ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÜRİNER SİSTEM ENFEKSİYONU OLAN IRAKLI HASTALARDAN ÜROPATOJENİK ESCHERİCHİA COLİ'DE (UPEC) SİTOTOKSİK NEKROTİZAN FAKTÖR, KOLİBAKTİN, SİTOLETAL DİSTANSİYON TOKSİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Hiba Naser Ali ALSAHO

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Hiba Naser Ali ALSAHO tarafından hazırlanan **"Üriner Sistem Enfeksiyonu olan Iraklı Hastalardan Üropatojenik Escherichia Coli'de (UPEC) Sitotoksik Nekrotizan Faktör, Kolibaktin, Sitoletal Distansiyon Toksinin Moleküler Analizi"** adlı tez çalışması 08/04/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğretim Üyesi İlker ŞİMŞEK

Eş Danışman : Prof. Dr. Hayfa Hadi Hassani ALATTİYA

Jüri Üyeleri :

Başkan: Prof Dr. Oğuz KUL
Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Veterinerlik Patoloji Anabilim Dalı

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Pınar ARSLAN
Çankırı Karatekin Üniversitesi
Biyoloji Bölümü

Üye: Dr. Öğr. Üyesi İlker ŞİMŞEK
Çankırı Karatekin Üniversitesi
Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu

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 "**Üriner Sistem Enfeksiyonu olan Iraklı Hastalardan Üropatojenik Escherichia Coli'de (UPEC) Sitotoksik Nekrotizan Faktör, Kolibaktin, Sitoletal Distansiyon Toksinin Moleküler Analizi**" konulu tezin bana aittir, 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 (08/04/2022).

Hiba Naser Ali ALSAHO

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÜRİNER SİSTEM ENFEKSİYONU OLAN IRAKLI HASTALARDAN ÜROPATOJENİK ESCHERİCHİA COLİ'DE (UPEC) SİTOTOKSİK NEKROTİZAN FAKTÖR, KOLİBAKTİN, SİTOLETAL DİSTANSİYON TOKSİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Hiba Naser Ali ALSAHO

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi İlker ŞİMŞEK
Eş Danışman: Prof. Dr. Hayfa Hadi Hassani ALATTİYA

Bu çalışma, hemolizin aktivitesi olan Üropatojenik Escherichia Coli (UPEC) izolatlarında virülans toksin genlerinin (cnf1, clb ve cdt) dağılımını belirlemeyi amaçladı. Ek olarak, hemolizin aktivitesi ve sitotoksik nekrotizan faktör ile UPEC izolatında düzenleyici küçük RNA, RfaH'nin ekspresyon seviyesinin araştırılması hedeflendi. Farklı yaşlarda idrar yolu enfeksiyonu (İYE) şüphesi olan erkek, kadın ve çocuk hastalardan idrar örnekleri (248) toplandı. Bu örneklerin farklı bakteriyolojik besiyerlerinde kültürlenmesinden sonra, 93 (%37,5) örneğin *E. coli* ile enfekte olduğu ve 91 (%36,69) örnekte üreme olmadığı, 157 örneğin patojenik bakteri ile enfekte olduğu tespit edildi. Risk faktörü olarak cinsiyete göre kadınlarda (%70,97) erkeklere göre (%29,03) İYE insidansının anlamlı farklılık (16,35, $p \leq 0,0001$) olduğu bulundu. Yaşa göre ise yetişkinlerin (%75,27) İYE'lere çocuklara (%24,7) göre daha duyarlı oldukları ve anlamlı farklılıklarla (23,75, $p \leq 0.0001$) bulundu. UPEC izolatlarının hemolizin üretimi incelendi. Sonuçlar E.coli izolatlarının (%5,1) izolatlarının (H22, H33, H40, H48 ve H53) insan kanlı agar üzerinde hemolizin üretildiğini gösterdi. UPEC izolatları, ampisilin ve amoksisilin/klavulanik aside yüksek direnç (%100) ve siprofloksasine duyarlı (%91) idi. Beş Hemolitin Üreten UPEC izolatında cnf 1, cdtIII ve clbA dâhil olmak üzere virülans genlerinin prevalansı PCR ile tespit edildi. Bu izolatlardan dördü arasında (H22, H40, H48 ve H53) toksin kodlayan genleri (cnf 1 ve clbA) yüksek frekansta (%100) barındırdığı, bir izolatın (H33) her iki gen için de negatif olduğu, cnf1 ve cnf1 olduğu belirtilmiştir. clbA, beş izolatın hepsinde cdtIII geni yoktu. Ayrıca, hemolizin aktivitesine ve sitotoksik nekrotizan faktöre sahip UPEC izolatlarında düzenleyici küçük RNA, RfaH'nin ekspresyon düzeyi RT-qPCR kullanılarak araştırıldı. Hly ve cnf1 genlerinin ekspresyonu, RfaH geni ile korele edildi; katlama değeri sırasıyla 2,51, 5,89 ve 4,19 idi.

2022, 93 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: UTI, E.coli, Gen ekspresyonu, PCR, RT-PCR, Antibiyotikler, Hemolitik aktivite, CNF1, Hly, clbA, cdtIII, Küçük kodlamayan RNA (sRNA'lar), RfaH

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR ANALYSIS OF CITOTOXIC NECROTIZING FACTOR, COLIBACTIN, CYTOLETAL DISTENSION TOXIN IN UROPATOGENIC ESCHERİCHIA COLI (UPEC) FROM IRAQI PATIENTS WITH URINARY SYSTEM INFECTION

Hiba Naser Ali ALSAHO

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

Advisor: Asst. Prof. Dr. Ilker SIMSEK
Co-Advisor: Prof. Dr. Hayfa Hadi Hassani ALATTIYA

This study was aimed at determining the distribution of virulence toxin genes (cnf1, clb, and cdt) in UPEC isolates with hemolysin activity. In addition, investigating the expression level of regulatory small RNA, RfaH, in UPEC isolate with hemolysin activity and cytotoxic necrotizing factor. Urine samples (248) were collected from male, female, and children patients suspected of urinary tract infections (UTIs) at different ages. After culturing these samples on different bacteriological media, it was found that 157 samples were infected with pathogenic bacteria in which 93 (37.5%) samples were infected with E. coli, and 91(36.69 %) samples had no growth. According to the gender as risk factors, it was found UTIs are more incidences in females (70.97%) than males (29.03%) with significant differences (16.35, $p \leq 0.0001$). However, according to the age it was found adults were more susceptible (75.27%) to UTIs than children (24.7%), with significant differences (23.75, $p \leq 0.0001$). The hemolysin production of UPEC isolates was examined, results indicated that (5.1%) isolates (H22, H33, H40, H48, and H53) of E.coli isolates were produced hemolysin on human blood agar. The UPEC isolates were high resistance (100%) to ampicillin and amoxicillin/clavulanic acid, and sensitive (91%) to ciprofloxacin. The prevalence of virulence genes including cnf 1, cdtIII, and clbA in five Hemolytin-Producing UPEC isolates was detected by PCR. It was indicated among four of these isolates (H22, H40, H48, and H53) harbor toxin encoding genes (cnf 1 and clbA) with high frequency (100%), one isolate (H33) was negative for both genes, cnf1, and clbA, while all five isolates had no cdtIII gene. Moreover, the expression level of regulatory small RNA, RfaH, in UPEC isolates with hemolysin activity and cytotoxic necrotizing factor was investigated by using RT-qPCR. The expression of Hly and cnf1 genes was correlated with the RfaH gene; the folding value was 2.51, 5.89, and 4.19 respectively.

2022, 93 pages

Keywords: UTI, E.coli, Gene expression, PCR, RT-PCR, Antibiotics, Haemolytic activity, CNF1, Hly, clbA, cdtIII, Small-non-coding RNA (sRNAs), RfaH

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

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

Beni her zaman destekleyen sevgili aileme, babama, anneme, kardeşlerim; abim Ahmed ALSAHO ablam Dr. Noor ALSAHO, abim Ahmed ALSAHO ve Huda ALSAHO' ya, kuzenim Raed ALSAHO ve diğer kuzenlerim Ahmed MAHSİN, Mahmmod, Saleh' e en içten teşekkürlerimi sunarım. Bana her aşamada yardım, destek ve güç veren amcalarim Sayın Amer ALSAHO ve Sayın Dr. Hussein ALSAHO' ya teşekkürlerimi, saygılarımı ve takdirlerimi sunarım.

Tüm Türk halkına yürekten teşekkürlerimi saygılı bir şekilde takdim ediyorum.

Gurbette yanımda olan ve destek veren dostlarım Sayın Abbas ALİSAWİ ve Sayın Hasanain OBAİD' e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Bana iyi sözler söyleyen, destek veren ve benim için hayırlı dilekler isteyen arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Hiba Naser Ali ALSAHO
Çankırı, Nisan 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **4**
2.1 İdrar Yolu Enfeksiyonu (İYE) **4**
2.2 Patojenik *Escherichia Coli*'nin Özellikleri **5**
2.3 Patojenik *Escherichia Coli*'nin Sınıflandırılması **6**
2.3.1 Enteropatojenik *escherichia coli* (EPEC) **6**
2.3.2 Eksraintestinal patojenik *escherichia coli* (ExPEC) **9**
2.4 UPEC'nin Virülans Faktörleri **12**
2.4.1 Bakteriyel hücre yüzeyi virülans faktörü **12**
2.4.2 Salgılanan virülans faktörü **13**
2.5 Bakterilerde Küçük Kodlamayan RNA'lar **18**
2.6 Escherichia Coli'de RfaH **20**
3. MATERYAL VE METOT **22**
3.1 Materyaller **22**
3.1.1 Araç ve gereçler **22**
3.1.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler **23**
3.1.3 Kültür besiyerileri **23**
3.1.4 Çözeltiler **24**
3.1.5 Tamponların hazırlanması **25**
3.1.6 McFarland standart çözeltisi **25**
3.1.7 Reaktiflerin hazırlanması **26**
3.1.8 Gram boyamanın hazırlanması **27**

3.1.9 Kültür besiyerlerinin hazırlanması 27
3.1.10 Sterilizasyon yöntemleri 30
3.2 Bakteriyolojik Yöntemler 31
3.2.1 Numune toplama 31
3.2.2 Laboratuvar teşhisi 31
3.3 Bakterilerin Muhafazası 35
3.3.1 Kısa süreli saklama 35
3.3.2 Uzun süreli saklama 35
3.3.3 Dondurulmuş stokların alt kültürü 35
3.4 Moleküler Yöntemler 36
3.4.1 Ticari kitler 36
3.4.2 Primerler 36
3.4.3 UPEC izolatlarında virülans genlerinin (Cnf1, clbA ve cdtlll) PCR ile tespiti 37
3.4.4 UPEC izolatlarında hly, cnf1 ve küçük kodlamayan RNA (RfaH) ekspresyon genlerinin belirlenmesi 39
3.5 İstatistiksel Analiz 44
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 45
4.1 İdrar Örneklerinde Bakteriyel Enfeksiyonların Prevalansı 45
4.2 İdrar Yolu Enfeksiyonu Olan Hastalarda *Escherichia Coli* İnsidansı 48
4.3 *Escherichia Coli*'nin Özellikleri 49
4.4 UPEC'in Biyokimyasal Özellikleri 51
4.5 Kanlı Agarda Hemolizin Üreten *E.Coli* İzolatlarının Görüntülenmesi 54
4.6 UPEC İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı 55
4.7 Moleküler Analiz Çalışması 61
4.7.1 UPEC izolatlarının DNA konsantrasyonu 61
4.7.2 Hemolizin üreten UPEC izolatlarında virülans genlerinin (Cnf 1, cdtIII ve clbA) prevalansı 61
4.7.3 UPEC izolatlarında küçük regülatör RNA, RfaH ve virülans genlerin, hly ve cnf1'in ifadesi 63
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 65
KAYNAKLAR 66
EKLER 86
ÖZGEÇMİŞ 92

SİMGELER DİZİNİ

bp	Baz çifti
Dk	Dakika
ΔΔCT	Delta delta CT
ΔCT	Delta CT
CT	Eşik döngüsü
G	Gram
Ib/In²	İnç kare başına pound
Kb	Kilobaz
CFU	Koloni oluşturma birimi
L	Litre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
ng	Nanogram
*	Önemli
pg	Petagram
pmol	Pikomol
°C	Santigrat derece
σ70	Sigma 70 faktörü
V	Voltaj
%	Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

