, önemli element olan demiri, nötr pH'da veya aerobik koşullar altında hemen hemen hiç çözünmeyen mikrobiyal hücrelere aktarmak için kullanılır. Hemolizin, ökaryotik hücrelerin işlevini parçalayan veya değiştiren ekzotoksinlerdir.

(iii) Bakterilerin ökaryotik hücrelere girişini kolaylaştıran *Salmonella* spp'nin genleri istila genleridir.

(iv) Konak süreçlerini etkilemek için bakteriyel efektör proteinleri konakçı hücrelere taşıyan korunmuş organeller olan Tip III ve IV salgılama sistemleridir.

2.8.1 PAI'lerin dağılımı

PAI'ler, *E. coli, H. pylori, Salmonella, Shigella* ve *Yersinia* spp. *Staphyloccocus aureus*, *Listeria* spp., *Streptococcus* spp., *Clostridium difficile* gibi hem Gram-negatif hem de

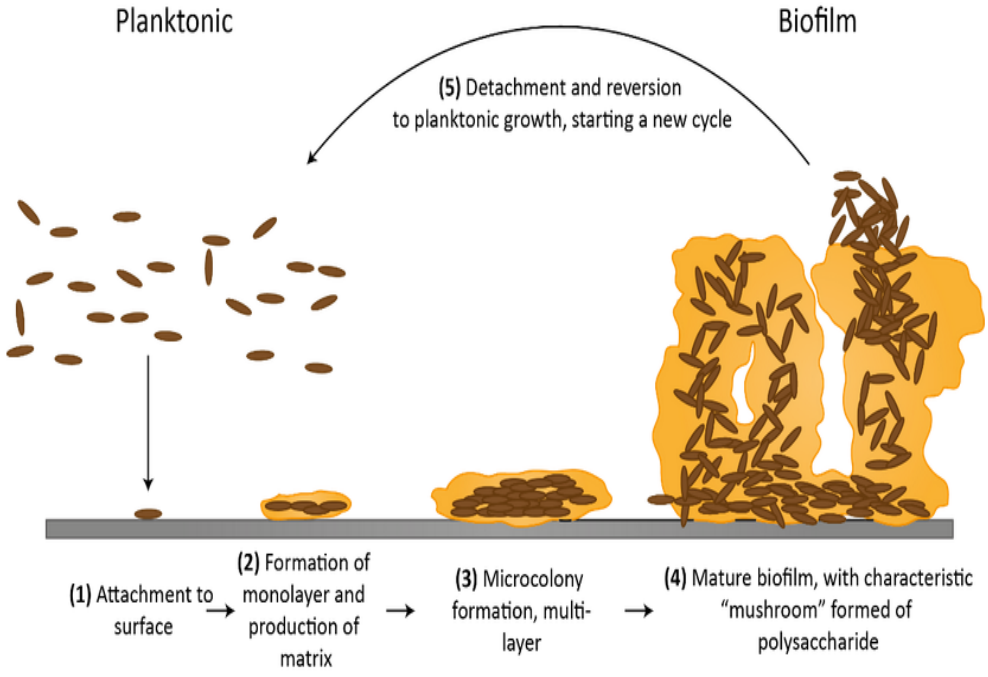
Gram-pozitif patojenlerde bulunmaktadır. *Enterococcus faecalis*, Gram pozitif patojenlerdir (Andersson 2005).

2.8.2 PAI'lerin tanımlanması

Silico'da (olası) PAI'lerin saptanmasına yardımcı olmak için birçok teknik etkilidir. Örneğin, 'IslandPath' gibi programlar, olağandışı dizi kompozisyonu ve yatay gen transferine bağlı genler gibi ada tanıma için PAI'lerin sayısız yönünü içermektedir (Hsiao *et al.* 2003). PAI'ler hem Gram negatif hem de Gram pozitif patojenlerde bulunur. *E. coli* soyları, *H. pylori*, *Salmonella spp., Shigella spp., Yersinia spp., L. pneumophila, Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas syringae* Gram negatif patojenlere örnek olarak verilebilir.

2.9 Biyofilm

Biyofilm, birbirine bağlı ve daha sonra kendi ürettiği bir matris yardımıyla bir yüzeye yapışan bakteri hücrelerinin bir koleksiyonudur. Hem canlı hem de cansız yüzeyler biyofilm üretebilir (Lear and Lewis 2012). Doğada, biyofilmler en sık görülen bakteri varlığı türüdür (Zhurina *et al.* 2014). Biyofilmler epitel tabakaları ve kateter yüzeyleri dahil olmak üzere çeşitli arayüzlerde oluşur ve biyofilmlerde keşfedilen bakteriler birçok kalıcı hastalıktan sorumludur (Hall-Stoodley *et al.* 2004). Biyofilm gelişimi hastalık tedavisinde çok önemlidir çünkü biyofilm içindeki hücreler çeşitli antimikrobiyal ajanlara dirençlidir (Hall and Mah 2017). Bakteriyel biyofilmler çok hücreli kümelerdir. *E. coli*'deki bu matris, adezinler gibi proteinli bileşenler ve curli gibi amiloidler ile ekzopolisakkaritler selüloz ve kolanik asit ile iç içe geçebilen liflerden oluşur (Flemming *et al.* 2010). Şekil 2.2'de görüldüğü üzere bir biyofilmin oluşturulmasında dört temel adım vardır: i) Eski yapışma (bağlanma) (tersinir); ii) Biyofilm yapısının gelişimi (tersinmez); iii) Üretilen bir biyofilmin olgunlaşması; iv) Planktonik duruma dönmek için biyofilmden hücre dağılımı.



Şekil 2.2 Biyofilm oluşum aşamaları (Vasudevan 2014)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Cihaz ve ekipman

Bu araştırmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Cihaz ve ekipmanlar

Cihaz	**Firma / Menşe**
Eldivenler	Irak
Düz borular	Ürdün
Cam Vidalı kapaklı tüpler	Çin
Slayt ve kapak slaydı	Çin
Petri kapları	Lübnan
Mikrotitre plakası	Çin
Şırınga 5ml, 3ml	Irak
Forseps	Çin
kablo bağlantısı	Çin
Otoklav	Fisher / Japonya
Santrifüj	Almanya
Elektrik dengesi	Precisa / İsviçre
Elisa okuyucu HS	Almanya
Elektroforez sistemi	Cleaver / Birleşik Krallık
kuluçka makinesi	Nave / Türkye
Işık mikroskobu	Olympus / Japan
Mikrofüj IB Santrifüj	Beckman Coulter/ Almanya
Mikropipet 0,5 /10 /100 /1000 ml	Dragon-med / İspanya
Fırın	Memmert / Almanya
Buzdolabı	Beko / Birleşik Krallık
UV Transillüminatör dokümantasyon sistemi	Ultraviolet products institute /ABD
Su Damıtıcı	Almanya
Su banyosu	ABD
Optimus 96G termal Döngüleyici	QLS/ Birleşik Krallık
Kuru mikrotüpler inkübatör	Ae / Birleşik Krallık
Çekirdek PFB dengesi	Kern & Sohn / Almanya
UVP	Analytica Jena /Birleşik Kırallık

3.1.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler

Bu araştırmada kullanılan kimyasal ve biyolojik bileşenler Çizelge 3.2'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Kimyasallar ve biyolojik bileşenler

Kimyasal	**Firma / Menşe**
Gliserol	GCC / İngiltere
Normal Tuzlu (Steril)	S.D.I / Irak
Etil Alkol (Etanol)	GCC / İngiltere
2000bp (50bp/ grup) DNA Merdiveni	Intron/Kore
Agaroz	Intron/Kore
AccuPower® PCR Ön Karışımı	Intron/Kore
Deiyonize steril Damıtılmış su	Intron/Kore
Redsafe nükleik asit boyama solüsyonu	Intron/Kore
Nükleazsız Su	Intron/Kore
Safe-Green 100bp Opti-DNA İşaretleyici	abm/Kanada
GoTaq® G2 Green Master Miks	Promega/ ABD
10X TAE (Tris Acetate EDTA) tampon	Promega/ABD
Primerler	Macrogen/Kore

3.1.3 Kültür ortamı

Kültür ortamı Çizelge 3.3'te sunulmaktadır.

Çizelge 3.3 Kültür ortamları

Kültür Ortamı	**Firma / Menşe**
Beyin-Kalp İnfüzyon suyu	Hi-media / Hindistan
Eozin Metilen Mavisi agar	Hi-media / Hindistan
MacConkey agar	Hi-media / Hindistan
Muller Hinton agar	Hi-media / Hindistan
Nutrient agar	Oxoid / İngiltere
Nutrient broth	Oxoid / İngiltere
Kanlı agar	Hi-media / Hindistan

3.1.4 Kitler

Bu araştırmada kullanılan kitler Çizelge 3.4'te listelenmiştir. Antibiyotikler ve potensleri ise Çizelge 3.5'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan Kitler

NO.	KIT	Firma / Menşe
1	Gram boyama	ABD
2	EPI 20 kit	Almanya
3	DNA Ekstraksiyonu	Geneaid/ Tayland
4	DNA İzolasyon Kiti (Bakteri)	Geneaid/ Tayland
5	Presto™ Mini gDNA Bakteri Kiti	Geneaid/Çin

Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan Antibiyotikler ve potensleri

No.	Antibiyotik Diskler	Disk potensi(µg)	Firma/ Ülke
1	Ampisilin (AMP)	10	Mast diagnostic/ UK
2	Piperasilin (PIP)	30	Mast diagnostic/ UK
3	Amoksisilin (AMC)	30	Mast diagnostic/ UK
4	Seftriakson (CI)	30	Mast diagnostic/ UK
5	Amikasin (AK)	30	Mast diagnostic/ UK
6	Gentamisin (GN)	10	Mast diagnostic/ UK
7	Siprofloksasin (CIP)	5	Mast diagnostic/ UK
8	Levofloksasin (LEV)	5	Mast diagnostic/ UK
9	Trimetoprim/Sülfametoksazol (SXT)	30	Mast diagnostic/ UK
10	Tetrasiklin (TC)	5	Mast diagnostic/ UK

3.2 Yöntem

3.2.1 Çalışma alanı

Thi-Qar ili, Irak'ın güneyinde, Basra vilayetinin 180 km kuzeyinde yer almaktadır. Coğrafi koordinatları 31º 27' 52 kuzey enlemleri ile ,45º 6' 9 doğu boylamları arasında

değişmektedir. Irak'ta dördüncü olan bu şehrin nüfusu 2.040.126'dır. Thi-Qar ilinin Nassiriyah, Suq Al-Shuyukh, Chibayish, Shatrah ve Rafei beş idari bölgesi bulunmaktadır.