ABÜ	Asemptomatik Bakteriüri
AİYE	Alt İdrar Yolu Enfeksiyonları
APEC	Kuş patojenik Escherichia Coli
BBD	Mesane Ve Bağırsak Disfonksiyonu
BFP	Demet Oluşturan Demetler
BSİ	Bloodstream İnfections
BSİ	Bloodstream İnfections
DAEC	Diffüz Yapışık Escherichia Coli
DBÜSA	Böbrek Ve Üriner Sistem Konjenital Anomalileri
EAEC	Enteroagregatif Escherichia Coli
EHEC	Enterohemorajik Escherichia Coli
EIEC	Enteroinvaziv Escherichia Coli
EPEC	Enteropatojenik Escherichia Coli
ETEC	Enterotoksijenik Escherichia Coli
EXPEC	Bağırsak Dışı Patojenik Escherichia Coli
GI	Gastrointestinal
HUS	Hemolitik Üreemik Sendrom'a
İYE	İdrar Yolu Enfeksiyonu
KİYE	Komplike İdrar Yolu Enfeksiyonları
KOİYE	Komplike Olmayan İdrar Yolu Enfeksiyonları
LA	Yerel Yapışma
LEE	Enteropatojenik Lokus
NMEC	Neonatal Menenjit Escherichia Coli
PAI	Patojenik Bağırsak Adacık Bölgesi
SEPEC	Sepsis İle İlişkili Escherichia Coli
STX	Shiga Toksini
T3SS	Tip III Salgılama Sistemlerine
T-EPEC	Tipik Enteropatojenik Escherichia Coli
TİYE	Tekrarlayan İdrar Yolu Enfeksiyonları
UPEC	Üropatojenik Escherichia Coli
UPEC	Üropatojenik Escherichia Coli
ÜİYE	Üst İdrar Yolu Enfeksiyonları
VF	Virülans Faktörlerine
VÜR	Vezikoüreteral Reflü
YBT	Yersiniabactin
α -EPEC	Atipik Enteropatojenik Escherichia Coli

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 İdrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan alınan idrar numunelerinde enfeksiyon yüzdesi. 45
Şekil 4.2 İYE gruplarına göre bakteri üremesinin dağılımı/ Prevalansı. 46
Şekil 4.3 Cinsiyete göre hastalarda İYE yüzdesi ve dağılımı. 47
Şekil 4.4 Örnek çalışmanın yaşa göre dağılımı. 48
Şekil 4.5 MacConkey agar plağında *E.coli* izolatlarının özellikleri; A) Kontrol MacConkey ortamı (bakteri üremesi olmadan). B) *E.coli*'nin, MacConkey agarında (kendi koleksiyonu) pembe koloniler olarak görüntüsü. 50
Şekil 4.6 A) Kontrol EMB besiyeri (bakteri üremesi olmadan). B) Yeşil metalik parlaklığa sahip E.coli büyümesinin EMB agarda kolonize olması (kendi koleksiyonu). 50
Şekil 4.7 A) Kontrol kanlı agar (bakteri üremesi olmadan). B) *E.coli*'nin, hemoliz bölgeleri oluşturan büyük yassı kolonileri göstermesi. 51
Şekil 4.8 A) Quadrant sürme yöntemi ile kanlı agarda hemolitik aktivite oluşturan E.coli'nin bakteri üremesi. B) E.coli'nin, sürekli (basit) sürme yöntemiyle kanlı agar üzerinde hemoliz bölgeleri oluşturan büyük yassı koloniler göstermesi. 54
Şekil 4.9 Hemolizine göre örnek çalışmanın dağılımı. 55
Şekil 4.10 A) E.coli'nin Muller-Hinton agar üzerinde tek başına Ampisilin (AM) ve Amoksisilin / klavulanik asit (AMC) antibiyotiklerine direnci. B) Muller-Hinton agar üzerinde diğerlerine ek olarak E.coli'nin Ampisilin antibiyotiklerine direnci (kendi koleksiyonu) 56
Şekil 4.11 A) Muller - Hinton agar üzerinde E. coli izolatlarının Ceftriaxone (CRO) antibiyotiklerine karşı yüksek direnci. B) E.coli izolatlarının Muller-Hinton agar üzerinde Ceftriaxone (CRO) antibiyotiklerine orta düzeyde direnci. C) Muller-Hinton agar üzerinde E.coli izolatlarının Ceftriaxone (CRO) antibiyotiklerine duyarlılığı (kendi koleksiyonu). 57
Şekil 4.12 A) E. coli izolatlarının Muller - Hinton agar üzerinde Tetrasiklin (TE) antibiyotiklerine karşı yüksek direnci. B) E.coli izolatlarının Muller-Hinton agar üzerinde Tetrasiklin (TE) antibiyotiklerine orta düzeyde direnci. C) E.coli izolatlarının Muller-Hinton agar üzerinde Tetrasiklin (TE) antibiyotiklerine duyarlılığı. (kendi koleksiyonu). 58
Şekil 4.13 A) E. coli izolatlarının Muller - Hinton agar üzerinde Amikasin (AK) antibiyotiklerine duyarlılığı. B) E.coli izolatlarının Muller-Hinton agar üzerinde Streptomisin (S) antibiyotiklerine duyarlılığı. C) E.coli izolatlarının Muller-Hinton agar üzerinde Gentamisin (CN) antibiyotiklerine duyarlılığı. (kendi koleksiyonu). 59

Şekil 4.14 E.coli'nin Muller-Hinton agar üzerinde Siprofloksasin (CIP) ve Nalidiksik asit (N) antibiyotiklerine duyarlılığı (kendi koleksiyonu). 60
Şekil 4.15 UPEC izolatlarının Antibiyotik Duyarlılığına göre örnek çalışmanın dağılımı. (R: dirençli; I: orta; S: duyarlı) CRO = Seftriakson, AK =Amikasin, CIP=Siprofloksasin, CN = Gentamisin, F=Nitrofurantoin, AM=Ampisilin 60
Şekil 4.16 %1.5 agaroz jel üzerinde Hemoliz Üreten UPEC İzolatlarında virülans toksin genleri (Cnf1, clb ve cdtIII). M: Merdiven, Şerit 1-5: UPEC İzolatları Üreten Hemolisin H22, H33, H40, H48 ve H53..... 62
Şekil 4.17 Hemolizin Üreten UPEC izolatlarında toksin genlerinin (Cnf 1, cdtIII ve clbA) prevalansı. 63
Şekil 4.18 Virülans genlerinin (Hly ve CNF 1) ve hemolizin üreten UPEC izolatı H22'nin hemolizin üreten yalıtlı H61'e kıyasla kontrol olarak hemolizin üreten UPEC izolatıdaki küçük regülatör RNA (RfaH) ekspresyonu. 64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan laboratuvar araç ve gereçleri. 22
Çizelge 3.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler. 23
Çizelge 3.3 Bu çalışmada kullanılan kültür besiyerileri. 24
Çizelge 3.4 Bu çalışmada kullanılan antibiyotik diskler. 34
Çizelge 3.5 Bu çalışmada kullanılan ticari kitler. 36
Çizelge 3.6 Bu çalışmada kullanılan primerler. 36
Çizelge 3.7 PCR programı. 38
Çizelge 3.8 Hly, CNF1 ve RfaH'nin spesifik primerleri, PCR koşulları ve amplikon boyutları. 40
Çizelge 3.9 Sentez tamamlayıcı DNA (cDNA) bileşenleri. 41
Çizelge 3.10 Isı döngüleyici kullanılan koşullar. 41
Çizelge 3.11 PCR programı ve döngü protokolü. 42
Çizelge 3.12 Ana amplifikasyon reaksiyonu bileşeni, konsantrasyonu ve hacmi. 43
Çizelge 4.1 İYE hastalarından alınan *E.coli* izolatlarının biyokimyasal özellikleri. 53

1. GİRİŞ

Üriner sistem böbrekler, mesane, rahim ve üretradan oluşmaktadır (Hidalgo *et al*. 2021). Bu sistem, kırmızı kan hücresi üretimi, osmoregülasyon, kan basıncı ve volüm düzenlemesi, kalsiyum emilimi, toksin metabolizması ve atılım dahil bir dizi fizyolojik süreçten sorumludur (Treuting and Kowalewska 2012, Kamal 2019).

İdrar yolu enfeksiyonlarına (İYE) konakçının üriner sistemindeki bakteri, mantar ve virüsler gibi çeşitli yaygın patojenler neden olur (Segev 2017). Gelişmiş ülkelerde küresel olarak İYE prevalansı %25 oranında artmaktadır (Turyatunga 2021) ve her yıl yaklaşık 150 milyon kişi bir İYE'na yakalanmaktadır (Hasan *et al.* 2021). Enfeksiyonların konumuna göre İYE anatomik olarak üst üriner sistem (böbrekler ve üreterler) veya alt üriner sistem (mesane, üretra, prostat veya vajina) olarak tanımlanır (Tan and Chlebicki 2016, Ozkan *et al.* 2018)

Bakteriyel enfeksiyonlar en yaygın İYE'lerdir. Enfeksiyonlar böbrekler (nefrit), üreterler, mesane (sistit), üretra (üretrit), prostat (prostatit) veya vajina (vajinit) gibi tek bir yerde baskın olmanın yanı sıra böbrek ve epididimle ilgili fasya gibi bitişik yapılarda olabilir (Ejrnæs 2011, Wu *et al.* 2017). Bakteriyel enfeksiyonlar arasında *Escherichia coli (E. coli)*, akut, komplike olmayan toplum kökenli enfeksiyonda izole edilen baskın idrar patojeni (%80) olmaya devam etmektedir ve bunu *Staphylococcus saprophyticus*, Klebsiella, Enterobacter, Proteus ve enterokok türleri izlemektedir (Ronald 2002, Li *et al.* 2020, Adlan *et al.* 2021).

Enfekte idrar yollarından izole edilen *E. coli*, sıklıkla fekal kommensal flora suşları arasında baskın olmayan spesifik özellikler göstermektedir. Bu özellikler, ürotelyal hücreler üzerindeki spesifik reseptörlere bağlanmaya aracılık eden adezyonların ekspresyonunu, hemolizin üretimini, serum direncini, aerobaktin salınımını ve spesifik yüzey antijenlerinin, toksinlerin, demir edinme faktörlerinin, lipopolisakkarit kapsüllerinin ve diğer istilaların varlığını içermektedir (Arthur *et al.* 1989, Kudinha 2017).

P fimbriae, hemolizin, aerobaktin ve sitotoksik nekroz faktör-tip 1 (CNF1), kolibaktin, sitoletal genişleyen toksin (CDT) ve diğerlerini içeren *E. coli*'deki üriner virülans faktörlerinin bu özelliklerini ve prevalansını açıklayan birkaç rapor mevcuttur (Johnson 1991, AL-Oqaili 2020, McCoy *et al.* 2021).

Üriner patojen *E. coli* tarafından salgılanan en önemli virülans faktörü, üst idrar yolu enfeksiyonları ile ilişkili olan ve böbrek komplikasyonlarına yol açan tüm piyelonefrit vakalarının yaklaşık %50'sine neden olan α-hemolizin (HlyA) adlı bir lipoproteindir (Johnson *et al*. 2005, Verma *et al.* 2020). Ayrıca renal epitel hücrelerinde Ca2+ salınımlarının uyarılmasında önemli bir rol oynamış ve IL-6 ve IL-8 üretiminin artmasına neden olmuştur (Eberspächer *et al.* 1989, Porumbel *et al.* 2018).

Ayrıca, hücresel distansiyon toksin (CDT), *E.coli*'nin neden olduğu İYE'lerde bir virülans faktörü olarak da kabul edilir. Çünkü dev mononükleer hücrelerin oluşumunu uyaran ve in vitro G2 fazında hücre döngüsünü bozan DNaz I aktivitesine sahiptir (Tóth *et al.* 2003, Parvez ve Rahman 2018).

Enfeksiyonun ilerleyen safhalarında, toksinlerin, piyelonefrit suşlarının üçte biri tarafından üretilen sitotoksik nekroz faktör tip1 (CNF1) olarak bilinen virülansı arttırdığı görülmektedir. Ayrıca böbrek infestasyonlarında rol oynayabilir (Bien *et al.* 2012). İn vivo olarak, CNF1, mesane hücresi eksfoliasyonuna yol açabilir ve alttaki dokulara bakteri erişimini artırabilir. Bu, idrar yolu enfeksiyonlarını tetiklemek için önemli olabilir (Mills *et al.* 2000, Pokharel *et al.* 2020).

Ek olarak, kolibaktin (Clb), bakteriyel virülans ve mikrobiyal çeşitlilik ile bağlantılıdır. Esas olarak *E. coli* tarafından üretilen doğal bir genotoksik bileşiktir. *İn vivo* olarak, kolibaktinin enfekte ökaryotik hücrelerde DNA çift sarmal kopmalarını, G2 fazlı hücre döngüsü durmasını ve pluripotensi indükleyerek DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Faïs *et al.* 2018, Tang-Fichaux *et al.* 2020)

Ayrıca, bakteri genomu büyük ölçüde keşfedilmemiş düzenleyici işlevlere sahip düzinelerce küçük kodlamayan RNA (sRNA) elementi içermekte olup antibiyotik direnci ve patojenite dâhil olmak üzere çok çeşitli biyolojik süreçleri etkilemektedir (Diallo ve Provost 2020).