3.2.2 Örnek toplama

Şubat 2021'den Temmuz 2021'e kadar 130 klinik örnek toplanmıştır. Klinik örnekler, Thi-Qar ilindeki Al-Hussein eğitim hastanesi, Kalp merkezinin farklı bölgelerinden 50 (%38,5) orta akış idrarı ve 30 (%23) sürüntü ve 50 (%38,5) sağlıklı insan dışkısını içermektedir. Tüm numuneler buzla soğutulmuş kaplarda iki saat içinde laboratuvara taşınmıştır.

3.2.3 Kültür ortamının hazırlanması

3.2.3.1 Eozin metilen mavisi (EMB)

EMB agar, hem diferansiyel hem de seçici kültür ortamı olarak kullanılmıştır. Laktoz, fermente ve laktozu fermente etmeyen kolonileri ayırt etmektedir. Laktozu fermente eden organizmalar (örn., *E. coli*) ile fermente etmeyenler (örn., *Salmonella, Shigella*) arasında ayrım yapmak için bir renk göstergesi kullanılmaktadır. *E. coli* aktif fermenter olarak genellikle yeşil bir metalik parlaklık üretmektedir. 1000 mL DW içine 36 gr toz süspanse edilerek ortam tamamen eriyene kadar kaynatılmıştır. Elde edilen ortam 15 lbs basınçta (121 Cº) otoklavla 15 dakika sterilize edilmiştir. Daha sonra besiyeri 45 – 50 Cº'ye soğutularak temiz petri kaplarına aktarılmıştır. Kontaminasyon olmadığından emin olmak için 24 saat inkübe edilmiştir. Bu işlemden sonra EMB kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.2.3.2 MacConkey agar

50 gr MacConkey agar tozu, 1 L DW'ye ilave edilerek, toz tamamen eriyene kadar ısıtılır. Daha sonra besiyeri, 121 ºC'de 15 dakika otoklavlanarak, 45 – 50 C'ye soğutulmuştur.

Elde edilen besiyerini temiz ve steril petri kaplarına dökülerek katılaşana kadar bırakılmıştır. Kullanım tarihine kadar 2–8 ºC'de ters olarak saklanmıştır.

3.2.3.3 Besin suyu

28 gr toz 1 L DW içinde çözülmüştür. Süspansiyon, ortamı tamamen çözmek için kaynama derecesine ulaşana kadar hot plate ile ısıtılmıştır. Daha sonra süspansiyon ısıya dayanıklı tüplere (her biri 5 mL) dökülmüştür. Ardından tüpler ortamla birlikte 121 Cº'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklavlama işlemi tamamlandıktan sonra tüpler ortamla birlikte alınarak oda sıcaklığına gelene kadar soğutulmuştur. Daha sonra tüpler ileride kullanılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

3.2.3.4 Muller-Hinton agar

38 gr toz 1 L DW süspansiyonu hot plate ile kaynama derecesine gelinceye kadar ısıtılmıştır ve tozun tamamen çözülmesi için 121 ºC'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Elde edilen ortam 45-50 ºC'ye soğutularak, süspansiyon steril ve temiz petri kaplarına dökülmüştür. Besiyeri katılaşana kadar bekletilerek kullanım tarihine kadar ters konumda saklanmıştır.

3.2.3.5 Kan Agar

40 g hazırlanmış ortam 1 L DW'ye eklenerek, süspansiyon ısıtılmıştır. Toz tamamen eridikten sonra sterilizasyon için 121 ºC'de 15 dakika otoklavlanmıştır. 15 dakika sonra ortam yaklaşık 45-50 ºC'ye soğumaya bırakılarak ortama %5 v/v steril defibrine kan eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Ortam steril koşullarda petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır ve kullanılacağı tarihe kadar buzdolabına ters çevrilmiş şekilde saklanmıştır.

3.2.3.6 McFarland standartlarının hazırlanması

Bir sıvı süspansiyondaki bakteri miktarı, test süspansiyonunun bulanıklığı McFarland Standardı ile karşılaştırılarak ölçülebilir. Bir McFarland Standardı, 0,5 mL %1 baryum klorür ve 9,5 mL %1 sülfürik asit (H_2SO_4) içeren kimyasal bir çözeltidir. Bu reaksiyon, 1,5 108 CFU/mL'lik bir spesifik optik yoğunluğa sahip bir baryum sülfat çözeltisi sağlamaktadır.

3.2.4 *E. coli'*nin tanımlanması

E. coli, agar (diferansiyel ortam) üzerinde metalik parlak koloniler üretmektedir. Kanlı agar üzerinde ise düz, yuvarlak ve opak koloniler üretir. MacConkey agar (seçici besiyeri) üzerinde pembe koloniler ve fermente laktoz ürettiği tespit edilmiştir.

3.2.4.1 API 20

Saf kültürden tek bir koloni alınarak ve DW'de süspanse edilmiştir. Süspansiyonun bakteri yoğunluğu McFarland 0,5'e (1x108) ile tespit edilmiştir. Kurutulmuş bakteri ortamı (20 bölmeli reaktif) içeren EPI 20E şeridi alınarak, Pasteur pipeti ile bu bölmeler bakteri süspansiyonu ile ağzına kadar doldurulmuştur. LDC, ADH, H_2S ve URE bölmelerine steril yağ konulmuştur. API 20E şeridi içinde bir miktar su bulunan bir tepsiye konularak kapatılmıştır. Bu tepsiye hastanın kimlik numarası, tarih ve adının baş harfleri yazılmıştır. Tepsi 37 ºC'de 2 saat kuluçkaya yatırılmıştır. Sonuçra bakteriler şeritler ile reaksiyona girerek, farklı renkler vermiştir. Bu renkler sayesinde bakteri türlerinin seviyesi belirlenmektedir.

3.2.5 Antibiyotik duyarlılık testi

Wayne vd. (2002)'ye göre, Kirby-Bauer tekniği şu şekilde kullanılmıştır:

3.2.5.1 İnokulumların hazırlanması

İyi izole edilmiş kolonilerde (24 saat) doğrudan koloni süspansiyon yöntemi kullanılmıştır. Daha sonra, 5 mL normal salin içinde süspanse edilmiştir.

3.2.5.2 Mueller-Hinton agar üzerinde bakteri süspansiyonunun aşılanması

Steril bir pamuklu çubuk bakteriyel süspansiyona daldırılarak fazla süspansiyon tüp duvarının kenarına doğru itilmiştir. Tüpteki süspansiyon seviyesinin üst kısmına çubuk bastırılıp döndürülerek aşılama yapılmıştır. Çubuk daha sonra birkaç kez kurutulmuştur. Çubuk, Mueller -Hinton plakasına sürülmüş ve plak beş dakika bekletildikten sonra besiyerinin (beş veya altı disk/plak) yüzeyine steril forseps ile antibiyotik diskleri yerleştrilmiştir. Daha sonra bu plaklar 37 ºC'de 24 saat inkübe edilmştir.

3.2.5.3 Gözlem

Tüm inhibisyon bölgesinin çapları incelenerek inkübasyondan sonra milimetre cinsinden ölçüm yapılmıştır. Her bir antimikrobiyal ajan için inhibisyon bölgesinin çapı standart inhibisyon bölgesiyle karşılaştırılmıştır. Buna göre inhibisyon bölgesinin çapı; hassas, orta ve dirençli olarak sınıflandırılmıştır.

3.2.5.4 Çoklu ilaç direnç indeksi

E. coli izolatlarının, Krumperman (1983) tarafından açıklanan formüle göre çoklu Antibiyotik direncini ifade etme yetenekleri araştırılmıştır. Buna göre, direnç indeksi 0,2'den yüksek olan izolatlar, orijinlerinde yüksek oranda antibiyotiklere maruz kaldıklarını yansıtacak şekilde çoklu ilaç direnci olarak kabul edilirken, indeksi 0,2'ye eşit veya daha düşük olanların risk taşımadığı ve orijinlerinde antibiyotikleri nadiren veya hiç kullanmadığı kabul edilmiştir. Denklem (3.1) çoklu ilaç direnci indeksinin formülünü göstermektedir. Burada A, izolatın dirençli olduğu antibiyotik sayısını gösterirken B, izolatların maruz kaldığı toplam antibiyotik sayısıdır.

$$\mathbf{MDR} = \frac{\boldsymbol{A}}{\boldsymbol{B}} \quad (3.1)$$

3.2.6 Biyofilm tahlili

Mikrotiter plaka yöntemi, biyofilmi tanımlamak için kullanılan kantitatif bir testtir. Bu yöntemde, 1000 mL DW'de 37 gm toz çözülmüş hale getirilmiştir. Hazırlanan çözelti 37 ºC'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonra besiyerinde kontaminasyon olup olmadığını kontrol edilerek izolatların et suyu içinde 24 saat daha inoküle edilmesi sağlanmıştır. Negatif kontrol grubundaki kuyucuklar basitçe steril et suyu ile doldurulmuştur. 37°C'de 24 saatlik bir inkübasyon periyodundan sonra, her bir kuyunun içeriğini çıkarmak için plakalara hafifçe vurulmuştur. Serbest yüzen mikroorganizmaları ortadan kaldırmak için kuyucuklar bir kez steril distile su ile temizlenmiştir. Kuyulara yapışan bakteriler tarafından oluşturulan biyofilmi boyamak için kristal viyole (%0,1) w/v kullanılmıştır. Damıtılmış su ile fazla leke çıkarılarak plaka kuruması için bir kenara bırakılmıştır. 630 nm'de lekeli yapışkan biyofilmin optik yoğunluğunu (OD) ölçmek için bir Micro ELISA otomatik okuyucu (model 680, Biorad, UK) kullanılmıştır. Deney toplamda üç kez tekrarlanmıştır. *E. coli* izolatları, biyofilm oluşturma yetenekleri açısından test edilmiştir. Buna göre; OD'nin 0,12, eşit olması zayıf veya var olmayan bir biyofilm üreticisini belirtir, OD< 0,12 olması orta düzeyde biyofilm üreticisini ve OD >0,12 olması güçlü bir biyofilmüreticisi olduğunu belirtmektedir.

3.2.7 Moleküler çalışma

3.2.7.1 DNA ekstraksiyonu

Presto Mini gDNA Bacteria Kit kullanılarak gram negatif bakterilerde DNA'yı çıkarmak için aşağıdaki aşamalar dikkate alınmıştır;

1. Numunelerin hazırlanması
2. 1 x 109 bakteri hücresinin 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır
3. 14 - 16.000 x g'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant çıkarılmıştır

4. Bir pipet veya bir vortex kullanarak hücre peleti 180 l GT tampon içinde yeniden süspanse edilmiştir
5. 20 L Proteinaz K eklenmiştir (ddH_2O eklendiğinden emin olunmuştur).
6. 60 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir
7. 200 L GB Tamponu 10 saniye boyunca numuneye vortekslenmiştir
8. Numune lizatının berrak olduğunu garanti etmek için 70°C'de en az 10 dakika inkübe edilmiştir
9. Bu sırada gerekli Elüsyon Tamponu (örnek başına 200 l) 70°C'ye kadar ısıtılmıştır
10. Numune lizatına 200 L %100 etanol eklenmiş ve kuvvetlice karıştırılmıştır
11. 2 mL toplama tüpüne bir GD Sütunu yerleştirilmiştir. GD Sütunu karışımla (çözünmeyen çökeltiler dahil) yarısına kadar doldurulmuş ve 14-16.000 x g'de 2 dakika santrifüjlenmiştir
12. 2 mL toplama tüpünden çökelti çıkarılmış ve GD Sütunu içeren yeni bir 2 mL toplama tüpü yerleştrilmiştir
13. Temizleme işlemi yapılmıştır
14. GD Sütunu 400L W1 Tamponu ile doldurulmuş ve 14-16.000 x g'de 30 saniye santrifüjlenerek ardından akış kısmı atılmıştır
15. GD Sütunu 2 mL toplama tüpüne yeniden yerleştirilmiştir
16. GD Sütunu 600 L yıkama tamponu ile doldurulmuştur (etanolün mevcut olduğundan control edilmiştir) ve14-16.000 x g'de 30 saniye santrifüjlenerek ardından akışı atılmıştır
17. GD Sütunu 2 mL toplama tüpüne yeniden yerleştirilmiştir
18. Kolon matrisi 3 dakika boyunca 14-16.000 x g'de santrifüjlenerek kurutulmuştur
19. 1,5 mL'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpünü kurumuş GD Sütunu ile yarıya kadar doldurulmuştur
20. Sütun matrisinin merkezi 100 L önceden ısıtılmış Elüsyon Tamponu1, TE Tamponu2 veya su3 ile doldurulmuştur
21. Elüsyon Tamponu, TE Tamponu veya suyun iyice ıslanması için en az 3 dakika beklenmiştir
22. 30 saniye boyunca 14-16.000 x g'de santrifüjlenerek saflaştırılmış DNA'yı ayrıştırılmıştır

3.2.7.2. DNA miktarı ve saflığının ölçülmesi

Nanodrop (NAS- 99) cihazı ile aşağıdaki gibi ölçülmüştür,

1- Alt ölçü kaidesi distile su ile ıslatılmış yumuşak doku ile silinmiştir

2- Alt kaideye 2 µL distile su ve ardından üst kaide yüklenmiş ve ana yazılım ekranında görünen (OK) butonuna tıklanarak çalışmaya başlanmıştır

3- Elüsyon tamponu alt kaideye yüklenerek üst kaide alt konuma getirilmiş ve yazılım ekranında (BOŞ) butonuna basılmıştır

4- Körleme yapılarak ölçü tabanı aktif hale gelerek aynı anda alt kaideye 1 µL DNA yüklenmiş ve (ÖLÇ) butonuna basılmıştır. Sonuç, 10 saniye içerisinde ölçülerek DNA miktarı ng/µL olarak ortaya çıkmıştır.

3.2.7.3 *E. coli* türlerinin teyidi için PCR reaksiyonu

E. coli'yi tür düzeyinde tanımlamak için 16sRNA geni, önceki çalışmada belirtilen primerler kullanılarak tespit edilmiştir (Prosdocimi *et al.* 2013). Stok primerleri, bir çalışmada kullanılmak üzere 10 µM/µL'lik bir konsantrasyon haline getirilmiştir.16s rRNA primerinin nükleotid dizisi, erime sıcaklığı ve nihai ürünün boyutu Çizelge 3.6'da listelenmiştir.

Çizelge 3.6, 16s rRNA primerinin nükleotid dizisi

Hedef Gen		**Dizi (5'-3')**	**Sıcaklık (°C)**	**Ürün boyutu**
16S Rrna	**F**	5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3'	**56**	**812 bp**
	R	5'- CATTGTAGCACGTGTGTC-3'		

3.2.7.4 Reaksiyon bileşeni

16S rRNA tespiti için PCR reaksiyon karışımı bileşenleri Çizelge 3.7'de listelenmiştir.

Çizelge 3.7 16S rRNA'nın PCR reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Konsantrasyon	Hacim
2X PCR Taq master mix	1X	25µ
F primer	10 µm/mL	4µ
R primer	10µ / mL	4µ
DW		17

3.2.7.5 PCR durumları

Çizelge 3.8 16S rRNA gen amplifikasyonunun reaksiyon koşullarını göstermektedir.

Çizelge 3.8 16S rRNA'nın gen amplifikasyonu

Faz	**Sıcaklık** (°C)	**Zaman**	**Döngü**
İlk denatürasyon	94°C	5 min	1X
Denatürasyon	94°C	30 sec.	35X
Tavlama	56°C	30 sec.	
Uzantı	72°C	1 min	
Son uzatma	72°C	5 min	1X

3.2.7.6 16S rRNA geninin ürün analizi ve dizilenmesi

10 uL ürün, 2 uL yükleme boyası ile boyanarak iyi hazırlanmış %1,5 agaroz jel üzerine yüklenmiştir. Birinci kuyucukta işaretleyici olarak 2kbp DNA dizilimi kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforezi, 100 V'a ayarlanmış elektroforez cihazında 1 saat süreyle aktif hale getirilmiştir. Amplifiye edilmiş ürünün görselleştirilmesi U. V. Transilluminator tarafından gerçekleştirilmiştir. Amplifiye edilen ürünün boyutu, dizilim işaretçisine göre belirlenerek dijital kamera ile görüntülenmiştir. 16S RNA-23S RNA'nın (ISR) ileri primerine sahip 10 temsili numunenin PCR ürün tüpleri, DNA dizilemesi için Güney Kore'ye (Bioneer tarafından) gönderilmiştir. PLAST programına dayalı bu *E. coli* türleri Çizelge 3.9'da sunulmuştur.

Çizelge 3.9 16S rRNA genlerinin dizilenmesi

No		Dizi ID	Kimlik	Zincir	Kaynak	Ülke
1	*Escherichia coli* suşu ECNB21-M121 kromozomu, tam genom	CP083585,1	264/264	Plus/Plus	Et	Çin
2	*Escherichia coli* suşu RP437 kromozomu, tam genom	CP083410,1	294/294	Plus/Plus	laboratuvar suşu	Avustralya
3	*Escherichia coli* suşu SPCR2020 kromozomu, tam genom	CP083419,1	293/293	Plus/Minus	rektal sürüntü	Kanada
4	*Escherichia coli* O78 suşu 3 kromozomu, tam genom	CP084096,1	296/296	Plus/Plus	Balgam	Çin
5						
6	*Escherichia coli* suşu ATCC 25922 16S ribozomal RNA geni, kısmi dizi	DQ360844,1	255/262	Plus/Minus	NA	Çin
7	*Escherichia sp.* soy BL-Q-2 16S ribozomal RNA geni, kısmi dizi	OK147992,1	287/288	Plus/Minus	İnsan dışkısı	Güney Kore
	Escherichia coli suşu SYNB1934 kromozomu, tam genom	CP080246,1	233/236	Plus/Minus		
8						
9	*Escherichia coli* suşu 035053C1pKPC2_Vir_090515B1 kromozomu, tam genom	CP084026,1	289/289	Plus/Minus		Çin
10	*Escherichia coli* suşu 106k88 16S ribozomal RNA geni, kısmi dizi	MK615932,1	277/283 (98%)	Plus/Minus	Dışkı	Çin

3.2.7.7 Filogenetik gruplama

Tripleks PCR, Clermont vd. (2000) tarafından önerildiği gibi Çizelge 3.10'da listelenen primerler olan üç geni (ChuA, jiA ve TspE4C2) hedefleyerek *E. coli* filogenetik gruplamasını araştırmak için kullanılmıştır

Çizelge 3.10 Filogenetik gruplamada kullanılan genlerin primer dizileri ve ürün büyüklükleri

Gen	**Primer Adı**	**5'-3'**	**Ürün**	**Kaynak**
ChuA	ChuA-F	GACGAACCA ACGGTCAGGAT	279	Clermont *et al.* (2000)
	ChuA-R	TGCCGCCAGTACC AAAGACA		
YjaA	YjaA-F	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211	Clermont *et al.* (2000)
	YjaA-R	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
TspE4C2	TspE-F	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	Clermont *et al.* (2000)
	TspE-R	CGCGCCAACAAAGTATTACG		

3.2.7.8 Reaksiyon bileşeni

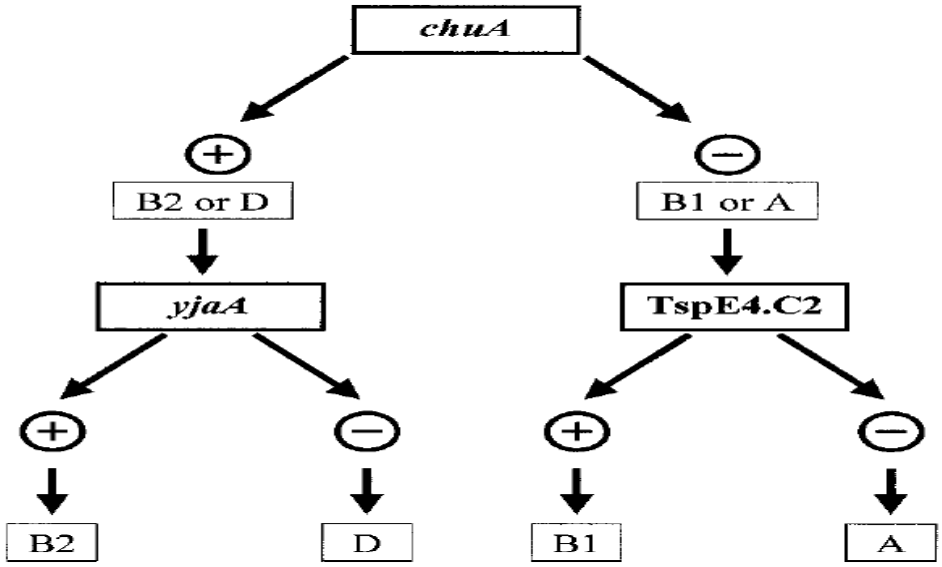
Filogenetik gruplamanın PCR'si için reaksiyon bileşeni Çizelge 3.11'de listelenmiştir.

Çizelge 3.11 Filogenetik gruplamanın reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Konsantrasyon	Hacim
Master mix	1 X	5 X
F primer	0,5/µL	1 µL
R primer	0,5/µL	1 µL
Template DNA	5 µL	5 µL
DW	42	38

3.2.7.9 Filogruplamanın yorumlanması

Şekil 3.1 Herzberg vd. (1990) tarafından önerilen filogenetik gruplandırma ağacını göstermektedir.