Bakteriyel sRNA'lar tipik olarak hedef mRNA'lara diziye özgü bağlanma yoluyla hareket eder. Bu da hedeflerinin değiştirilmiş stabilitesi veya translasyonel baskı/aktivasyonu ile sonuçlanır (Papenfort and Vanderpool 2015). Ayrıca, RfaH'nin tek bir suş içinde birçok virülans faktörünü modüle eden küresel bir düzenleyici olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur (Nagy *et al.* 2002).

hlyCABD operatöründe, RfaH ile hazırlanmış transkripsiyon kompleksleri, hlyA ve hlyB genleri arasında yer alan bağımsız T hly ρ aralayıcıda RfaH aktivitesinin bir sonucu olarak, hlyCABD operatörü, geniş bir intergenik dizi ve cnf1 genini içeren uzun bir transkript oluşturulduğunu göstermiştir (Landraud *et al.* 2003). Bu, cnf1 ifadesinin RfaH tarafından düzenlendiğine dair ilk kanıt olmuştur (Lemonnier *et al.* 2007).

Bu çalışmanın amacı, baskın toksin CNF1'de düzenleyici küçük RNA, RfaH'nin ekspresyon seviyesinin araştırılmasına ek olarak, UPEC izolatlarındaki virülans genlerinin (cnf1, clb ve cdt) hemolisine göre dağılımını belirlemektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 İdrar Yolu Enfeksiyonu (İYE)

İnsan üriner sistemi; üreterler, üretra, mesane ve böbreklerden oluşur (Prasad ve Arora 2021). İdrar yolu enfeksiyonu (İYE), idrarın mikrobiyal kolonizasyonunu ve idrar yolu yapılarının (böbrek üreterleri, mesane ve üretra) yanı sıra perinefrik fasya, prostat ve epididim gibi bitişik yapıların enfeksiyonunu tanımlayan geniş bir terimdir. (Paris *et al.* 2020).

Üst idrar yolu enfeksiyonu ve alt idrar yolu enfeksiyonu olmak üzere iki tip İYE vardır. Alt yol üretra ve mesaneden, üst yol ise böbreklerden oluşur (Singh *et al.* 2019).

Enfeksiyon, idrar yolunun herhangi bir bölümünü eşit olarak etkiler. Ancak alt kısım, çevreye maruz kaldığı için en yaygın olanıdır. Üretra anüse yakın olduğu için, İYE'ye neden olan mikroplar arasında ağırlıklı olarak bağırsak bakterileri baskındır. Sağlıklı insanlarda üretranın üzerindeki idrar yolunun tüm alanları sterildir. Bu nedenle idrar doğal olarak sterildir. (Prasad and Arora 2021).

Enfeksiyon genellikle bakterilerin üretranın açıklığına girip onun içinde çoğalarak idrar yolunun her yerine gitmesiyle oluşur. Üretral enfeksiyona üretrit denir, bakteriler mesaneye girer ve çoğalırsa mesane enfeksiyonuna ve sistite neden olur. Enfeksiyon zamanında tedavi edilmezse bakteri üreteri güçlendirebilir ve böbrekleri enfekte ederek nefrite neden olabilir (Hidalgo *et al.* 2021). İYE'nin açık ara en çok nedeni bakterilerdir. Ancak mantarlar ve virüslerde İYE'ye neden olabilir (Cock *et al.* 2021).

Bakteriyel enfeksiyonlara genellikle *E. coli* (%80-90) veya *Staphylococcus saprophyticus* (%5-10) neden olurken, Enterobacter, Klebsiella, Proteus veya Enterococci türleri nadiren hastane dışı enfeksiyonlara neden olur (Turyatunga 2021, Adlan *et al.* 2021, Segev 2017).

Epidemiyoloji düşünüldüğünde üriner sistem enfeksiyonu sınıflandırmaları esastır. Genellikle, İYE enfeksiyon bölgesine göre sınıflandırılır, ayrıca komplike olmayan (immün sistemi sağlam bireylerin, genellikle hamile olmayan genç kadınların idrar yollarında meydana gelir) veya komplike olan (bağışıklığı baskılanmış veya üretra kateteri de dahil olmak üzere yapısal veya fonksiyonel anormallikleri olan bir idrar yolu genitali olan her yaştan ve cinsiyetten bireylerde görülür) şeklinde kategorize edilebilir (Medina *et al.* 2019, Bonkat *et al.* 2018). Komplike ve komplike olmayan enfeksiyonlar arasında ayrım yapmak önemlidir. Komplike olmayan enfeksiyon, üreter ve mesanenin mukoza zarının bakteriyel kolonizasyonundan sonra bir sistoürerit olayı iken, komplike enfeksiyonlar arasında sıklıkla obstrüktif üropatide ortaya çıkan parankim (piyelonefrit veya prostatit) içeren enfeksiyonlar yer alır (Wagenlehner *et al.* 2020, Zalewska-Piątek *et al.* 2020, Rubini *et al.* 2020)

2.2 Patojenik *Escherichia Coli*'nin Özellikleri

E. coli, enterobacteriaceae ailesinin bir üyesi olup gram negatif, küçük, çubuk şekilli, hareketli ve fakültatif anaerobik bakteridir ve laktozu fermente edebilir (Soltani *et al.* 2018, Iqbal *et al.* 2018, Riley 2020, Ramos *et al*. 2020). Bu bakterinin yaklaşık 2.000 genlik bir çekirdek genomu vardır. Ancak herhangi bir *E. Coli* hücresindeki genlerin yaklaşık yarısı, suşlar arasında önemli genotipik ve fenotipik çeşitlilik gösteren ve çeşitli adaptif yollara izin veren "aksesuar genom"dadır. Bu uyarlanabilirlik, E. Coli'nin ekolojik habitatlarda besin yoksunluğu, optimal olmayan sıcaklıklar, tuzluluk, nem, substrat dokusu, diğer mikroplarla güneş radyasyonu rekabetine maruz kalma ve protozoa tarafından predasyon gibi birçok stresle mücadele etmesini sağlar (Nowicki *et al.* 2021).

Bu bakteri, dünyada üzerinde çalışılan en yaygın bakteri türlerinden biri olmakla beraber tüm model mikroorganizmalar arasında tartışmasız en iyi anlaşılan bakteridir. İnsan ve hayvan ekolojisi bağlamında, bu mikroorganizmalar, doğumdan hemen sonra onları kolonize eden ilk bakteri türlerinden biri olarak, bağırsak simbiyontları olarak yer alır ve *E. coli* suşlarının %90'a kadarı, sıcakkanlı hayvanların ve insanların bağırsak yollarında yaşayan ortak suşlardır (Kotłowski *et al.* 2020).

Kommensal olarak konakçıları ile karşılıklı yarar ilişkisi içinde yaşar ve nadiren hastalıklara neden olur. Bununla birlikte, *E.coli,* insanlarda ve hayvanlarda birçok bakteriyel enfeksiyonun en yaygın nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. İnsanlarda, *E. coli*, insan vücudunun her anatomik bölgesinde hastalığa neden olan ajan olarak tanımlanmış olup apandisit, pnömoni, gastrointestinal enfeksiyonlar, intraamniyotik cilt apseleri, hamile kadınlarda puerperal enfeksiyon, endokardit, septisemi, postoperatif peritonit ve neonatal menenjit ve idrar yolu enfeksiyonu gibi diğer klinik enfeksiyonlara neden olur (Soltani *et al.* 2018, Galindo - Méndez 2020, Ramos *et al.* 2020).

Çiftlik hayvanlarında ishal ile yakından ilişkilidir. Küresel düzeyde, *E. coli,* Salmonella spp. ve Campylobacter gibi diğer ana bakteriyel gıda kaynaklı ajanlarla birlikte ciddi enfeksiyona neden olan en önemli insan patojenleri olarak kabul edilebilir (Ramos *et al.* 2020). Ayrıca, *E.coli* enfeksiyonu toplum kökenli enfeksiyonlara, sağlık hizmeti ile ilgili enfeksiyonlara neden olabilir ve tüm yaş gruplarında hastalığa neden olabilir. (Odongo *et al*. 2020, Galindo-Méndez 2020).

2.3 Patojenik *Escherichia Coli*'nin Sınıflandırılması

Enfeksiyon bölgesine göre genellikle patojenik Escherichia coli suşları Enteropatojenik Escherichia coli (EPEC) ve Ekstraintestinal patojenik Escherichia coli (ExPEC) olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir (Behzadi 2018, Ramos *et al.* 2020).

2.3.1 Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC)

EPEC, Shiga toksinleri ve ısıya dayanıksız veya ısıya dayanıklı enterotoksinler üretemeyen, bağırsak epitelinde yapışma ve yok etme lezyonları üretebilen ishalli *E. coli* suşları olarak tanımlanır (Mare *et al.* 2021).

EPEC'nin en önemli özelliği, bağırsak epitel hücrelerinin yüzeyine sıkıca yapışarak, hücre yüzeylerini bozarak ve sonunda mikrovillilerin silinmesine yol açarak lokalize

lezyonlara neden olmalarını sağlayan A/E lezyonları üretme yeteneğidir. Intimin, bağırsak hücresi bağlanmasına aracılık eden eae geni tarafından kodlanan bir dış zar proteinidir. Bağlanma, intimin için bir reseptör olarak işlev gördüğü konak plazma zarına yerleştirilmiş bir efektör olan Tir (Translokasyonlu intimin reseptörü) tarafından kolaylaştırılır. Bir tip üç salgılama sistemi (T3SS) ile EPEC, konakçı hücrelere çok sayıda (en az yirmi beş) efektör protein enjekte edebilir. A/E lezyonu için gerekli tüm genetik elementler, büyük bir genomik patojenite adası olan enterosit silinmesi (LEE) lokusunda kodlanmıştır (Ochoa and Contreras 2011, Madkour 2017, Mare *et al.* 2021). EPEC, aşağıda gösterildiği gibi birkaç tür içermektedir:

2.3.1.1 Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC)

Çocuk ishalinde en sık gözlenen mikroorganizma ETEC'dir ve ayrıca yolcu ishalinin %30 ila 60'ından sorumludur. Gelişmekte olan ülkelerde yaşayan bireylerin dışkılarında genellikle bu genotipin bulunduğu bildirilmiştir (Huang 2017, Turunen *et al.* 2020, Pakbin *et al.* 2021).

ETEC suşları, ince bağırsağın epitel hücrelerinde sıvı ve elektrolit dengesini bozan ve sulu ishale yol açan enterotoksinleri, ısıya dayanıksız toksini (LT) ve ısıya dayanıklı toksinleri (ST) sentezleyerek aşırı sıvı salgılanmasına neden olur (Begadiya *et al.* 2018, Luna-Guevara *et al.* 2019, Ahumada-Santos *et al.* 2020, Turunen *et al.* 2020, Pakbin *et al.* 2021). Enfeksiyon sulu ishal ile gözlemlenmekte beraber kişiye bağlı olarak seyri, kusma ve yüksek ateş gibi göstergelerin eklenmesiyle normal bir seyirden kolera benzeri atılıma kadar değişebilir (Pakbin *et al.* 2021, Ochen and Atieno 2021).

2.3.1.2 Enteroinvaziv E*scherichia coli* (EIEC)

EIEC suşları bağırsak mukozasında inflamatuar hasara neden olur ve submukozada Shigella tarafından oluşturulanlara benzemektedir. Bu mikroorganizmalar, epitel hücreleri içinde aynı dağılma ve replikasyon yeteneklerine sahiptir (Farajzadeh-Sheikh *et al.* 2020). Enfeksiyonun az gelişmiş ülkelerde EIEC yerleşimi söz konusuyken

gelişmiş ülkelerde nadiren görülmektedir. EIEC'nin kontamine gıdalar yoluyla bulaştığını gösteren kanıtlar vardır (Hassan *et al.* 2021). Ancak klinik olarak, EIEC ile ilişkili sulu ishal, Shigella'nın neden olduğu dizanteriden daha sık görülür (Pakbin *et al.* 2021).

2.3.1.3 Enteroagregatif *Escherichia coli* (EAEC)

EAEC, ishalin giderek daha fazla tanınan önemli bir nedenidir. Çocuklarda, gelişmekte olan ülkelerdeki bağışıklık sistemi zayıf hastalarda ve endemik bölgelere seyahat eden kişilerde şiddetli ishalde görülen gıda kaynaklı bir bağırsak hastalığıdır (Hassan *et al.* 2021). EAEC enfeksiyonu, ince ve kalın bağırsağın mukozal yüzeylerinin agrega yapışmasının kolonizasyonu ile başlar. Bunu biyofilmlerin oluşumu, inflamatuar yanıtın indüklenmesi ve toksinlerin salınması izler (Hebbelstrup *et al.* 2014). Bu patolojik paternler, en son tanınan ishale neden olan Escherichia coli'dir. Hem sanayileşmiş hem de sanayileşmemiş ülkelerde ETEC'den sonra yolcu ishalinin en yaygın ikinci nedenidir. Bu organizma ayrıca kronik ishal ile ilişkilendirilmiştir. EAEC'nin neden olduğu ishal düzenli olarak suludur ancak buna mukus veya kan da eşlik edebilir (Hassan *et al.* 2021).