Şekil 3.1 Filogenetik gruplandırma ağacı (Herzberg *et al.* 1990)

3.2.8 Patojenite adası tespiti

Bu çalışmada *E. coli* izolatları, PAI III536, PAI IV536 ve PAI IICFT073'ün saptanmasını içeren reaksiyon A olarak adlandırılan iki multipleks PCR reaksiyonu kullanılarak PAI varlığı açısından taranmıştır. PCR reaksiyonu B ise beş PAI: PAII Ij96, PAI II536, PAI Ij96, PAI IIj96 ve PAI ICFT073 reaksiyon içermektedir (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12 Patojenite adası markörü için primer diziler

Gen	Boyut bp	Primer	Kaynak
Multiplex PCR PAI III536	200	F:CGGGCATGCATCAATTATCTTTG, R:TGTGTAGATGCAGTCACTCCG	2
PAI IV536	300	F:AAGGATTCGCTGTTACCGGAC, R:TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	2
PAI IICFT073	400	F:ATGGATGTTGTATCGCGCPS, R:ACGAGCATGTGGATCTGC	2
Multiplex PCR PAII536	1800	F:TAATGCCGGAGATTCATTGTC, R:AGGATTTGTCTCAGGGCTTT	2
PAI II 536	1000	F:CCATGTCCAAAGCTCGAGC, R:CTACGTCAGGCTGGCTTTG	2
PAI I J96	400	F:TCGTGCTCAGGTCCGGAATTT, R:TGGCATCCCACATTATCG	2
PAI II J96	2300	F:GGATCCATGAAAACATGGTTAATGGG, R:GATATTTTTGTTGCCATTGGTTACC	2
PAI ICFT073	930	F:GGACATCCTGTTACAGCACGCA, R:TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	2

Çizelge 3.13 hem A hem de B reaksiyonları için PCR programını göstermektedir. Çizelge 3.14'de ise PAI'lerin amplifikasyonu için adımlar ve sıcaklıkları gösterilmektedir.

Çizelge 3.13 Hem A hem de B reaksiyonları için PCR programı

Bileşenler	Konsantrasyon	Hacim (50 µL)
Multiplex PCR reaksyonu A		
PCR master mix	1 x	5 µL
F primer	0,5/ µL	1 µL her primer için
R primer	0,5/ µL	1 µL her primer için
Template DNA	-----	5 µL
DW	--------	-------
Multiplex PCR reaksyonu B		
PCR master mix	1X	5 µL
F primer	0,4/ µL	0,5 µL her primer için
R primer	0,4 µL	0,5 µL her primer için
Template DNA	-----	5 µL
DW	------	35

Çizelge 3.14 PAI'lerin amplifikasyonu için adımlar ve sıcaklık

Faz	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
İlk denatürasyon	94°C	5 min	1X
Denatürasyon	94°C	1 min	30X
Tavlama	55°C	1 min	
Ekstansiyon	72°C	1 min	
Son ekstansiyon	72°C	10 min	1X

4. BULGULAR

4.1 Geri Kazanım Yüzdesi

Çizelge 4.1'de gösterildiği gibi, 130 klinik numuneden 65 (%50) numune *E. coli* büyümesi göstermiştir. En yüksek geri kazanım yüzdesi dışkıda 35/50 (%70), idrar da ise 20/50 (%40) olarak kaydedilmiştir. Hastane örnekleri en düşük iyileşme yüzdesine 10/30 (% 33,3) sahiptir. İstatistiksel analiz, üç kaynaktan izolasyon yüzdesiyle ilgili olarak önemli farklılıklar (P > 0,05) olduğunu bulmuştur.

Çizelge 4.1 Farklı klinik örneklerde (idrar, hastane ve dışkı) *E. coli* izolasyon oranı

***E. coli* izolasyon**	**Numune Sayısı**	**Pozitif *E. coli***		**Diğer türlerin büyümesi %**	**P-Değeri**
		No.	%		
İdrar	50	20	40%	30	0,215
Hastaneler	30	10	33,3%	20	
Dışkı	50	35	70%	15	
Toplam	130	65	50%	65	

4.2 *E. coli* Antibiyogramı

Antibiyogram sonuçlarına göre, *E. coli* izolatları yüksek, orta ve en düşük olarak sınıflandırılmıştır. Buna göre; yüksek dirençli grup (%70'den fazla direnç oranı) ampisilin 21 (%100), piperasilin 20 (%95), amoksisilin 19 (%90,5), seftriakson 18 (%86) ve tetrasiklin 17 (%8) olarak sıralanmaktadır. Orta derecede dirençli grup, siprofloksasin 13 (%62), levofloksasin 14 (%67) ve trimetoprim sülfametoksazol 12 (%57) olarak tespit edilmiştir. En düşük direnç oranı gösteren 14 izolat; gentamisin 8 (%38) ve amikasin 6 (%29)'dir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 *E. coli* antibiyotik duyarlılık testinin sonuçları

Antibiotik	S(%)	R(%)
Ampisillin (AMP)	0(0)	21(100)
Piprasillin (PIP)	1(5)	20(95)
Amoksisillin (AMC)	2(9,5)	19(90,5)
Seftriakson (CTR)	3(14)	18(86)
Tetrasiklin (TC)	4(19)	17(81)
Amikasin (AMK)	15(71)	6(29)
Gentamysin (GN)	13(62)	8(38)
Siprofloksasin (GIP)	8(38)	13(62)
Levofloksasin (LEV)	7(33)	14(67)
Trimetoprim/Sülfametoksazol (SXT)	9(43)	12(57)

S: duyarlılık, R: CLSI (2015) kılavuzuna göre direnç

4.3 Çoklu İlaç Dirençli İndeks

Antibiyogram analizine göre, izole edilen çoğu *E. coli* 18/21 (%85,7), değişen MDRI aralığı (0,2- 0,5) ile çoklu ilaca karşı dirençli olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Bu çizelgede MDRI çoklu ilaca karşı direnç indeks oranını temsil etmektedir.

Çizelge 4.3 *E. coli*'nin çoklu ilaca karşı direnç indeks değerleri

No.	Toplam Antibiyotik No.	Antibiyotik Direnç No.	MDRI	Antibiyotik Adları	
1	10	5	0,5	CT, LEV, AMK, CTR, AMP	
2	10	2	0,2	GN, CTR	
3	10	3	0,3	AMK, CTR, PIP	
4	10	1	0,1	PIP	
5	10	4	0,4	SXT, AMK, AMP, PIP	
6	10	5	0,5	GN, AMP, LEV, PIP, AMK	
7	10	3	0,3	AMK, CTR, LEV	
8	10	2	0,2	AMC, AMP	
9	10	4	0,4	AMP, SXT, AMK, GN	
10	10	5	0,5	CT, AMP, PIP, AMC, LEV	
11	10	2	0,2	PIP, CTR	
12	10	1	0,1	CIP	
13	10	4	0,4	CTR, AMK, AMC, SXT	
14	10	3	0,3	GN, LEV, CIP	
15	10	4	0,4	CT, CIP, AMP, AMC	
16	10	3	0,3	AMC, LEV, CIP	
17	10	3	0,3	AMC, AMK, GN	
18	10	2	0,2	SXT, PIP	
19	10	3	0,3	LEV, CTR, AMP	
20	10	1	0,1	AMP	
21	10	4	0,4	LEV, PIP, AMP, LEV	

4.4 Biyofilm üretimi

Biyofilm testinin sonuçları Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'te gösterilmektedir. İzolatların tümü değişen derecelerde biyofilm üretme kabiliyeti göstermiştir. Toplam izolatların 35'i (%53) güçlü, 28'i (%43) orta düzeyde ve son olarak 2'si (%3,4) zayıf biyofilm üreticisi olarak sınıflandırılmıştır. En yüksek oran (%60), idrar ve hastanelerden alınan izolatlarda tespit edilmiştir. Tüm verilerin değerlendirilmesi sonucunda yapılan istatistiksel analiz sonucunda izolasyon kaynakları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur.

Çizelge 4.4 Biyofilm testinin sonuçları

İzolat kaynağı	No.	Güçlü (%)	Orta (%)	Zayıf (%)	P-değeri
İdrar	20	12 (%60)	8 (%40)	0	0,0813
Dışkı	35	17 (%48,6)	18 (%41,4)	0	
Hastane	10	6 (%60)	2 (%20)	2 (%20)	
Toplam	65	35 (%53,6)	28 (%43)	2 (%3,4)	

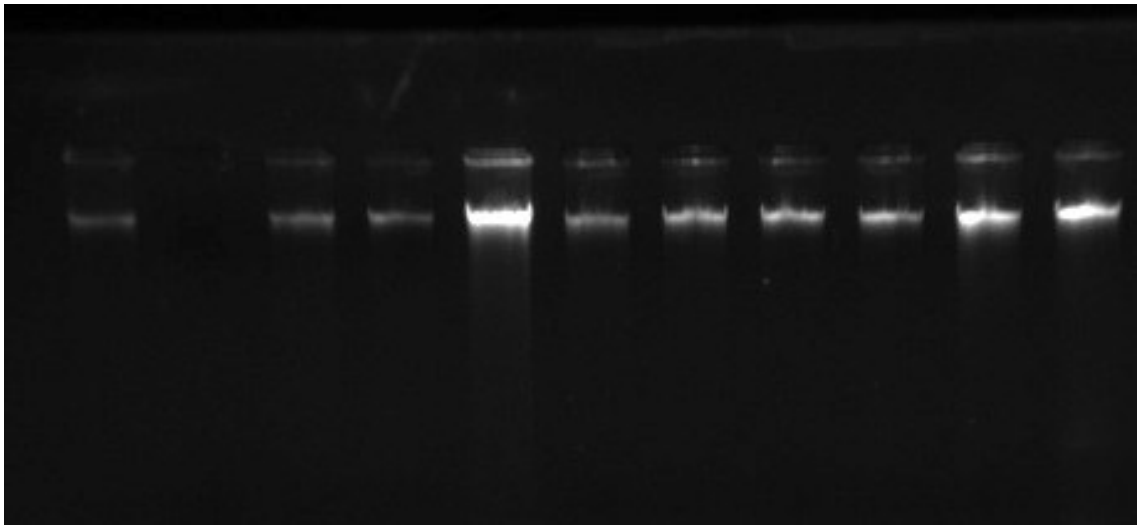
Çizelge 4.5 *E. coli* optik yoğunluğu (OD)

Kontrol		Numuneler									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,019	0,383	0,259	0,482	0,726	0,416	0,406	0,088	0,313	0,451	0,412
2	0,013	0,574	0,416	0,364	0,139	0,183	0,418	0,376	0,349	0,682	0,540
3	0,010	0,671	0,450	0,528	0,072	0,626	0,515	0,101	0,599	0,681	0,710
Ortalama	0,035	0,542	0,375	0,458	0,312	0,408	0,512	0,188	0,420	0,605	0,554

4.5 Moleküler Çalışma

4.5.1 Genomik DNA Ekstraksiyonu

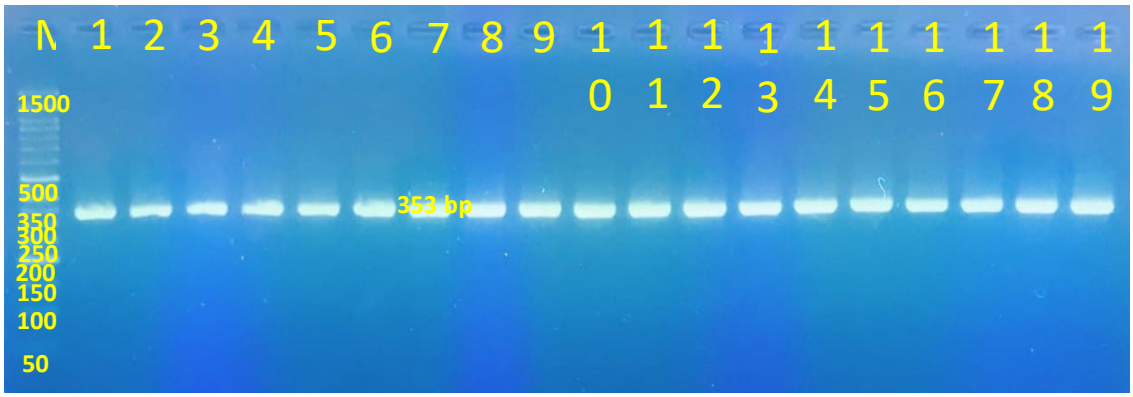
Genomik DNA, DNA ekstraksiyon kiti Genaid Tayland kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen DNA, UV ışığı ile görselleştirilerek saflık ve miktarı ölçülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 *E. coli* izolatlarının Agaroz jel elektroforezi

4.5.2 *E. coli* türlerinin moleküler tanımlanması

E. coli'yi tanımlamak için 353 bp veren 16S rRNA genleri PCRda kullanılmıştır. Tüm izolatlar (%100), Şekil 4.2'de gösterildiği gibi agaroz jel elektroforezi ile pozitif sonuçlar göstermiştir. *E. coli* geni 16S rRNA'nın bir bölümünün PCR ürünü, amplifiye edildi ve elektroforezlendi. Numune sayısı 1 ila 19 arasında değişmektedir. DNA boyası olarak RedSafe kullanılmıştır. Jel %2 konsantrasyonundadır.



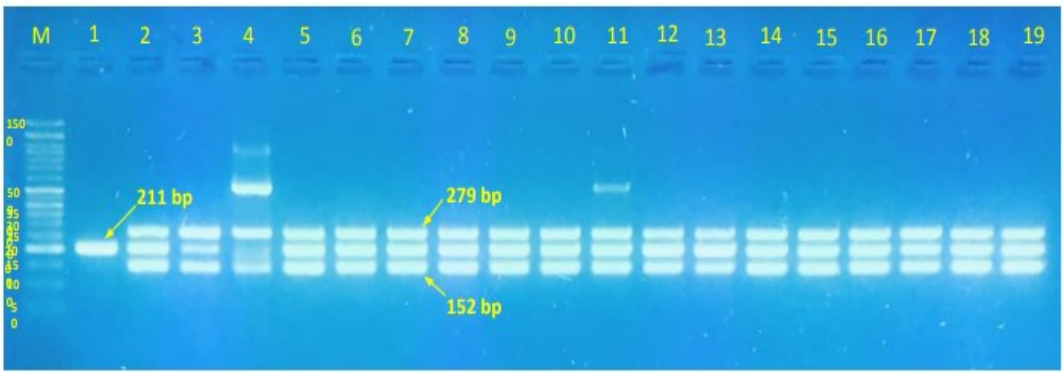
Şekil 4.2 *E. coli* 16S rRNA geninin PCR ürünleri

4.6 Filogruplar

Elde ettiğimiz sonuçlar incelendiğinde, B2 grubunun 50/65 (%77,0) oranı ile diğerlerinden en yüksek filogrup olduğu ortaya çıkmıştır. Bu grupta en yüksek oranlar, İdrar 20/20 (%100) ve dışkı izolatlarında 20 (%57,1) bulunmaktadır. Filogenetik gruplar arasındaki en düşük değerler ise A 10 (%28,5) ve B1 5 (%14,2) gruplarında bulunmaktadır (Çizelge 4.6). Bu filogruplar görselleştirilerek jel elektroforezlenmiştir. PCR ürününün boyutu sırasıyla 279 bp, 211 bp ve 152 bp olarak belirlenmiştir. Örnek sayısıdır1-19'dur. Jel %2 ve DNA boyası RedSafe'dir (Intron, Kore, V: 90). Çizelge 4.6'da farklı klinik örneklerden elde edilen *E. coli* filogrubu gösterilmektedir.

Çizelge 4.6 *E. coli* filogrubu

İzolasyon kaynağı	**No:**	**Filogruplar**			
		A	B1	B2	D
İdrar	20	0	0	20 (%100)	0
Dışkı	35	10 (%28,5)	5 (%14,2)	20 (%57,1)	0
Hastane	10	0	0	10 (%100)	0
Toplam	**65**	**10 (%15,4)**	**5 (%7,6)**	**50 (%77,0)**	**0**



Şekil 4.3 *E. coli*'nin (ChuA, YjaA ve TspE4C2) hedeflenen üç geninin multiplexed PCR ürünleri

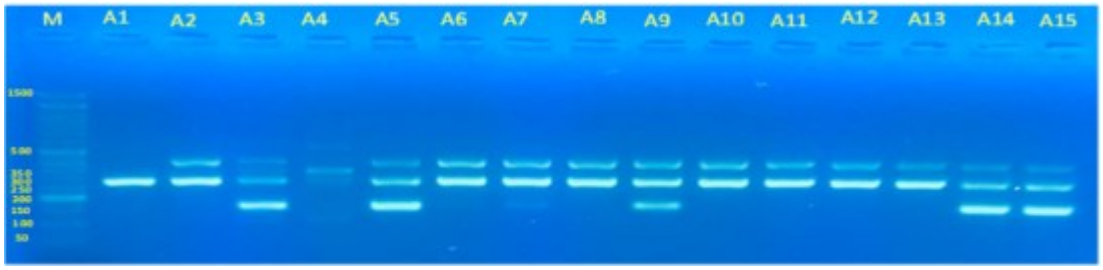
4.7 Patojenite Adalarının Moleküler Tespiti

Bu çalışmada, patojenite adaları spesifik bir primer kullanılarak araştırılmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada izole edilen *E. coli*'lerin en az bir patojenite adası barındırdığını tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

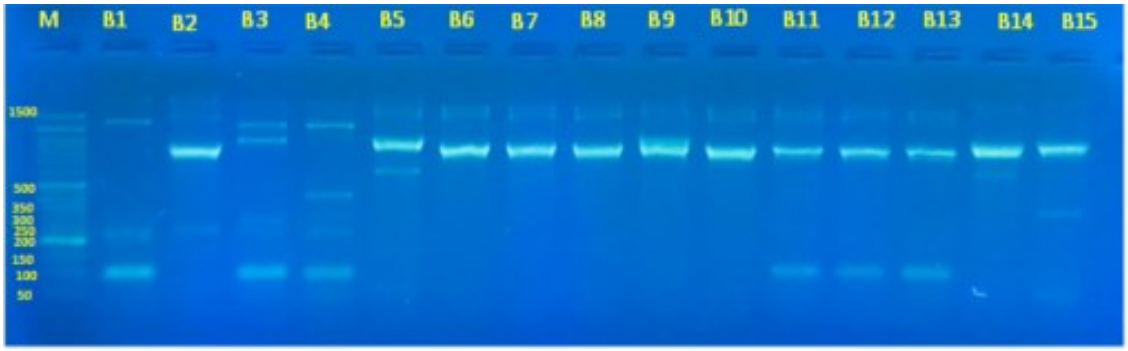
Çizelge 4.7 Farklı klinik örnekler arasında patojenite adalarının dağılımı

	Patojenite adaları								
Numune		*PAI* III_{536}	*PAI* IV_{536}	*PAI* $IICFT_{073}$	PAI I_{536}	*PAI* II_{536}	*PAI* IJ_{96}	*PAI* IIJ_{96}	*PAIICFT* $_{073}$
İdrar	20	3 (%15)	20 (%100)	20(%100)	0	3(%15)	0	0	8(%40)
Dışkı	35	1(%2,8)	0	0	0	0	0	0	2(%5,7)
Hastane	10	1(10%)	0	0	0	0	0	0	2(%20)
Toplam	65	5(%7,6)	20(%30,7)	20 (%30,7)	0	4,65	0	0	12(%18,45)

İzolasyon kaynağına göre, idrar izolatları en yüksek patojenite adacıkları prevalansını gösterirken, dışkı izolatları patojenite adalarının sadece 2'si (%5,7) yani (PAI III536, PAI ICFT) barındırmaktadır. Benzer şekilde, hastane izolatları sadece iki patojenite adası için pozitif etki göstermiştir (PAI III536, PAI ICFT). En yaygın patojenite adaları PAI IV536 (%30,7) ve PAI IICFT073 (%30,7) olarak sıralanmaktadır. Şekil 4.4 ve Şekil 4.5 elektroforez ile PAI'nin varlığını temsil edilmiştir. PCR reaksiyonu A ürününün jel elektroforezi sırasıyla 1000 ve 930'dur.



Şekil 4.4 A ürününün PCR reaksiyonu (PAI III536, PAI IV536 ve PAI IICFT073) jel elektroforezi



Şekil 4.5 B ürününün PCR reaksiyonu (PAI II 536 ve PAI ICFT073) jel elektroforezi

4.8 Patojenite Adalarının Çoklu İlaç Direnç İndeksi ve Biyofilm Üretimi ile Arasındaki Korelasyon

E. coli, Çizelge 4.8'de gösterildiği gibi farklı patojenite adacıkları kombinasyonlarına dayalı olarak dört gruba ayrılabilir. Sonuçlar incelendiğinde, 2, 3 ve 4 patojenite adalarının güçlü biyofilm üretimi olduğunu göstermiştir. Buna göre, patojenite adalarının varlığı ile biyofilm üretme yeteneği arasında bir korelasyon bulunmaktadır. Ayrıca, antibiyotik direnci ile üç patojenite adası (PAI III536, PAI IV536 ve PAI IICFT073) arasında da bir ilişki bulunmaktadır. Yüksek MDRI (0,5) dört patojenite adasında (PAI III536, PAI IV536, PAI IICFT073 ve PAI ICFT073) tespit edilmiştir. Özellikle, filogrup B2 %100'ün izolatları, E. coli filogrup B2'nin moleküler bir imzası olarak kabul edilebilecek patojenite adalarına (PAI IV 536 ve PAI IICFT073) sahiptir.