2.3.1.4 Dağınık yapışkan *Escherichia coli* (DAEC)

DAEC, HeLa ve HEp-2 hücrelerinde yaygın bir yapışma paterni oluşturan çeşitli bir gruptur ve küçük çocuklarda tekrarlayabilen sulu ishalin, hem gelişmekte olan ülkelerde hem de gelişmiş ülkelerde ve tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonlarının sorumlusu olarak kabul edilmiştir (Javadi *et al.* 2020). DAEC ile ilişkili ishalin göreceli riskinin, 18 aylıktan 5 yaşına kadar olan çocukların yaşıyla birlikte arttığı ortaya çıkmıştır. Bu grubun bağırsak taşıyıcılığının daha büyük çocuklarda ve yetişkinlerde daha yaygın olduğu da bulunmuştur (Natarajan *et al.* 2018; Ocampo, *et al.* 2021). Bozulmayı hızlandıran proteinlere bağlanarak bağırsak epitelini bozar. Bazı DAEC suşları, Üropatojenik *E. coli* (UPEC) suşlarında bulunan virülans faktörlerini içermektedir (Ekici and Dümen 2019).

2.3.1.5 Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC)

EHEC, bir veya daha fazla Shiga toksini (STEC) ve Shiga benzeri toksinler (VTEC) olarak bilinen verositotoksinler üretebilen, enterohemorajik *E. coli* veya EHEC olarak adlandırılan birkaç suşun ilkidir. EHEC, çocuklarda akut böbrek yetmezliğinin zorunlu bir etkisi olan diyare, hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom (HUS) arasında değişen gastrointestinal semptomlar gibi çok çeşitli klinik semptomlara sahiptir. EHEC, hastalık şiddetine göre gıda kaynaklı patojenler arasında en şiddetli *E. coli* suşu olarak görülmektedir (Derakhshan *et al.* 2019, Fatima and Aziz 2020). EHEC salgınlarında rol oynayan en önemli serotip *E. coli* O157:H7'dir (Pakbin *et al.* 2021).

2.3.2 Eksraintestinal patojenik *Escherichia coli* (ExPEC)

Ekstraintestinal *Escherichia coli* (ExPEC), ayaktan hastalarda idrar yolu enfeksiyonlarının (İYE) %80'inden sorumlu fakültatif patojenlerdir. ExPEC enfeksiyonu, hastane idrar yolu enfeksiyonlarının önemli bir kısmına (%50) yol açar ve apselerin önde gelen nedenidir. Yenidoğanlarda menenjit, bakteriyemi, zatürree ve cerrahi alan enfeksiyonlarının yanı sıra bağırsak dışındaki başka yerlerdeki enfeksiyonların %30'undan sorumludur (Desvaux, *et al.* 2020, Sora *et al*. 2021). ExPEC, bir konakçının mukoza zarını istila etmesine, kolonize etmesine ve gastrointestinal (GI) sistem dışındaki vücut bölgelerinde hastalığa neden olmasına izin veren virülans özelliklerine sahiptir (Sarowska, *et al.* 2019, Smith, *et al*. 2007). Genellikle, virülans faktörleri ya hastalıklara neden olan yerlerde bulunan bakteri kromozomu üzerinde veya plazmitler (Dale and Woodford 2015), adezyonlar (papC, F10papA, sfaDE, afaBC III, iha, fimH, clpG, tsh ve hra); invaziv (ibe10); kapsüller (K1, K5, kpsMT II, kpsMT III); sideroforlar (iroN, fyuA, ireA); demir ayırma sistemleri (iucD, irp2 ve chuA); toksinler (ompT, ehxA, espP, hlyA, hlyD, vat, sat, cnf 1); ve diğer çeşitli faktörleri (iss, usp, traT, malX, cvaC ve H7 fliC) de içeren plazmitlerde kodlanır (Hossain *et al.* 2020, Valiatti *et al.* 2020, Nascimento *et al.* 2021). Bu ExPEC patotipi, konakçı tür veya kuşlarda kolibasilloza neden olan Avian Escherichia coli (APEC), Üropatojenik Escherichia Coli (UPEC), sepsise neden olan sepsis Escherichia Coli (SPEC) ve Escherichia Coli'ye Neden Olan Yenidoğan Menenjiti (NMEC) dâhil olmak

üzere izole edildiği hastalık tarafından adlandırılan birkaç alt patotipe sahiptir (Nielsen, *et al*. 2020, Meena, *et al*. 2020).

2.3.2.1 Septisemi ile ilişkili *Escherichia coli* (SEPEC)

Kan dolaşımında *E. coli*'nin varlığı, daha yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkili olan sepsise yol açan güçlü bir konakçı inflamatuar yanıtını indükleyebilir (Owrangi *et al.* 2018, Daga *et al.* 2019). Kan dolaşımında, SEPEC, kompleman ve fagositozun bakterisidal aktivitesinden kaçmalarına izin veren yüzey yapıları ve efektörler aracılığıyla kendilerini bağışıklık sisteminden korur. Bu direnç, yüksek derecede bakteriyemiyi indükleyen bir faktördür (Owrangi *et al*. 2018, Desvaux *et al.* 2020).

2.3.2.2 Yenidoğan menenjiti *Escherichia coli* (NMEC)

İnsanlarda NMEC, %12'lik bir ölüm oranıyla bakteriyel menenjit vakalarının yaklaşık %28 ila 29'undan sorumludur (Nielsen *et al.* 2020). Bakteriler, beynin mikrovasküler endotelyal hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak kan-beyin bariyerini geçebilirler. NMEC patogenezi için kritik kabul edilen şaperon yolağı (CUP) pili, özellikle tip 1 pili, beynin epitel tabakasına bağlanmaya aracılık eder ve in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterildiği gibi biyofilm oluşumu için kritiktir. NMEC'de, dış zar proteini A (Omp A), beyin mikrovasküler epitel hücrelerinin bakteri istilasında bir başka önemli virülans faktörüdür (Breland *et al.* 2017). NMEC, makrofajları kan-beyin bariyerini geçmek için kullanarak da istila edebilir (Wang *et al.* 2016, Geslain *et al.* 2019).

2.3.2.3 Kuş Patojeni *Escherichia coli* (APEC)

APEC, genellikle hastane enfeksiyonları ve toplumla ilişkili enfeksiyonlar ve kümes hayvanlarında kolibasilloza neden olan ajan ile bağlantılı olan insan dışı ExPEC'in bir alt patotipidir (Kathayat, *et al.* 2021, Sarowska *et al*. 2019).

Kolibasilloz, hemorajik septisemi, kolispetisemi, hava kesesi hastalığı, şişmiş kafa sendromu, kolon polipi, peritonit veya enterit gibi lokal veya sistemik enfeksiyonlara neden olabilir (Kathayat *et al.* 2021, Khoo *et al.* 2010). APEC duyarlılığını artırabilecek faktörler arasında virüsler, bakteriler veya parazitler ile birlikte enfeksiyon veya aşırı kalabalık, yetersiz havalandırma veya kirli su gibi kötü çevre koşulları yer almaktadır (Nielsen *et al.* 2020). Genetik kriterlere göre, APEC suşunun patojenitesi, en az beş virülans geninin bulunmasıyla belirlenir. Bu genler arasında demir edinme genleri (iucD, iroN), yapışma genleri (tsh), toksin genleri (vat, hlyF), serum direnç genleri (iss), temizlik proteazları (ompT) ve ColV Operon genleri (cvi/cva) yer almaktadır (Johar *et al.* 2021).

2.3.2.4 *Üropatojenik Escherichia coli* (UPEC)

UPEC, ExPEC'in en yaygın patolojik türü olup toplumda idrar yolu enfeksiyonlarının (İYE'ler) önde gelen nedeni olarak kabul edilir (Breland *et al.* 2017, Derakhshan *et al.* 2019). UPEC suşları büyük bir genetik çeşitliliğe sahip olmakla beraber bu suşlar spesifik genler tarafından kodlanan yeni virülans özellikleri kazanarak patojenik hale gelirler. Virülans genleri, bulaşıcı genetik elementler (plazmit) ve/veya kromozomlar üzerinde bulunur ve bunların konakçı mukozal yüzeyleri kolonize etmelerine ve bağışıklık sistemi kuvvetli hastalarda bile doğal olarak steril idrar yollarını istila etmelerine olanak tanır (Behzadi 2018).

UPEC suşları, hastalığa neden olan çeşitli savunma mekanizmalarının üstesinden gelme yeteneklerine katkıda bulunan çok çeşitli virülans faktörlerini ve spesifik genleri ifade etmektedir. Gerçekten de, UPEC, farklılaşmış yüzey hücreleri, daha az olgun ara madde ve bazal epitel hücreleri gibi mesane ürotelyumunun tabakalı katmanlarını oluşturan bazı konakçı hücre tiplerini atlatabilir (Pluta 2021). Konakçı hücre istilası, UPEC'nin idrar yolu içinde hem kurulması hem de sürdürülmesi ile kolaylaştırılır (Olson *et al.* 2018, Peerayeh *et al.* 2018, Rubini *et al.* 2020).

2.4 UPEC’nin Virülans Faktörleri

Birkaç UPEC suşu, konak istilasını ve kolonizasyonunu, konak savunma mekanizmasının bozulmasını veya önlenmesini, konak dokularının enfeksiyonunu ve/veya zararlı bir konak inflamatuar yanıtının uyarılmasını kolaylaştıran bir dizi bilinen virülans faktörünü (VF)'leri içermektedir (Guiral Vilalta 2018, Owrangi *et al*. 2018, Sarowska *et al.* 2019).

Yapıştırıcılar, toksinler, salgı sistemleri, demir alıcı faktörler, lipopolisakkaritler, kapsid polisakkaritler ve istilalar gibi çok çeşitli VF'ler, normalde plazmitler veya diğer mobil genetik elementler üzerindeki patojenik adalarda (PAI'ler) kodlananlar, virülans faktör genleri (VFG'ler) tarafından etiketlenen UPEC'nin patolojik koşullarıyla kesinlikle ilişkilidir (Guiral Vilalta 2018, Aljebory *et al.* 2019, Sarowska *et al.* 2019).

E. coli'nin en önemli virülans faktörleri temel olarak bakteri hücre yüzeyi virülans faktörü ve salgılanan virülans faktörü olmak üzere iki gruba ayrılabilir (Shah *et al.* 2019).

2.4.1 Bakteriyel hücre yüzeyi virülans faktörü

En yaygın bakteri hücre yüzeyi virülans faktörleri, esas olarak tip 1 fimbria ve P fimbria gibi fimbriaları içermektedir. Bu fimbrialar, konakçı hücre yüzeyine tutunmaya, doku invazyonuna, biyofilm oluşumuna ve sitokin indüksiyonuna yardımcı olur (Shah *et al.* 2019). Bakteri hücre yüzeyi virülans faktörü ayrıca flagella, kapsüler lipopolisakkaritler ve dış zar proteinlerini içermektedir (Ejrnæs 2011). Örneğin, bir biyofilm şu anda kendi kendini üreten bir matrise gömülü ve abiyotik veya canlı bir yüzeye bağlı yapılandırılmış bir bakteri topluluğu olarak tanımlanmaktadır. Biyofilm matrisi, nemli bir viskoz tabaka oluşturan ve kapalı bakteri hücrelerini dehidrasyondan, antibiyotikler gibi toksik moleküllerden ve konakçının bağışıklık sisteminden koruyan ekzo-polisakkaritlerden oluşmaktadır (Kot 2017). Biyofilmlerdeki bakteriler, planktonik bakterilerden farklı bir fenotiple sonuçlanan gen ekspresyonunda farklılık gösterir.

Bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneği, çeşitli hastalıklara neden olmasıyla ilişkilidir. İnce biyofilmlerin oluşumu, antimikrobiyal tedavi ile yok edilmesi zor olan kronik ve kalıcı enfeksiyonlara neden olur (Zamani and Salehzadeh 2018). *E. coli* tarafından biyofilm oluşumuna çeşitli faktörler, örneğin tip 1, kıvrımlı fimbria ve flagella katkıda bulunur. Biyofilmlerin insan enfeksiyonlarının %60'ında meydana geldiği düşünülmektedir. UPEC, mesane dokularında alttaki epitel hücrelerinde kalabilir veya tekrarlayan sistitte biyofilm benzeri boynuzlar oluşturabilir. *E. coli*'nin biyofilmi üretra üzerinde oluşabilir ve kateterler veya protezler gibi biyomateryallerle ilişkili enfeksiyonlarla ilişkilendirilebilir (Ponnusamy *et al.* 2012, Kot 2017).