Çizelge 4.8 Patojenite adalarının çoklu ilaç direnç indeksi ve biyofilm üretimi ile arasındaki korelasyonu

Patojenite adalarının kombinasyonları	**No:**	**Biyofilm**	**MDR**	**Filogruplar**	**Kaynak**
PAI IV_{536} 1 PAI $ICFT_{073}$ 2 PAI III_{536} 1	4	Zayıf	0,2	A	Dışkı, Hastane İdrar
PAI IV_{536} PAI $IICFT_{073}$	52	Güçlü	0,4	B2	İdrar Dışkı
PAI III_{536} PAI IV_{536} PAI $IICFT_{073}$	4	Güçlü	0,5	B1	İdrar
PAI III_{536} PAI IV_{536} PAI $IICFT_{073}$ PAI $ICFT_{073}$	5	Güçlü	0,5	B2	İdrar Hastane

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmanın sonuçlarını *E. Coli*'nin izolasyon oranı açısından değerlendirdiğimizde sıralama dışkı izolatları (%70), idrar izolatları (%40) ve hastane izolatları (%33,3) olarak karşımıza çıkmaktadır. Mevcut çalışmanın dışkı izolatlarındaki yüzdesi diğer izolatlardan (idrar ve hastane) daha yüksektir.

Bu çalışmada, antibiyotikler izolatlara karşı dirençlerine göre yüksek, orta ve düşük dirençli olarak sınıflandırılmıştır. İzolatlara karşı yüksek antibiyotik direnci, Ampisilin, Piperasilin, Ceftriakson, amoksisilin ve tetrasiklin (sırasıyla %100, %95, %90, %86 ve %81) olarak tespit edilmiştir. Ampisilin, Ceftriakson ve amoksisilin β-Laktamaza, tetrasiklinler tetrasiklinlere aitken, Amikasin ve Gentamisin Aminoglikozitlere aittir. Irak'ta yapılan önceki çalışmalar ile karşılatırıldığında (Manal *et al.* 2017), Ampisilin'e karşı yüksek direnç oranı için uyumlu sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Ayrıca bu durumun antibiyotiklerin kapsamlı ve uzun süreli kullanımından dolayı olabileceği düşünülmüştür (Li *et al.* 2014). Aminoglikozidlerle ilgili elde edilen düşük direnç oranı yine Irak'ta (Manal *et al.* 2017) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile uyumlu iken Tayvan'da Yang vd. (2009)'un yaptığı çalışmanın sonuçları ile farklılık göstermiştir. Bu durumun, bir ülkeden diğerine antibiyotik tüketim prevalansındaki farklılıklar nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Tajbakhsh vd. (2016) tarafından yapılan çalışma, Ampisilin ve tetrasikline karşı yüksek oranda direnç bulmuştur (sırasıyla %87,5, %72,5) ve bu sonuçlar bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumludur. Ceftriakson'a karşı en yüksek direnç (%86) bulunmuştur ve bu sonuç Ibrahim vd. (2012)'nin çalışmasının bulguları ile uyumludur. Çalışmamızda Amikasin ve gentamisin'e karşı elde etmi olduğumuz düşük direnç oranı Çelebi vd. (2007) ve Gawad vd. (2018) tarafından yapılan çalışmaların sonuçları ile doğrulanmıştır.

Biyofilm sonuçları açısından (%53,6) güçlü, (%43) orta ve (%3,4) zayıf olarak üç sınıf karşımıza çıkmıştır. Bu durum, Suudi Arabistan'da *E. coli*'nin (%60) güçlü biyofilm ürettiğini, diğer izolatların ise orta ila zayıf biyofilm oluşturduğunu tespit eden Al-Shabib vd. (2017) sonuçlarına yaklaşık olarak benzerdir. Tabarek ve Amal (2020) tarafından Irak'ta UTI hastası üzerinde yapılan başka bir çalışmada (%72) orta, (%16) güçlü ve

(%12) zayıf biyofilm oluşumu bulunmuştur ve bu bizim çalışmamızın sonuçları ile uyuşmamaktadır. Fattahi vd. (2015) tarafından İran'da yapılan çalışma, biyofilm oluşumu ile UTI arasında bir ilişki olduğunu doğrulamıştır. Sabir vd. (2017), UTI'nin ürün biyofilmini yüksek oranda izole ettiğini ve bu durum mevcut çalışma ile sonuçlar olduğunu göstermiştir. Buna karşılık, Biscola vd. (2011) ve Narisawa vd. (2005) çalışmasının sonuçları, klinik *E. coli* izolat örneklerinden düşük biyofilm üretimi göstermiştir ve bu durum bizim sonuçlarımız ile uyuşmamaktadır. Bunun aksine, Whelan vd. (2020) çalışmasında UTI izolatlarının (%81) güçlü biyofilm üreticisi olduğunu tespit etmiştir.

Filogenetik gruplandırma için bu çalışmanın sonuçları A (%15,4), B1 (%7,6), B2 (%77,0) ve D (%0) olarak elde edilmiştir. B2 grubu Obata-Yasuoka vd. (2002) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile benzer bulunmuştur. Aynı zamanda Hilbert vd. (2008) ve Watt vd. (2003) tarafından yapılan çalışmalar ile uyumludur. Iraklı araştırmacılar tarafından idrar izolatlarından yapılan diğer çalışmalarda B2 yüzdesi mevcut çalışmalardan daha düşük elde edilmiştir (Hussain and Saleh 2019). Çalışmamızda ikinci filogrup A (%15,4) olarak bulunmuştur. Tespit ettiğimiz oran Obata-Yasuoka, Hilbert ve Watt'tan (%8, %8 ve %12) yapmış oldukları çalışmaların sonuçlarından daha yüksektir. Khairy vd. (2019) klinik örnekler üzerinde yaptıkları çalışmada filogrup A'nın baskın olduğunu, ardından B2 ve D'nin geldiğini tespit etmişlerdir. Duriez vd. (2001) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarında ise, grup A ve grup B1'in sırasıyla (%40 ve %34), B2 grubu ise sadece (%11) olarak bulunmuştur. Zhang vd. (2002) ise idrar izolatlarından B2 grubun (%69) olarak bulmuşlardır. Perez vd. (2010) tarafından yürütülen çalışma, B1 ve D gruplarına ait klinik örneklerin izolatlarının sırasıyla (%35 ve %14) olduğunu ortaya koymuştur ve bu sonuçlar bizim çalışmamızın sonuçları ile uyuşmamaktadır.

Patojenite adasına (PAI) ilişkin sonuçları değerlendirdiğimizde, PAI IV536 ve PAI IICFT073'ün aynı yüzdeye (%30,7) sahip olduğunu, ardından sırasıyla PAI ICFT073, PAI III536 ve PAI II536(18,45, 7,69 ve 4,65) geldiğini görmekteyiz. PAI I536, PAI IJ96 ve PAI II J96 patojenite adaları bizim çalışmamızda tespit edilmemiştir. Firoozeh vd. (2017) çalışmasında PAI'nin (%60) PAI IV536 olduğu, Samei vd. (2016) ise %58,7'sinin PAI IV536 ve PAI IICFT073 tespit edilmiştir ve bu oran bzim çalışmamızdan daha

yüksektir. Schubert vd. (1998) tarafından yapılan çalışma, PAI IV536'nın (%30) fekal izolat içerdiğini ve bu çalışmanın mevcut çalışmaya benzer olduğunu göstermiştir. Bingen vd. (2002) tarafından yürütülen klinik örnekler üzerinde yapılan çalışmanın sonuçları sırasıyla PAI I 536 ve PAI II 536 (%1, %0) iken, bizim çalışmamızda (%0, %4,65) bulunmuştur. Aynı çalışma da, PAI IJ96 tespit edilmemiştir ve bu durum bizim sonuçlarımız ile uyumludur.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda, klinik örneklerde tespit edilen bakteri türleri popülasyonlarda sıkılıkla karşılaşılan türler olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca antibiyotiklerin kötü kullanımı antibiyotiklere karşı dirençli izolatların ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Karşılaşılan bu durumların azalmasını ve yok olmasını sağlamak için ayrıntılı olarak gıda ve sularda bulunan patojenite adaları ile ilgili, patogenezin patojen bakterilerden zararsız bakterilere taşınmasından sorumlu olan bulaşıcı genetik elementler ile ilgili ve UTICT tedavileri için bitkisel kökenli ilaçların kullanılması ile ilgili kapsmlı araştırmalar yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Acheson, D. W. K. 1992. Enterotoxins in acute infective diarrhoea. J Infect, 24: 225-245.

Agarwal, J., Srivastava, S. and Singh, M. 2012. Pathogenomics of uropathogenic Escherichia coli. Indian Journal of Medical Microbiology, 30(2): 141-8.

Al-Shabib, N. A., Husain, F. M., Ahmad, I., Khan, M. S., Khan, R. A. and Khan, J. M. 2017. Rutin inhibits mono and multi-species biofilm formation by foodborne drug resistant Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Food Control, 79: 325-32.

Ambrosi, C., Sarshar, M., Aprea, M. R., Pompilio, A., Di Bonaventura, G., Strati, F., Pronio, A., Nicoletti, M., Zagaglia, C. and Palamara, A.T. 2019. Colonic adenoma-associated Escherichia coli express specific phenotypes. Microbes Infect, 21: 305–312.

Andersson, J. O. 2005. Lateral gene transfer in eukaryotes. Cell Mol Life Sci, 62: 1182–1197.

Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P. and Frankel, G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. Environ Microbiol, 12: 2385–2397.

Bien, J., Sokolova, O. and Bozko, P. 2012. Role of uropathogenic Escherichia coli virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. Int. J. Nephrol., e681473.

Bingen, B. M., Clermont, O. and Bonacorsi, S. 2002. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of Escherichia coli bearing pathogenicity island-like domains. Infect Immun, 70: 3216–3226.

Bingen, E. B., Picard, N., Brahimi, S., Mathy, P., Desjardins, J., Elion E. and Denamur, S. 1998. Phylogenetic analysis of Escherichia coli strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. J. Infect. Dis., 177: 642–650.

Biscola, F. T., Abe, C. M. and Guth, B. E. C. 2011. Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga Toxin-Producing Escherichia coli strains isolated from different sources. Applied and Environmental Microbiology, 77(7): 2201-8.

Bower, J. M., Eto, D. S. and Mulvey, M. A. 2005. Covert operations of uropathogenic Escherichia coli within the urinary tract. Traffic, 6(1): 76-83.

Boyd, E. F. and D. L. Hartl. 1998. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of Escherichia coli have a phylogenetically clustered distribution J. Bacteriol., 180: 1159–1165.

Burlaka, I., Liu, X. L. and Rebetz, J. 2013. Ouabain protects against Shiga toxin-triggered apoptosis by reversing the imbalance between Bax and Bcl-xL. J Am Soc Nephrol, 24: 1413– 23.

Byrne, L., Vanstone, G. L. and Perry, N. T. 2014. Epidemiology and microbiology of Shiga toxin-producing Escherichia coli other than serogroup O157 in England, 2009-2013. J Med Microbiol, 63(9): 1181–1188.