2.4.2 Salgılanan virülans faktörü

UPEC, patojenik olmayan ortaklarıyla karşılaştırıldığında, patogenez sırasında kendisine yardımcı olan virülans faktörlerini kodlayan ek genler içerir. Sinyal iletim yollarını tetikleyen yüzey yapılarından çok daha fazlası, şaşırtıcı çeşitlilikteki temel ökaryotik süreçleri etkileyen salgılanan toksinler ve diğer efektör proteinlerdir. Toksin salgılayabilen en önemli virülans faktörleri α-hemolizin (HlyA), nekrotizan faktör 1 (CNF1), kolibaktin (Col), sitoletal distansiyon toksini (CDT) ve diğerleridir (Kaper *et al.* 2004, Ejrnæs 2011, Sarowska *et al.* 2019).

2.4.2.1 Hemolizin (Hly)

α-hemolizin, UPEC patogenezinde gözenekten oluşmuş prototip toksinidir. Hemolizin üretimi, piyelonefrit hastalarının UPEC suşlarında (%49) daha yaygın olarak bulunmuş, bunu sistit izlemiş ve ekspresyonu, oksijenasyon, sıcaklık ve ozmolalite dâhil olmak üzere birçok çevresel uyaran tarafından düzenlenmiştir (Nhu *et al.* 2019). Hemolizin üretimi ile üriner patojenlerin invaziv suşları arasında bir ilişki tespit edilmiştir. Artan miktarda alfa-hemolizin içeren UPEC suşları, hemolitik olmayan suşlara kıyasla insan serumunun tamamlayıcı etkisine karşı daha dirençlidir veya daha az miktarda hemolizin üretir (Kudinha 2017, Etefia *et al.* 2020).

α-hemolizin, NFκB sinyal yolunun yanı sıra proinflamatuar mediatörleri kodlayan genlerin ekspresyonunu ve proinflamatuar sitokinlerin ve kemokinin üretimini ve salgılanmasını azaltan konakçı hücre biyolojik süreçlerinin birçok yönünü düzenler. Ayrıca, UPEC, HlyA'nın eylemi yoluyla p65 bağlanmasını bozarak NFκB sinyalini bozabilir (Zhang *et al.* 2021).

Operon hlyCABD hemoliz fenotipinden sorumludur. HlyC, Lys564 ve Lys690 kalıntılarına asil grupları ekleyerek HlyA'yı ulusötesi olarak değiştiren bir asil-transferazı kodlar. Modifiye edilmiş HlyA ise olgunlaşır ve sitotoksik ve litik aktiviteler gösterir. HlyB ve HlyD, genetik olarak ilgisiz Tol C ile birlikte, iç ve dış zarlar boyunca HlyA salgılanmasını sağlayan bir tip I salgılama aparatı oluşturur (Nhu *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2021).

Hemoliz, çeşitli konsantrasyonlarda farklı işlevler gerçekleştirir (Gu *et al*. 2021). Daha yüksek konsantrasyonlarda (litik), hemolizin, kırmızı kan hücreleri, epitel hücreleri ve lökositler dâhil olmak üzere çeşitli konakçı hücre tiplerinin zarlarında gözenekler oluşturabilir. UPEC'nin bağışıklık hücrelerine zarar vermek için mukozal bariyerleri geçmesine ve bakterilerin konakçılar için besinlere erişmesine neden olmasına yardımcı olur. Öte yandan, daha düşük konsantrasyonlarda (sublitik) ya hücre fonksiyonlarını değiştirebilir ya da bağışıklık hücreleri (nötrofiller ve T lenfositler) ve böbrek hücreleri (böbrek hücreleri ve mesane epitel hücreleri) dâhil olmak üzere hücre ölüm yollarını indükleyebilir ve sonunda pul pul dökülmeye yol açabilir. UPEC suşu UTI tarafından üretilen sublitik hemolizin dozları, konakçı proteazları, özellikle mezotripsini aktive edebilir, bu durum da paxillinin bozulmasına yol açar ve ardından konakçı hücre zarına zarar verir (Schulz *et al.* 2021, Zhang *et al.* 2021).

Ayrıca hemolizin, UPEC sekestrasyonuna ve konak hücre tipine bağlı olarak piroptoz, apoptoz ve nekroz yolakları ile hücre ölümüne neden olabilir (Nhu *et al.* 2019).

Histon benzeri nükleer yapısal protein H-NS, hemolizin dâhil olmak üzere UPEC virülansla ilgili birçok genin transkripsiyonunu kontrol eder. H-NS'nin hlyCABD genlerinin transkripsiyonunu düzenlediği bulunmuştur. Strese tepki veren ve çevresel

uyaranları algılayan diğer düzenleyici CpxR, hemolizin üretimini negatif olarak düzenler (Nhu *et al.* 2019). İYE bağlamında, hemolizin işlevi, farelerde ve insan mesane organellerinde ürotelyal hücrelerin soyulmasının yanı sıra insan mesane epitel hücreleri ve peritoneal makrofajlardan pro-inflamatuar sitokin interlökin-6'nın (IL-6) inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir. Son zamanlarda, hemolizinin NOD benzeri reseptör pirin alanı içeren 3 (NLRP3) iltihaplanmasını aktive ettiğini ve makrofaj hücre ölümüne yol açtığını göstermiştir (Verma *et al.* 2020, Zhang *et al*. 2021). HlyA, böbrek epitel hücrelerinde Ca^{2+} dengesizliğine neden olur, ardından enflamatuar sitokinler IL-6 ve IL-820'nin sentezini takip eder. UPEC a-hemolizinin, sıçan Sertoli hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyona neden olan kalsiyum akışına bağlı bir şekilde mitokondriyal dinamikleri değiştirdiği gösterilmiştir (Parvez and Rahman 2018, Etefia *et al.* 2020, Verma *et al.* 2020).

Virülans faktörü HlyA, azalan asetil-CoA seviyeleri ve anormal histon deasetilasyonu ile sonuçlanan ACLY fosforilasyonunun inhibisyonundan sorumludur. Ayrıca, enfekte hücrelerde azaltılmış H3K9ac seviyesi, p65'in promotör bölgeye bağlanmasını bozarak, IL-8 dâhil olmak üzere düzensiz bir enflamatuar genin ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bu etkiler, düşük asetil-CoA seviyeleri tarafından yönlendirildiğinden, asetat arttırıcı ile UPEC aracılı takviye, p65 bağlanmasını kolaylaştırmak için promotör bölgesinde H3K9ac'ı artırarak IL 8 ekspresyonunu bastırmıştır (Zhuge *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2021).

2.4.2.2 Sitotoksik nekrotizan faktör (CNF1)

UTI'lere dâhil olan *E.coli* suşları, ekzotoksin olarak sıklıkla sitotoksik nekroz faktör tip 1 (CNF1) üretir. CNF1, *E. coli*'nin (UPEC) kalıtsal ishal ve üropatojenik suşlarının belirli suşlarında bulunan bir ~115-kDa sitoplazmik proteindir (Sora *et al.* 2021). CNF1 proteini, yaklaşık olarak 1014 amino asitten oluşan 3,042 baz çifti geni tarafından kodlanır. Ekzotoksinleri ve kolonizasyon faktörlerini kodlayan genler, kromozomal DNA'nın patojenite adaları (PAI'ler) adı verilen bir bölgesinde bulunur. PAI V, alfa-hemolizin (Hly) operonu ile Pap (prs) ile ilgili adezyon kodlayan genler arasında yer alan *cnf1* genini içermektedir. CNF1- üretmek için hemen hemen tüm E. coli suşları,

cnf1 geni yukarı akışında alfa-hemolizin (hly) genini içermektedir (Michaud *et al.* 2017, Soltani *et al.* 2018).

CNF-1 üretimi, idrar yolu hastalıklarının patogenezinde artan virülans ile ilişkilidir ve ayrıca konağın inflamatuar yanıtını da artırabilir. Spesifik olarak, (Elliott *et al.* 1998), bir enfeksiyon ishal modelinde CNF-1'in ödem ve nekrozu tetiklediğini ve tavşan bağırsağında iltihaplanma ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. İnsan nötrofillerinin CNF-1-pozitifleri öldürmede CNF-1-negatif bakterilere göre daha az etkili olduğu gözlemlenmiştir (Mills *et al.* 2000, Kudinha 2012, Kudinha 2017).

Bununla birlikte, birkaç *in vitro* ve *in vivo* çalışma, bu proteinin polimorfik fagositozu engellediğini ve mesane epitel hücrelerinin ölümünü uyardığını ve mesane hücrelerinin pul pul dökülmesine ve alttaki dokulara bakteri erişiminin desteklenmesine yol açabileceğini göstermiştir (Parvez and Rahman 2018, Soltani *et al.* 2018).

2.4.2.3 Kolibaktin (clb)

Siklomodulinler, tümör oluşumuna katkıda bulunan hücre döngüsünü değiştiren toksinlerdir. Bu toksinler genellikle Gram negatif bakteriler tarafından üretilir. Bunlardan dördü sitoplazmik distansiyon toksin (CDT), sitotoksik nekrotik faktörler (Cnfs), döngü inhibe edici faktör (Cif) ve kolibaktin *E. coli* türleri tarafından üretilir (Mezerová *et al.* 2021).

Kolibaktin ilk olarak 2006 yılında, kültürlenmiş hipertrofik HeLa hücrelerinin birikmiş dsDNA'sı ile ExPEC'in bakteriyel hücre süspansiyonlarına ve 1917 kommensal *E. coli Nissle* suşuna geçici olarak maruz kaldıktan sonra kırılmasıyla keşfedilmiştir. Bu sitopatik etki, yalnızca temasa bağlı olduğundan ve bakteriyel filtrasyonla kaybolduğundan CDT, Cif veya alfa-hemolizin tarafından indüklenenden farklıdır (Morgan *et al.* 2019).

E. coli'nin kolibaktin üreten (clb) suşlarının çoğu, sıklıkla kommensal enterik suşlar olarak gözlenen filogenetik grup B2'ye aittir. Bu clb *E. coli* suşlarının kolorektal karsinogenezde rol oynadığından şüphelenilmektedir. Ayrıca ailesel adenomatöz polipozisli hastaların mukozasında clb *E. coli* prevalansı kolorektal kanser hastalarınınkine eşdeğerdir (Kurnick *et al.* 2019).

Kolibaktinin salgılanma mekanizması ve kimyasal sentezi tam olarak aydınlatılamamış olsa da, clb *E. coli* hücreleri ile ökaryotik hücreler arasındaki doğrudan temas, kolibaktin kaynaklı G2/M hücre döngüsü durması ve/veya megakaryosit oluşumu için esastır (Yoshikawa *et al.* 2020).

Patojenite adası spks, ribozomal olmayan bir poliketid polipeptidi (PK-NRP) için biyosentetik makineleri kodlar. Pks adasının transkripsiyonel analizi sonucunda, 2 tanesi adanın çoğunluğunu kapsayan 7 büyük transkripsiyonel birime bölündüğünü tespit edilmiştir. Birinci transkripsiyonel birimler, clbI'den clbN'ye 6 gen içerirken, ikincisi clbC'den clbG'ye 5 gen içermektedir. Bu transkriptler tarafından kodlanan beş Clb, yani Clb A, M, Q, L ve P, parçalanmasında ve etki yerine taşınmasında rol oynayan kolibaktinin aktivitesi için gereklidir (Kurnick *et al.* 2019, Morgan *et al.* 2019).

2.4.2.4 Sitoletal Distansiyon toksin (CDT)

Sitoletal Distansiyon toksin (CDT), bir hedef hücrenin DNA'sına zarar vermek için benzersiz bir özelliğe sahip, ısıya dayanıklı bir ekzotoksindir. İlk olarak 1987'de patojenik *E. coli*'de rapor edilmiştir (Flores-Encarnación *et al.* 2019). CDT, kromozomda yer alan sırasıyla cdtA, cdtB ve cdtC genleri tarafından kodlanan CdtA, CdtB ve CdtC proteinleri ve büyük bir konjugatif plazmit üzerinde yer alan bir operon tarafından kodlanan EcolCdtB-III olmak üzere üç proteini kodlayan bir operon ürünüdür (Soltani *et al.* 2018). Bu genler cdt aktivitesinden sorumludur. Bu toksini üreten farklı bakteri türleri arasındaki cdtA, cdtB ve cdtC genleri değişken dizi homolojisi gösterir. Aynı tür içinde bile *E. coli*'de birkaç CDT tanımlanmıştır. CdtA ve CdtC alt birimleri en farklı genler tarafından kodlanırken, CdtB alt birimi en çok korunan gen tarafından kodlanır (Kurnick *et al.* 2019, Fabian *et al.* 2020, Zeb *et al.* 2021).

Bu toksin, G1 veya G2 hücre döngüsünü durdurma ve İYE'lerin patogenezine katkıda bulunma yeteneğine sahiptir. Ayrıca DNaz I benzeri enzimatik aktiviteye sahiptir ve DNA'ya saldırırken, diğer bakteriyel toksinler hücre zarına veya sitoplazma içindeki çeşitli hedeflere saldırır. Bu benzersiz DNA'ya saldıran özellik, hedef hücrenin DNA'sına zarar vererek hücre ölümüyle sonuçlanan ilerleyici hücre şişmesine neden olur (Parvez and Rahman 2018, Kurnick *et al.* 2019, Fabian *et al.* 2020).

Katalitik alt birim CdtB, türler arasında çok korunur ve DNase I benzeri aktivite yoluyla tek ve çift DNA kırılmalarına neden olur. Bu durum, ATM kinaz yoluyla bir DNA hasar yanıtını tetikleyerek G2/M ve G1/S hücre döngüsü durmasına neden olur. CDT, bağırsak bakteri kolonizasyonunu ve pro-inflamatuar tepkileri arttırır ve bağışıklık tepkisinin düzensizliğine yol açar. HeLa hücrelerinin in vitro olarak CDT ile tedavisi, hücresel regülasyona ve çoklu çekirdeklenmeye neden olur (Flores-Encarnación *et al.* 2019, McCoy *et al.* 2021).

2.5 Bakterilerde Küçük Kodlamayan RNA'lar

Küçük düzenleyici RNA'lar (sRNA'lar) tipik olarak 50 ila 500 nükleotit (nt) arasındadır. Bunlar kodlama dizisinin yanında, intergenik bölgelerde ve transkripsiyonlu antisens RNA'lar olarak 5' ve 3' çevrilmemiş bölgelerde (UTR'ler) bulunabilir veya açık okuma çerçevesinin (ORF) karşı şeridinde bunlarla örtüşebilir (Shi *et al.* 2009). sRNA'lar, transkripsiyonel hedef genleri düzenleyen veya mRNA hedeflerine tamamlayıcı baz eşleşmesi yoluyla bakteriyel RNA polimeraz holoenzim gibi protein fonksiyonlarını modüle eden global bakteriyel gen ekspresyonunun anahtar düzenleyicileridir. Dolayısıyla sRNA'lar, ribozomlar ve ribonükleazlar gibi kompleksler aracılığıyla mRNA stabilitesini ve translasyon verimliliğini etkiler (Van Assche *et al.* 2015, Arrieta-Ortiz *et al.* 2020, Trinquier *et al.* 2020, Taggart *et al.* 2021).

sRNA'lar hedeflerinden bağımsız olarak ifade edilir ve aşağıdaki gibi cis- veya trans-kodlanmış sRNA'lar olarak ayırt edilir (Oliva *et al.* 2015):

1. Antisens RNA'lar olarak da adlandırılan cis kodlu sRNA'lar, hedef genlerinin zıt yönünde kopyalanır ve sonuç olarak hedeflerine tam olarak tamamlayıcıdırlar. Sıklıkla yaygın olan antisens transkripsiyonunun anlamlı bir yanıtı mı yoksa sadece transkripsiyonel durumu mu yansıttığı konusunda devam eden bir tartışma olsa da (Llorens-Rico *et al.* 2016), antisens RNA'ların hedef transkriptler ile dubleks oluşumu yoluyla çok sayıda fizyolojik etkiye aracılık ettiği açık hale gelmiştir (Georg and Hess 2011).
2. Trans-kodlanmış sRNA'lar, kısmi tamamlayıcılık yoluyla, baz eşleştirmesi yoluyla uzaktan kodlanmış hedef RNA'ları düzenler. Ancak başka mekanizmalar da bilinmektedir (Storz *et al.* 2011). Trans-kodlanmış sRNA'lar, aktivite ve fonksiyon için genellikle Hfq, ProQ ve CsrA gibi proteinlere muhtaçtır (Van Assche *et al.* 2015, Smirnov *et al.* 2016).

Gram negatif bakterilerde Hfq, sRNA/hedef RNA dupleks oluşumunu hızlandırır. Böylece hedef RNA'nın translasyonunu, bozulmasını veya transkripsiyonunu modüle eder (Vogel and Luisi 2011, Updegrove *et al.* 2016). Hfq ve CsrA, çok sayıda aynı kökenli sRNA'nın aktivitesi için gerekli olduğundan, bunların inhibisyonunun, virülansla ilgili çoklu süreçleri kontrol eden sRNA ağlarını aşağı regüle ettiği gösterilmiş ve bu durum da sonunda bakterileri yalnızca enfektif değil aynı zamanda antibiyotiklere karşı daha duyarlı hale getirebilmiştir (Yamada *et al.* 2010, Oliva *et al.* 2015, Mühlen and Dersch 2015).

Küçük kodlamayan RNA'lar, hedeflerini aşağıdakiler dâhil olmak üzere farklı mekanizmalar aracılığıyla kontrol etmektedir (Ma *et al.* 2013):

a) Ribozom bağlama bölgesinin (RBS) doğrudan bloke edilmesiyle veya RBS'nin aşağısında yapısal değişikliklerin indüklenmesiyle meydana gelebilen translasyonel inhibisyon.
b) Hem cis- hem de trans-etkili RNA'ların RNA bozunmasını destekleyebildiği mRNA stabilitesinin değiştirilmesi.

c) Düzenleyici RNA/protein etkileşimi yoluyla protein sekestrasyonu, böylece çok sayıda aşağı akış etkisinin indüklenmesi.
d) DNA ile etkileşim (CRISPR-RNA, Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar-RNA).
e) Riboşalterler, yani metabolitleri veya çevresel ipuçlarını bağlayan düzenleyici RNA'lar

2.6 Escherichia Coli'de RfaH

RfaH, UPEC'de virülansın çeşitli belirleyicilerini düzenleyen bir anti-transkripsiyonel antagonisttir (Bailey *et al.* 1997, Mellies *et al.* 2006). RfaH düzenlemesinin mekanizması, bu proteinin α-hemolizini kodlayan hlyCABD operatöründe nasıl etki ettiği ile anlaşılabilir. RfaH proteini, hlyCABD operonunda hlyA ve hlyB genleri arasında bulunan Rho'dan bağımsız aralayıcı da etki eder. Sonlandırıcı, transkripsiyon üzerinde polar bir etkiye sahiptir. Bu da hlyCA transkripsiyonu ile sonuçlanır. Ancak hlyCABD transkriptinin minimal bir ifadesidir. RfaH, Rho'dan bağımsız terminalde sonlandırmayı engelleyerek, HlyA toksin salgılaması için gereken hlyBD içeren transkriptin üretimini arttırır (Bailey *et al.* 1996, Leeds *et al.* 1997).

RNA haberci stabilitesi, kesik ve tam uzunluktaki transkriptin homeostazında rol oynar ve RfaH ayrıca hly promotöründe transkripsiyonu arttırır (Welch *et al.* 1988, Mellies *et al.* 2006). Artan İYE modelinde, 536 suşundaki rfaH geninin silinmesi, virülansı önemli ölçüde azaltmış, serum direncini ortadan kaldırmış ve mesane ve böbrekten kurtarılabilen bakteri sayısını azaltmıştır. Böylece *rfaH* geninin inaktivasyonu, bakterinin üst idrar yolunu kolonize edememesine neden olmuştur. *RfaH* fonksiyonunun kaybı, lipopolisakkarit fenotipini değiştirmiş ve K-15 kapsülünün yanı sıra α-hemolizinin ekspresyonunu azaltmıştır (Nagy *et al.* 2001, Nagy *et al.* 2002).

CNF1 toksini, hlyCABD operatörünün aşağı akışında kromozomal olarak kodlanır, 943-bp gen dizisiyle ayrılır ve RfaH tarafından düzenlenir (Landraud *et al.* 2003). CNF1 toksini ve α-hemolizinin yukarı regülasyonu (Blanco *et al.* 1992, Landraud *et al.* 2000), araştırmacıları cnf1 transkripsiyonunun yukarı akıştaki hly promotörüne bağlı olup

olmadığını sorgulamaya yöneltmiştir. Gerçekten de, *cnf1* transkripsiyonu, hly promotör aktivitesi gerektirmiş ve transkriptini üretmek için RfaH antagonistine muhtaçtır. RfaH'nin müdahaleci inaktivasyonu, homozigot ebeveyn suşu J96 ile karşılaştırıldığında sitoplazmik CNF1 seviyelerinde 100 kat azalma ile sonuçlanmıştır. Transkripsiyon sonrası düzenlemenin ikinci türü, CNF1'in ifadesini kontrol eder. Translasyonel cnf1-lacZ füzyonları, silme yapıları ve bölgeye yönelik mutajenez kullanılarak, 45 ila 48 kodonları ve kontrol CNF1 sentezi içinde bir anti-floresan-Dalgarno dizisi tanımlanmıştır (Landraud *et al.* 2003). Baskılama, hlyCABD *cnf1* transkriptinin, *cnf1* ribozomal bağlanma bölgesinin translasyonunu engellemek için bir ilmek yapısı oluşturduğu, geri kat inhibisyon (fbi) mekanizması ile gerçekleşir. Kanıtlar ayrıca cnf1 geninin yukarısında yer alan promotörün FBI mekanizması tarafından bastırıldığını göstermektedir (Fabbri *et al.* 1999).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyaller

3.1.1 Araç ve gereçler

Bu çalışma boyunca kullanılan ana araç ve gereçler Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan laboratuvar araç ve gereçleri.

Araç/Gereçler	**Firma/Menşei**
Otoklav	Rayap/ İspanya
Benson brülörü	Membrane/ Almanya
Santrifüj	GFL/ Almanya
Dijital kamera	I phone 6s/ ABD
Jel elektroforez aparatı	BIO-RAD/ İngiltere
Davlumbaz dolabı	Memmert/ Kore
kuluçka makinesi	Memmert/ Almanya
Işık mikroskobu	Olympus/ Japonya
Mikrosantrifüj	Fison/ İngiltere
Mikro spin Santrifüj	My Fugene/ Çin
Mikropipetler 5-50 µL ,100-1000 µL, 0,5, 10 µL	Eppendrof/ Almanya
Milipor filtre 0.22	Proway / Çin
PCR termal döngüleyici	MyGene^{TM} Model MG25+/ Çin
Spektrofotometre	Biochrom
ELISA	Biotek/ ABD
GÜÇ KAYNAĞI	Intex/ Hindistan
Petri kabı	Biozek/ Hollanda
PCR tüpleri 50µL, DNA tüpleri 100 µL.	Eppendorf / İngiltere
platin tel döngü	Himedia/ Hindistan
Plastik test tüpleri 10 mL	Afco/ Ürdün
Buzdolabı	Arcelik/ Türkiye
Vidalı kapaklı şişeler 30 mL	Hirschmann / Almanya
Hassas elektronik terazi	A and D / Japonya
UV- transillüminatör	Cleaver/ İngiltere
Vorteks karıştırıcı	Gemmy/ Tayvan
Sallayan Benmari	Julabo/ Almanya
Dönüştürücü PCR	Isolab/ Almanya
Derin dondurucu	GFL/ Almanya
Damıtıcı	AlabTech/ Kore
DNA elektroforez cihazı	Hettich/ Almanya
Tek kullanımlık plastik düz tüpler (10 mL)	AFCO/ Ürdün
Tek kullanımlık steril pipet uçları	AFCO/ Ürdün
Mikrodalga fırın	GOSONIC/ Çin
Kuantus Florometre	Promega/ ABD
Jel Görüntüleme Sistemi	Major Science/ Tayvan
Fırın	Memmert/ Almanya
OWL Elektroforez Sistemi	Thermo/ ABD
Hassas Terazi	Mettler/ İsviçre
Mikrotiter plakası 96 kuyucuklu	Bio Basic/ Kanada

3.1.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler

Bu çalışmada kullanılan başlıca kimyasal ve biyolojik materyaller Çizelge 3.2'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler.

Kimyasallar	**Firma/Menşei**
Agaroz tozu	Bio basic/Kanada
Etanol %99, %70	BDH / İngiltere
Gliserol	Scharlau / İspanya
Gram boyama reaktifleri	Kimadia / Irak
Hidrojen peroksit H2O2 %3	Panreac / İngiltere
TBE tampon (Tris-BorateEDTA) 10X	Bio-basic / Kanada
Oksidaz reaktifi	Himedia / Hindistan
Kovacs reaktifi	Himedia / Hindistan
TE Tamponu,1x,100ml100	Himedia / Hindistan
Üre çözeltisi reaktifi	Mast Diagnostic / İngiltere
Tetrametil-p-fenilen diamin dihidroklorür	B.D.H / İngiltere
Yükleme Boya Çözelisi	Promega / ABD
a-Naftol	B.D.H / İngiltere
Pepton	B.D.H / İngiltere
Tripton	B.D.H / İngiltere
Kırmızı metil	B.D.H / İngiltere
Kloroform	Sigma / ABD
İzopropanol	Sigma / ABD
RNase Zap RNase Dekontaminasyon Çözeltisi	Applied Biosystems / ABD
TRIzol LS Reaktifi	Applied Biosystems / ABD

3.1.3 Kültür besiyerileri

Bu çalışmada kullanılan kültür besiyerleri Çizelge 3.3'te listelenmiştir. Üreticinin talimatlarına göre hazırlanmış ve 121°C'de (15 lb) 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmişlerdir.