Campos, S. C., Elkins, J. M. and Sheele, J. M. 2021. Descriptive analysis of prostatitis in the emergency department. Am. J. Emerg. Med., 44: 143–147.

CLSI, 2015. Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems–First Edition: M52-Ed1. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Çelebi, N., Duran, F., Öztürk, L., Açık, G., Aslan, S. and Aslantaş¸ A. 2007. Identification of clinic uropathogen Escherichia coli isolates by antibiotic susceptibility, plasmid and whole cell protein profiles. Advanced Molecular Biology, 1: 31–40.

Chen, R., Tofighi, W. and Bao, M. Carbon monoxide prevents apoptosis induced by uropathogenic Escherichia coli toxins. Pediatric Nephrology, 21(3): 382–389.

Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S. and Fischer, H. 2008. Subversion of toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial toll/interleukin-1 receptor domain–containing proteins. Nature Medicine, 14(4): 399-405.

Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. 2000. Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. Appl Environ Microbiol, 66: 4555-4558.

Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E. and Gordon, D. M. 2013. The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-group. Environmental Microbiology Reports, 5(1): 58–65.

Conway, P. L. 1995. Microbial ecology of the human large intestine. In: Gibson GR, Macfarlane GT, eds. Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, pp. 1–24.

Croxen, M. A. and Finlay, B. B. 2010. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. Nature Reviews and Microbiology, 8: 49-55.

Darfeuille-Michaud, A. 2004. High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. Gastroenterology, 127: 412–421.

Delcour, A. H. 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochim Biophys Acta, 1794: 808-816.

Dielubanza, E. J. and Schaeffer, A. J. 2011. Urinary tract infections in women. The Medical Clinics of North America, 55: 902-8.

Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J., Picard, B. and Denamur, E. 2001. Commensal Escherichia coli isolates are phylogenetically 36 distributed among geographically distinct human populations. Microbiology, 147: 1671-1676.

Eberspacher, F., Hugo, S. and Bhakdi, B. 1989. Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of Escherichia coli hemolysin. Infection and Immunity, 57(3): 983– 988.

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

Fattahi, S., Kafil, H. S., Nahai, M. R., Asgharzadeh, M., Nori, R. and Aghazadeh, M. 2015. Relationship of biofilm formation and different virulence genes in uropathogenic Escherichia coli isolates from Northwest Iran. GMS hygiene and infection control, 10: 72-80.

Feiková, S., Klement, C. and Guadin, C. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis and its practical use. Klin Mikrobiol Infekc Lek, 13(6): 236-41.

Field, M., L. H., Graf, W. J., Laird, J. and Smith, L. 1978. Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. Proc Natl Acad Sci, 75: 2800–2804.

Firoozeh, F., Soleimani-Moorchekhorti, L. and Zibaei, M. 2017. Evaluation of pathogenicity islands in uropathogenic Escherichia coli isolated from patients with urinary catheters. J Infect Dev Ctries, 11: 557–562.

Flemming, H. C., Wingender, J. and Hang, L. 2010. The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol., 8: 623–633.

Fraser, M. E., Chernaia, M. M., Kozlov, Y. V. and James, M. N. 1994. Crystal structure of the holotoxin from Shigella dysenteriae at 2.5 A resolution. Nat. Struct. Biol., 1: 59–64.

Fratamico, P. M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D. S., Baranzoni, G. M. and Feng, P. 2016. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of Escherichia coli. Front. Microbiol., 7: 34-41.

Gaastra, W. and Svennerholm, A. M. 1996. Colonization factors of human enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). Trends Microbiol, 4: 444-452.

Ganal, S., Guadin, C., Roensch, K. and Tran, M. 2007. Effects of streptomycin and kanamycin on the production of capsular polysaccharides in Escherichia coli B23 cells. J. Exp. Microbiol. Immunol., 11: 54-99.

Garmendia, J., Frankel, G. and Crepin, V. F. 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli infections: translocation, translocation, translocation. Infect. Immun., 73: 2573–2585.

Gawad, W. E., Helmy, O. M., Tawakkol, W. M. and Hashem, A. M. 2018. Antimicrobial resistance, biofilm formation, and phylogenetic grouping of uropathogenic Escherichia coli isolates in Egypt: the role of efflux pump-mediated resistance. Jundishapur J Microbiol, 11(2): e14444.

Glode, M. P., Sutton, A. and Robbins, J. B. 1977. Neonatal meningitis due to Escherichia coli K1. J Infect Dis, 136: 93-101.

Godaly, G., Bergsten, G., Frendéus, B., Hang, L., Hedlund, M., Karpman, D., Samuelsson, P., Svensson, M., Otto, G., Wullt, B. and Svanborg, C. 2000. Innate defences and resistance to gram negative mucosal infection. Advances in Experimental Medicine and Biology, 485: 9-24.

Goldwater, P. N. and Bettelheim K. A. 2012. Treatment of enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). BMC Med, 10: 12-16.

Griffin, P. M. and Tauxe, R. V. 1991. The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157:H7, other enterohemorrhagic E. coli, and the associated other heads of lettuce. hemolytic uremic syndrome. Epidemiol Rev, 13: 60–98.

Guyer, D. M., Radulovic, S., Jones, F. E. and Mobley, H. L. 2002. SAT, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic Escherichia coli, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. Infection and Immunity, 81: 96-103.

Gyles, C. L. 2007. Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview. J. Anim. Sci., 85(13): 45–62.

Hall, C. W. and Mah, T. F. 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev, 41: 276-301.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol, 2: 95–108.

Herzberg, C., Gasparik, T. and Sawamoto, H. 1990. Origin of mantle peridotite: constraints from melting experiments to 165 GPa. Journal of Geophysical Research, 95: 15779-15803.

Herzer, P. J., Inouye, M., Inouye, S. and Whittam. T. S. 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of Escherichia coli. J Bacteriol, 172: 6175–6181.

Hilbert, D. W., Paulish, T. E., Mordechai, E., Adelson, M. E., Trama, J. P. 2008. O serogroups, phylogeny, and virulence factors of cervicovaginal and rectal Escherichia coli isolates. Eur. J Clin Microbiol Infect Dis, 27(12): 1265-8.

Holst, O., Moran, A. P. and Brennan, P. J. 2009. Structures, Relevance and Applications. In Microbial Glycobiology: (ed. Moran, A. P.), pp. 3–13, Academic Press, London.

Hsiao, W., Wan, I., Jones, S. J. and Brinkman, F. S. 2003. IslandPath: aiding detection of genomic islands in prokaryotes. Bioinformatics, 19: 418–420.

Hussain A. and Saleh, M. 2019. Determination of phylogenetic groups and antimicrobial susce-ptibility patterns for Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection. Journal of College of Education for Pure Science, 9(1): 71–81.

Ibrahim, M. E., Bilal N. E. and Hamid M. E. 2012. Increased multi-drug resistant Escherichia coli from hospitals in Khartoum state, Sudan. Afr Health Sci, 12: 368–375.

Jann, K. and Jann, B. 1983. The K antigens of Escherichia coli. Prog. Allergy, 33: 53–79.

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. 2018. Molecular Epidemiology of Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli. EcoSal Plus, 8: e950163.

Johnson, J. R. and Stell, A. L. 2000. Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J. Infect. Dis., 181: 261–272.

Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Obryan, T., Colodner, R. and Raz, R. 2006. Virulence genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among Escherichia coli urine sample isolates from Israeli women with acute uncomplicated cystitis. Antimicrob Agents Chemother, 49: 26–31.

Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. 2004. Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol, 2: 123–140.

Kashef, N., Djavid, G. E. and Shahbazi, S. 2010. Antimicrobial susceptibility patterns of community-acquired uropathogens in Tehran, Iran. J Infect Dev Ctries, 4: 202–206.

Khairy, R. M., Mohamed, E. S., Abdel Ghany, H. M. and Abdelrahim, S. S. 2019. Phylogenic classification and virulence genes profiles of uropathogenic E. coli and diarrhegenic E. coli strains isolated from community acquired infections. PLoS One, 14(9): e0222441.

Kim, K. S. 2001. Escherichia coli translocation at the blood-brain barrier. Infect Immun, 69: 5217–22.

Kim, K. S. 2003. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. Nat Rev Neurosci, 4: 376–85.

Krumperman P. H. 1983. Multiple antibiotic resistantce indexing of Escherichia coli to identify High- Risk sources of fecal contamination of foods. Applied and Enviromental Microbiology, 46(1): 165-170.

Lane, D. R. and Takhar, S. S. 2011. Diagnosis and management of urinary tract infection and pyelonephritis. Emergency medicine clinics of North America, 29(3): 539-52.

Lane, M. C., Lockatell, V., Monterosso, G., Lamphier, D., Weinert, J. and Hebel, J. R. 2005. Role of motility in the colonization of uropathogenic Escherichia coli in the urinary tract. Infect Immun, 73: 7644–7656.

Lear, G. and Lewis, G. D. 2012. Microbial Biofilms: Current Research and Applications. Caister Academic Press, USA.

Lecointre, G., Rachdi, L., Darlu, P. and Denamur, E. 1998. Escherichia coli molecular phylogeny using the incongruence length difference test. Mol Biol Evol, 15: 1685-1695.

Leimbach, A., Hacker, J. and Dobrindt, U. 2013. E. coli as an all-rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity. Curr Top Microbiol Immunol, 358, 3–32.

Levine M. M. 1987. Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. The Journal of Infectious Diseases, 155(3): 377–389.

Levine M. M. and Edelman R. 1984. Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. Epidemiol Rev. 6: 31–51.

Li, B., Zhao, Z., Wang, M., Huang, X., Pan, Y. and Cao, Y. 2014. Antimicrobial resistance and integrons of commensal Escherichia coli strains from healthy humans in China. Journal of Chemotherapy, 26(3): 190-192.

Maiden, M. C. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. Annu. Rev. Microbiol., 60: 561–588.

Mainil, J. 2013. Escherichia coli virulence factors. Veterinary Immunology and Immunopathology, 152(1-2). 2–12.

Manal, M., Khadhim, L. and Meraim A. 2017. Antibiotics Resistance and Integron Class 1 among Commonsal Escherichia coli. AL-Qadisiya Medical Journal, 13: 24-32.

Marre, R., Kreft, B. and Hacker, J. 1990. Genetically engineered S and F1C fimbriae differ in their contribution to adherence of Escherichia coli to cultured renal tubular cells. Infection and Immunity, 58(10): 3434–3437.

Mcdougald, L. R., Nolan, L. K. and Swayne, D. E. 2008. Diseases of poultry. 12th ed. Iowa: Iowa State University Press, pp. 691–738, USA.

Mehrad, B., Clark, N. M., Zhanel, G. G. and Lynch, J. P. 2015. Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. Chest, 147: 1413-1421.

Mele, C., Remuzzi, G. and Noris, M. 2014. Hemolytic uremic syndrome. Semin Immunopathol, 36(4): 399-420.