Çizelge 3.3 Bu çalışmada kullanılan kültür besiyerileri.

Besiyeri	**Üretici/ Menşei**
Üre agar bazı	Oxoid / İngiltere
Beyin kalp infüzyon sulu besiyeri	NEOGEN/LAB / İngiltere
Kanlı ağar	NEOGEN/LAB / İngiltere
Müller-Hinton ağarı	NEOGEN/LAB / İngiltere
Besin ağarı	Oxoid / İngiltere
MacConkey ağarı	Acumedia/LAB / İngiltere
Üçlü şekerli demir agar	Himedia / Hindistan
Simmon sitrat agar	Himedia / Hindistan
Mannitol tuzlu agar	Oxoid / İngiltere
Eozin Metilen Mavisi	Oxoid / İngiltere
Hareketlilik besiyeri	Merck / Almanya
Metil red-voges proskauer	Merck / Almanya

3.1.4 Çözeltiler

3.1.4.1 Normal tuzlu su çözeltisi

Bakteri süspansiyonu için hazır normal salin kullanılır.

3.1.4.2 Üre çözeltisi (%20)

20 gr üre 10 mL distile suda çözülerek hazırlandı ve 100 mL distile suya tamamlanarak Millipore filtre (0,22) ile sterilize edildi. Üreaz enziminin tespiti için üreaz testinde kullanıldı (MacFaddin 2002).

3.1.4.3 Gram boyama çözeltileri

Üretici firmanın talimatlarıan göre, leke reaksiyonuna bakteri tepkisini belirlemek için gram boyama kullanıldı.

3.1.5 Tamponların hazırlanması

3.1.5.1 Tris-Borat EDTA (TBE)

Tris-Borat EDTA (TBE) Tamponu (0,5 X), pH 8,30'da bir litre (10X) TBE tamponundan stok solüsyon olarak hazırlandı. 500mL distile suya 50mL (10X) TBE tamponu eklenerek hazırlandı, pH 8,3'e ayarlandı ve daha sonra 1L'lik ölçülü balonda hacim 1L'ye tamamlandı (Al-Guranie and Al-Mayahie 2020).

3.1.5.2 Etidyum bromür (EtBr) (5mg/mL)

Etidyum bromür 0,05gm EtBr steril 10mL distile suda çözülerek hazırlanmış ve daha sonra koyu renk bir kapta saklanmıştır (Al-Guranie and Al-Mayahie 2020).

3.1.6 McFarland standart çözeltisi

Bu çözelti CLSI (Wayne 2011) ve (Vandepitte *et al.* 2003)'e göre aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

Çözelti (A): 100 mL distile suya 1,175 gr BaCl2, 2H2O eklendi.
Çözelti (B): 99 mL distile suya 1 mL sülfürik asit eklendi.

Daha sonra 0,5 mL (A) çözeltisi 99,5 mL (B) çözeltisine ilave edilerek iyice karıştırılmış ve solüsyonun buharlaşmaması için kapakları sıkı cam tüplere 4-5 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra bulanıklık 625 nm dalga boyunda foto spektrometre ile ayarlandı. Böylece okuma 0,08 – 0,1 olacak ve bu da 1,5 * 108 hücre/mL bakteri hücresi simüle edecektir. Antibiyotik duyarlılık testinde bakteri hücre konsantrasyonu ile karşılaştırmalı olarak kullanmadan önce iyice çalkalandığından emin olarak kullanıma kadar karanlık bir yerde saklandı.

3.1.7 Reaktiflerin hazırlanması

3.1.7.1 Oksidaz reaktifi

0,1 mg Tetra-p-para-fenilendiamin dihidroklorürün 10 mL distile suda çözülmesiyle doğrudan hazırlandı ve bakterilerin bir oksidaz enzimi üretme kabiliyetini saptamak için karanlık bir kapta saklandı (Forbes *et al.* 2007).

3.1.7.2 Hidrojen peroksit

Katalaz testi için olup reaktif kullanıma hazırdı. H2O2'nin %3'ü, bakterilerin katalaz enzimi üretme yeteneğini saptamak için koyu renk bir kapta saklandı (Forbes *et al.* 2007).

3.1.7.3 Voges-Proskauer reaktifleri (Barritt reaktifi)

Asetil-metil karbinol üretimini saptamak için kullanıldı. Bu reaktif aşağıdaki gibi iki çözeltiden oluşmaktadır:
A. Işıktan uzakta koyu renk bir kapta saklanan 100 mL %99 etanol içinde çözülmüş 5 gm α-naftol.
B. 100 mL distile suda çözülmüş 40 g KOH (Collee *et al.* 1996).

3.1.7.4 Kovac reaktifi

75 mL izoamil alkol içinde 5 gm P-Dimetil amino Benzaldehit (DMAB) çözülerek hazırlandı. Daha sonra bu karışıma yavaş yavaş 25 mL konsantre HCL ilave edildi. İndol üretimini tespit etmek için kullanıldı (MacFaddin 2000).

3.1.7.5 Metil kırmızı reaktifi

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

3.1.7.6 Kristal menekşe çözeltisi

10 mL distile suya 0,1g kristal viyole tozu eklenerek hazırlandı ve Millipore filtreler ile sterilize edildi (Christensen 1985).

3.1.8 Gram boyamanın hazırlanması

Tek bir besin agar kolonisinde gece boyunca büyütülen izolatın bir kısmı steril lup yardımıyla bir damla distal su ile temiz bir lam üzerine alındı. Hücreler lam üzerine yayıldı. Simir kurumaya bırakıldı. Daha sonra brülör üzerinde flaş geçirilerek sabitlendi ve ardından gram boyama yapıldı (Atlas *et al.* 1995). Hücrelerin rengi, şekli ve agregasyonu incelendi.

3.1.9 Kültür besiyerlerinin hazırlanması

Üretici firmanın talimatlarına göre bir grup genel kültür besiyeri hazırlanmış ve tüm bu besiyerleri otoklavda 121˚C'de 15 dakika 15 pound/inç kare olacak şekilde sterilize edilmiştir.

3.1.9.1 MacConkey agar besiyeri (pH: 7,3)

Üretici firmanın önerdiği yönteme göre hazırlanmıştır. Çoğu Gram negatif bakterinin birincil izolasyonu ve laktoz fermenterlerini laktoz fermente edmeyen bakteri izolatlarından ayırt etmek için kullanılmıştır (Baron *et al.* 1994).

3.1.9.2 Besin agar besiyeri

Besin agar besiyeri üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanmıştır. Genel deneylerde, yetiştirmede ve gerektiğinde bakteri izolatlarının aktivasyonunda kullanılmıştır (MacFaddin 2000).

3.1.9.3 Müller-Hinton agar besiyeri

Müller-Hinton agar besiyeri üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanmıştır. Antibakteriyel duyarlılık testinde kullanılmıştır (Åhman *et al.* 2019).

3.1.9.4 Eozin metilen mavisi (EMB) ortamı

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

3.1.9.5 Beyin kalp infüzyon sıvı besiyeri (pH: 7.4)

37 gr besiyerinin 100 mL distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. pH 7,2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121° C de 15 dakika sterilize edildi (Harkes *et al.* 1992).

3.1.9.6 Yarı-katı besiyer

Motilite besiyeri 0,5 g agar-agar 100 mL beyin-kalp infüzyon sıvı besiyeri içinde çözülerek hazırlandı ve otoklavlandı. Ardından içerikler her tüpte 5 mL olacak şekilde test tüplerine dağıtıldı. Bu besiyeri, bakteri hareketliliğini saptamak için kullanılmıştır (MacFaddin 2000).

3.1.9.7 Kanlı agar besiyeri (PH: 7,1)

Kanlı agar besiyeri, 40 gr'lık bir kanlı agar bazının 1000 mL distile su içinde çözülmesiyle hazırlandı. Bu besiyeri 121^{o}C de 15 dakika, 15 Inch/cm³ otoklavlandı ve ardından 50 ^{o}C oluncaya kadar soğutuldu. Ardından %5 taze insan kanı eklendi. Bu besiyeri, bazı büyüme gereksinimlerine sahip titiz bakterileri yetiştirmek için kullanılmıştır (Forbes *et al.* 2007).

3.1.9.8 MR –VP besiyeri

MR–VP besiyeri, üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanmış ve glukozun kısmi ve tam hidrolizini saptamak için kullanılmıştır (MacFaddin 2000).

3.1.9.9 Üre agar besiyeri

Bu besiyeri, süzme yoluyla sterilize edilen 15 mL üre çözeltisinin, 121°C de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilen ve 50°C de soğutulan 100 mL üre agar bazına eklenmesiyle hazırlandı. pH, 7,1'e ayarlandı ve besiyeri, sterilize edilmiş test tüplerine dağıtıldı. Eğik bir biçimde katılaşmasına izin verildi. Bu besiyeri, bakterilerin üreaz enzimi üretme yeteneğini test etmek için kullanılmıştır (MacFaddin 2000).

3.1.9.10 Kligler demir agar besiyeri

Üçlü şekerli demir agar, üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanmış ve şeker fermantasyonunu ve olası hidrojen sülfür H2S üretimini belirlemek için tanımlamada ilk adım olarak kullanılmıştır (MacFaddin 2000).

3.1.9.11 Pepton su besiyeri

Bu besiyeri, 8 gm peptonun 1000 mL distile su içinde çözülmesiyle hazırlandı. Ardından test tüplerine dağıtıldı ve otoklavlandı. Amino asit triptofanı Indole'e

ayrıştırmak için bakteriyel yeteneğin gösterilmesi için kullanılmıştır (AbdElmajed *et al.* 2014).

3.1.10 Sterilizasyon yöntemleri

3.1.10.1 Nemli ısı ile sterilizasyon

Bu çalışmada kullanılan kültür besiyeri ve Çözelti, İnç kare başına 15 pound'da çoğunlukla 121°C'de 15 dakika boyunca veya belirtilen talimatta gerektiği gibi otoklavlanarak sterilize edilmiştir (White 1996).

3.1.10.2 Kuru Sterilizasyon

Bu yöntem, cam eşyaların sterilize edilmesinde ve bu çalışmada kullanılan kapaklarda kullanılmıştır. Genellikle, 160°C'lik bir sıcaklık 1,5 saat boyunca uygulanmaktadır.

3.1.10.3 Alevle Isıtma

İnokulasyon teli, pens ucu ve spatulalar kızarana kadar bunsen brülörü alevinde tutularak sterilize edildi.

3.1.10.4 Filtreleme ile sterilizasyon

Santrifüjden sonra solüsyonları veya süpernatantı sterilize etmek için millipore filtre (0.22 μm) kullanılmıştır.

3.2 Bakteriyolojik Yöntemler

3.2.1 Numune toplama

Temiz yakalama 5 mL Midstream İdrar Numuneleri (MSU), steril temiz geniş ağızlı vidalı kapaklı (20 mL) plastik kaplar kullanılarak toplandı ve hemen laboratuvara nakledildi. Numunelerin tümü, alındıktan sonraki bir saat içinde analiz edildi. Sosyo-demografik değişkenler (yaş, cinsiyet ve kateterizasyon öyküsü ve İYE öyküsü gibi diğer ilgili klinik veriler) tasarımı önceden yapılandırılmış bir anket kullanılarak elde edildi. Her örneğin toplanma tarihi ve saati de kaydedildi. Bakteri izolatları, steril vidalı kapaklı test tüplerine toplandı ve bakteri izolasyonları için hemen MacConkey agar ve Blood agar üzerine sürme yöntemiyle ekildi (Bhatia 2008).

3.2.2 Laboratuvar teşhisi

3.2.2.1 Makroskopik ve mikroskobik inceleme ve koloni morfolojisi

Makroskopik incelemeler, idrar örneğinin rengini ve klirensini ve seviye çubuğu idrar analizini belgeleyerek yapıldı. Mikroskobik incelemede idrar örnekleri santrifüj edilerek çökeltiler mikroskopta bakteriyolojik olarak incelenmiş, lup dolusu 0,01 mL santrifüj edilmemiş idrar örneği kültür besiyerine (MacConkey agar, Kanlı agar ve EMB agar) inoküle edilerek 24 saat boyunca 37°C'de aerobik olarak inkübe edilmiştir, ardından bakterileri aşağıdakilere göre tanımlamak için biyokimyasal testler işlenmiştir (Beveridge *et al.* 2007).