Mills, M., Meysick, K. C. and O'Brien, A. D. 2000. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic Escherichia coli kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. Infection and Immunity, 68(10): 5869-5880.

Moroh, J. L., Fleury, Y., Tia, H., Bahi, C. and Lietard, C. 2014. Diversity and antibiotic resistance of uropathogenic bacteria from Abidjan. Afr J Urol, 20: 18–24.

Müller, C. M., Berg, A. and Straseviçiene, J. 2009. Type 1 fimbriae, a colonization factor of uropathogenic Escherichia coli, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP. PLoS Pathogens, 5(2): e1000303.

Muthing, J., Schweppe, C. H., Karch, H. and Friedrich, A. W. 2009. Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. Thromb. Haemost, 101: 252–264.

Narisawa, N., Furukawa, S., Ogihara, H. and Yamasaki, M. 2005. Estimation of the biofilm formation of Escherichia coli K-12 by the cell number. Journal of Bioscience and Bioengineering, 99: 78-80.

Nataro, J. P. and Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin. Microbiol. Rev., 11: 142–201.

Nishikawa, Y., Zhou, Z., Hase, A., Ogasawara, J., Cheasty, T. and Haruki, K. 2000. Relationship of genetic type of Shiga toxin to manifestation of bloody diarrhea due to enterohemorrhagic Escherichia coli serogroup O157 isolates in Osaka City, Japan. J. Clin. Microbiol., 38: 2440–2442.

Obata-Yasuoka, M., Ba-Thein, W., Tsukamoto, T., Yoshikawa, H. and Hayashi, H. 2002. Vaginal Escherichia coli share common virulence factor profiles, serotypes and phylogenywith other extraintestinal E. coli. Microbiology, 148(9): 2745-52.

Olowe, B. M., Okanlawon, R. A. Olowe, O. A. and Olayemi, A. B. 2008. Antimicrobial resistant pattern of Escherichia coli from human clinical samples in Osogbo, south western Nigeria. African Journal of Microbiology Research, 2(1): 8–11.

Perez, O. G., G´omez-Duarte, C. and Arias, M. L. 2010. Diarrheagenic Escherichia coli in children from Costa Rica. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 83(2): 292– 297.

Picard, B., Garcia, S., Gouriou, P., Duriez, N., Brahimi, E., Bingen, J., Elion, E. and Denamur, J. S. 1999. The link between phylogeny and virulence in Escherichia coli extraintestinal infection. Infect. Immun., 67: 546–553.

Plos, H., Connell, U. and Jodal K. 1995. Intestinal carriage of P fimbriated Escherichia coli and the susceptibility to urinary tract infection in young children. Journal of Infectious Diseases, 171(3): 625–631.

Poey, M. E., Albini, M., Saona, G. and Laviña, M. 2012. Virulence profiles in uropathogenic Escherichia coli isolated from pregnant women and children with urinary tract abnormalities. Microb Pathog, 52(5): 292–301.

Prosdocimi, E. M., Novati, S., Bruno, R. and Bandi, C. 2013. Errors in ribosomal sequence datasets generated using PCR-coupled 'panbacterial' pyrosequencing, and the establishment of an improved approach. Mol Cell Probes, 27(1): 65–67.

Radlovic, N., Lekovic, Z., Vuletic, B., Radlovic, V. and Simic, D. 2015. Acute Diarrhea in Children. Sr. Arh Celok Lek, 143: 755–762.

Ramirez, M. S. and Tolmasky, M. E. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat, 13: 151-171.

Rao, M. R., Abu-Elyazeed, S. J. and Savarino, A. B. 2003. High disease burden of diarrhea due to enterotoxigenic Escherichia coli among rural Egyptian infants and young children. J Clin Microbiol, 41**:** 4862-4864.

Rhen, M., Makela, P. H., Korhonen, K. 1983. P-fimbriae of Escherichia coli are subjected to phase variation. FEMS Microbiol Lett, 19: 267–271.

Robinson, A. L. and McKillip, J. 2010. Biology of Escherichia coli O157:H7 in human health and food safety with emphasis on sublethal injury and detection, p. 1096–1105. In Mendez-Vilas A (ed), Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Formatex, Badajoz, Spain.

Russo, T. A. and Johnson, J. R. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC. J Infect Dis, 181: 1753-1754.

Sabir, N., Ikram, A. and Zaman, G. 2017. Bacterial biofilm-based catheter-associated urinary tract infections: causative pathogens and antibiotic resistance. Am J Infect Control. 45: 1101–1105.

Samei, A., Haghi, F. and Zeighami, H. 2016. Distribution of pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic Escherichia coli isolates. Folia Microbiol, 61(3): 261–268.

Sarkar, S., Ulett, G. C., Totsika, M., Phan, M. D. and Schembri, M. A. 2014. Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic Escherichia coli. PLoS One, 9(4): e94786.

Scheld, W. M., Koedel, U., Nathan, B. and Pfister, H. W. 2002. Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism(s) of neuronal injury. J Infect Dis, 186(2): e22533.

Schmidt, H. and Hensel, M. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin, Microbiol, Rev, 17, 14–56.

Scholes, T. M., Hooton, P. L., Roberts, K., Gupta, A. E., Stapleton, W. E. and Stamm, D. 2005. Risk factors associated with acute pyelonephritis in healthy women. Annals of Internal Medicine, 142(1): 20–27.

Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E. and Heesemann, J. 1988. Prevalence of the 'high-pathogenicity island' of Yersinia species among Escherichia coli strains that are pathogenic to humans. Infect Immun, 66: 480–485.

Shatalov, A. 2015. Prevalence and antibiotic resistance pattern of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in urine tract infections at the La Paz Medical center, Malabo, Equatorial Guinea. Open J Med Microbiol, 5: 177-183.

Skyberg, J. A., Johnson, T. J., Johnson, J. R., Clabots, C., Logue, C. M. and Nolan, L. K. 2006. Acquisition of avian pathogenic Escherichia coli plasmids by a commensal E. coli isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. Infect Immun, 74: 6287–6292.

Smith, J. L., Fratamico P. M. and Gunther N. W. 2007. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli. Foodborne Pathog Dis, 4: 134–63.

Soltani, S., Emamie, A. D., Dastranj, M., Farahani, A., Davoodabadi, A. and Mohajeri, P. 2018. Role of toxins of uropathogenic Escherichia coli in development of urinary tract infection. British Journal of Pharmaceutical Research, 21(1): e.JPRI.39188.

Spencer, J. D., Schwaderer, A. L. and Becknell, B. 2014. The innate immune response during urinary tract infection and pyelonephritis. Pediatr Nephrol, 29: 1139-49.

Tabarek, S. S. and Amal, A. K. 2020. Genotyping Diversity of Echerichia coli isolated from UTI in Iraqi Patients. MLU, 20(1): 1421–1427.

Tajbakhsh, E., Ahmadi, P., Abedpour-Dehkordi, E., Arbab-Soleimani, N. and Khamesipour, F. 2016. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups

and virulence genes of uropathogenic E. coli isolated from clinical samples in Iran. Antimicrob Resist Infect Control, 5: 11-7.

Tarr, P. I., Gordon, C. A. and Chandler, W. L. 2005. Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome. Lancet, 365: 1073–1086.

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. Front Microbiol, 8: 1566-71.

Timm, C. D., Irino, T. A., Gomes, M. M., Vieira, B. E., Guth, T. M., Vaz, C. N., Moreira, F. and Aleixo. K. 2007. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing Escherichia coli, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. Lett Appl Microbioli, 44: 419-25.

Toth, I., Hérault, F., Beutin, L. and Oswald, E. 2003. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic Escherichia coli strains isolated from human and animal sources: Establishment of the existence of a new cdt variant (type IV). Journal of Clinical Microbiology, 41(9): 4285-4291.

Trachtman, H., Christen, E. and Cnaan, A. 2006. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalcin in D+HUS: a novel marker of renal injury. Pediatr Nephrol, 21: 989-994.

Turner, A., Scott-Tucker, L. M., Cooper I. R. and Henderson, S. M. 2006. Weapons of mass destruction: Virulence factors of the global killer enterotoxigenic Escherichia coli. FEMS Microbiology Letters, 263(1): 10–20.

Vasudevan, G. 2014. Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. J Microbiol Exp, 1(3): 14-21.

Vidal, M. E., Kruger, C., Duran, R., Lagos, M., Levine, V., Prado, C., Toro, F. and Vidal, R. 2005. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic Escherichia coli associated with enteric infections. J Clin Microbiol, 43: 5362-5.

Vigil, P. D., Alteri, C. J. and Mobley, H. L. 2011. Identification of in vivo-induced antigens including an RTX family exoprotein required for uropathogenic Escherichia coli virulence. Infection and Immunity, 79(6): 2335-2344.

Vila, J. 2016. Escherichia coli: an old friend with new tidings. FEMS Microbiol Rev, 40: 437-463.

Wagenlehner, K. G., Naber, W. and Weidner, F. M. 2008. Rational antibiotic therapy of urinary tract infections. MedizinischeM on atsschrift f˙ur Pharmazeuten, 31(10): 385-90.

Watt, S., Lanotte, P., Mereghetti, L., Moulin-Schouleur, M., Picard, B., Quentin, R. 2003. Escherichia coli isolates from pregnant women and neonates: intraspecies genetic distributionand prevalence of virulence factors. J Clin Microbiol, 41(5): 1929-35.

Whelan, S., O'Grady, M., Corcoran, D., Finn, K. and Lucey, B. 2020. Uropathogenic Escherichia coli Biofilm-Forming Capabilities are not Predictable from Clinical Details or from Colonial Morphology. Diseases, 8: 11:18.

Wiles, R. R., Kulesus, T. J. and Mulvey, M. A. 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. Experimental and Molecular Pathology, 85(1): 11–19.

Wurpel, D. J., Beatson, S. A., Totsika, M., Petty, N. K. and Schembri, M. A. 2013. Chaperone-usher fimbriae of Escherichia coli. PLoS One, 8(1): e52835.

Yang, C. M., Lin, M. F., Lin, C. H., Huang, Y. T., Hsu, C. T. and Liou, M. L. 2009. Characterization of antimicrobial resistance patterns and integrons in human fecal Escherichia coli in Taiwan. Jpn J Infect Dis, 23: 87-94.

Zachos, N. C., Tse, M. and Donowitz, M. 2005. Molecular physiology of intestinal Na+/H+ exchange. Annu Rev Physiol, 67: 411–443.

Zhang, L., Foxman, B. and Marrs, C. 2002. Both urinary and rectal Escherichia coli isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. J Clin Microbiol, 40: 3951–3955.

Zhurina, M. V., Gannesen, A. V., Zdorovenko, E. L. and Plakunov, V. K. 2014. Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms. Microbiology, 83: 713–722.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Dhurgham Abdulkadhim RAMADHAN ALFARHAN

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-2022
Lisans	Thi-Qar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012-2016