Her birincil pozitif kültürden tek bir koloni alındı ve tanımlanması morfolojik özelliklere (Koloni boyutu, şekli, pigmentlerin rengi ve doğası, yarı saydamlık, laktoz fermantasyonu, kenar, yükseklik ve doku) bağlı olmuştur. Biyokimyasal testler yapıldıktan sonra gram reaksiyonu, şekli, düzeni, sporları vb. dâhil olmak üzere bakteri hücrelerinin hücresel morfolojik özelliklerini gram reaksiyonuna göre kontrol etmek için Gram boyama ile boyanmış bakteriyel simir kullanılmıştır.

3.2.2.2 Biyokimyasal testler

- **Indol testi**

Bu test, lup ile bakteri üremesi olan peptonlu su besiyerinin aşılanmasıyla yapıldı ve 24-48 saat süreyle 37°C'de aşılandı. İndol testi, 6-8 damla Kovac reaktifi (amil alkol içinde p-dimetil amino Benzaldehit) eklenerek yapıldı. Pozitif reaksiyon, sıvı besiyerinin tepesinde kırmızı renkli bir halkanın oluşmasıyla karakterize edildi (MacFaddin 2000).

- **Metil –kırımızı testi**

MR-VP sıvı besiyerinin tüpleri seçici bakteri kolonileri ile aşılandı ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Daha sonra buna beş damla metil kırmızısı reaktifi eklendi. Kırmızı rengin görünümü ve gözlemlenmesi, pozitif bir sonuç olduğu ve glikozun tam hidrolizi anlamına gelmektedir. (MacFaddin 2000).

- **Vogues –Proskauer testi**

MR-VP sıvı besiyerinin tüpleri, seçilen bakteri kolonileri ile aşılandı ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Sonuç daha sonra 0,6 mL alfa naftol (reaktif A) ve 0.2 mL %40 KOH solüsyonu (reaktif B) eklenerek okundu. 15 dakika sonra kırmızı rengin ortaya çıkması, asetoin veya Asetil - metil - karbinol üreten glikozun kısmi hidrolizi nedeniyle pozitif bir sonuç anlamına gelmektedir (MacFaddin 2000).

- **Sitrat kullanım testi**

Simmons Citrate otoklav ile sterilize edildikten sonra bakteri kolonileri inoküle edildi ve 24-48 saat 37°C'de inkübe edildi. Renk ortamının yeşilden maviye değişmesi, organizmaların tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanabildiklerini göstermiştir (Benson 1998).

- **Üreaz testi**

Bu test, bakteri üremesi olan bir üre besiyeri aşılanarak gerçekleştirilmiştir. Tüpler 24-48 saat 37°C'de inkübe edildi. Ortamın pembeye renk değişimi olumlu bir sonuç göstermiştir (MacFaddin 2000).

- **Motilite testi**

Bu test, yarı katı besiyeri içeren tüpe test edilen bakterileri bıçaklama yöntemiyle aşılayarak yapıldı ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Büyümenin bıçak hattından yayılması, olumlu sonucun göstergesi olmuştur (MacFaddin 2000).

- **KatalazTesti**

Katalaz, hidrojen peroksitten oksijen salınımını katalize eden bir enzimdir. Besleyici agar besiyeri seçilen bakteri kolonilerine sürme yöntemiyle sürülmüştür ve 37 ºC'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra üreme tahta çubukla aktarılmış ve temiz bir lamın yüzeyine konulmuş, bir damla (%3 H2O2) eklenmiştir. Gaz kabarcıklarının oluşumu olumlu bir sonucu göstermektedir (Forbes *et al.* 2007).

- **Oksidaz Testi**

Bu test, bakterilerdeki elektron donörleri ve bir redoks boyası (tetrametil-ρ-fenilendiamin dihidroklorür) arasındaki elektronların taşınmasını katalize edecek belirli bakteriyel oksidaz enziminin varlığına bağlı olup boya koyu mor bir renge indirgenmiştir.

Bir filtre kağıdı şeridi, yenice yapılmış reaktif ile ıslatıldı ve test edilecek koloni, steril bir tahta çubukla alındı ve filtre kağıdının üzerine bulaştırıldı. Olumlu bir sonuç, 5-10 saniye içinde ortaya çıkan yoğun koyu mor renkle belirtilmiştir (Forbes *et al.* 2007).

3.2.2.3 Vitek 2 kompakt sistem

Otomatik yöntemler, bakteri tanımlama yöntemleri arasında en hızlı ve en doğru olanıdır. Vitek2 sistemi (Biomerieux, ABD), organizma teşhisi için kullanılan bir biyokimyasal profil sağlayan 47 kuyucukdaki birkaç biyokimyasal test besiyerinden mikrolitre kantitatifi içeren plastik reaktif kartlarından oluşur (Maina and Kagotho 2014). Kültürlenmiş örneklerden alınan bir aşı otomatik olarak karta aktarılır ve bir fotometre, mikrobun metabolik aktivitesinden kaynaklanan kartta değişen rengi aralıklı olarak ölçmektedir. Veriler bilgisayarlı bir veri tabanında analiz edildi, saklandı ve

yazdırıldı; Gram negatif tanımlama (GN) ve Gram pozitif tanımlama (GP) için olanlar da dâhil olmak üzere çeşitli kart türleri mevcuttur (Maina ve Kagotho 2014).

3.2.2.4 Antibiyotik Duyarlılık Testi

Tüm *E.coli* izolatları, modifiye disk difüzyon yöntemiyle duyarlılık testine tabi tutulmuştur (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü, CLSI, 2016). Antibiyotik direnci, Enterobacteriaceae hakkında rutin test ve raporlama olarak kabul edilen ilaçlara karşılık gelen, CLSI (2016) tarafından önerilen kılavuzlara göre Çizelge 3.4'te listelenen 10 antibiyotik diski kullanılarak belirlendi.

Bu testte kullanılacak inoküle, kanlı agar plakasında büyütülen izole kolonilere 5 mL besin sıvı besiyeri eklenerek, 35°C'de 18 saat inkübe edilerek ve süspansiyon (0,5) McFarland standart tüp ile karşılaştırılmak üzere seyreltilerek hazırlanmıştır. Seyreltilmiş süspansiyondan Muller Hinton agar plakaları üzerine bir üreme sürüntüsü alındı ve besiyerin tüm yüzeyine birkaç kez sürme uygulandı. Her plakaya bir çift steril forseps ile antibiyotik diskleri uygulandı. Diskler, plakanın kenarından yaklaşık 15 mm uzakta, 15 cm'lik bir plaka üzerine yerleştirildi. Besiyerle eşit temas sağlamak için her disk hafifçe bastırıldı. Plakalar, 18-24 saat süreyle 37°C'de bir inkübatöre yerleştirildi. Her bölgenin çapı (disk çapı dâhil) bir cetvelle ölçüldü ve mm olarak kaydedildi. Sonuçlar daha sonra CLSI'ye göre yorumlandı (Wayne 2011).

Çizelge 3.4 Bu çalışmada kullanılan antibiyotik diskler.

Antibiyotik grupları	Antibiyotik adı	Sembolü	Firma
Aminoglikozitler	Amikasin	AK (30 µg)	Bioanalyse/Turkiye
	Gentamisin	CN (10 µg)	
	Streptomisin	S (25 µg)	
Kinolonlar	Siprofloksasin	CIP (5 µg)	
	Nalidiksik asit	N (10 µg)	
Aminopenisilin	Ampisilin	AM (25 µg)	
Nitrofuranlar	Nitrofurantoin	F (100 µg)	
β-laktamaz inhibitörü	Amoksisilin-Klavulanik asit	AMC (30 µg)	
Tetrasiklinler	Tetrasiklin	TE (10 µg)	HiMedia/Hindistan
Sefalosporin III	Seftriakson	CRO (30 µg)	Mastdiscs / İngiltere

3.2.2.5 Hemolizin üretimi

Kanlı agar besiyeri bakteri izolatları ile 37^{o}C'de 24 saat süreyle inoküle edilerek hemolizin üretimi gerçekleştirilmiştir. Kolonilerin çevresinde şeffaf bir bölgenin görülmesi tam hemoliz (ß- hemoliz) olarak adlandırılır. Kolonilerin çevresinde yeşilimsi bir bölgenin görünümü kısmi hemolize (α-hemoliz) atıfta bulunurken, bölgede hiçbir değişiklik olmaması hemoliz (γ-hemoliz) anlamına gelmez (De Boy *et al.* 1980).

3.3 Bakterilerin Muhafazası

3.3.1 Kısa süreli saklama

(Angshumanjana *et al.* 2016)'ya göre, izole edilen bakterinin pozitif kültürleri, sonraki testlere kadar 4˚C'de eğimli besin agarı üzerinde saklanmıştır.

3.3.2 Uzun süreli saklama

24 saat taze, MacConky agar kültürlerinden UPEC izolatları %15 gliserol beyin kalp infüzyon sıvı besiyerinde dondurulmuş ve kullanılana kadar -20˚C'de saklanır veya nütrient agarda derin inoküle edilerek oda sıcaklığında karanlıkta tutulmuştur (Green 2008).

3.3.3 Dondurulmuş stokların alt kültürü

Stoklar donmuş kültürler olmakla beraber -20°C'de saklandı, taze kanlı agar plakalarında alt kültürlendi. Daha sonra (Angshumanjana *et al.* 2016)'ya göre aerobik durumda 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

3.4 Moleküler Yöntemler

3.4.1 Ticari kitler

Bu çalışmada kullanılan ticari kitler Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Bu çalışmada kullanılan ticari kitler.

Kitler	**Firma/ Menşei**
ABIOpure^{TM} Total DNA	ABIOpure, AND
Agaroz, Ethidium Bromide Solution (10mg/ml), GoTaq Green Master Mix, Nükleazsız Su, TAE 40X, Quantifluor dsDNA Sistemi	Promega, ABD
Mutlak Etanol	ROMIL pure chemistry, İngiltere
Primerler	Macrogen, Kore

3.4.2 Primerler

Bu çalışmada kullanılan primerler Çizelge'de 3.6 belirtilmiştir.

Çizelge 3.6 Bu çalışmada kullanılan primerler.

Primerler	**Primer dizileri 5'-3'**	**Ürün boyutu (bp)**	**Tavlama sıcaklığı (°C)**
cnf1-F	5'-AAG ATG GAG TTT CCT ATG CAG GAG-3'	498	55
cnf1-R	5'-CAT TCA GAG TCC TGC CCT CAT TAT T-3'		
clbA-F	5'-CTA GAT TAT CCG TGG CGA TTC-3'	1002	55
clbA-R	5'-CAG ATA CAC AGA TAC CAT TCA-3'		
cdtlll-F	5'-GAA AGT AAA TGG AAT ATA AAT GTC CG-3'	555	55
cdtlll-R	5'-TTT GTG TCG GTG CAG CAG GGAAAA-3'		

3.4.3 UPEC izolatlarında virülans genlerinin (Cnf1, clbA ve cdtlll) PCR ile tespiti

- **DNA ekstraksiyonu**

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

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

- **UPEC izolatlarından DNA konsantrasyonunun belirlenmesi**

Aşağı akış uygulamaları için örneklerin iyiliğini tespit etmek için ekstrakte edilen DNA konsantrasyonunu saptamak amacıyla Quantus Fluorometer kullanıldı. 1 µL DNA için 199 µL seyreltilmiş QuantyFlour Dye karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakikalık inkübasyondan sonra DNA konsantrasyon değerleri tespit edildi (Shareef and Risan 2021).

- **UPEC izolatlarında toksin genlerinin (cnf1, clbA ve cdlll) PCR ile amplifikasyonu**

Ardışık PCR yöntemleri için beş reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Schochetman *et al.* 1988, Xiong *et al.* 2004): İlk olarak, ilk denatürasyon aşaması, örnekleri ısıtmak yerine, PCR reaksiyonları 5 dakika boyunca 95 Cº'de ısıtıldı. İkinci olarak, çift sarmallı DNA'nın denatürasyonu, dublekste bir arada tutulan DNA'nın tamamlayıcı zincirlerini hidrojen bağları ile ayırdı. Dubleksi ayırmanın birkaç fiziksel ve kimyasal yolu olmasına rağmen, 30 saniye boyunca 95 Cº'ye ısıtmak basit ve verimlidir. Tavlama

primerlerinin ardından, test tüpü 30 saniye boyunca 55 Cº'ye soğutularak ayrışan DNA sarmallarına primerler bağlanır. Bir primer, bir oligonükleotit olarak bilinen tek sarmallı bir nükleotid dizisidir. Her bir primer orijinal DNA sarmallarından birine tamamlayıcıdır. Son olarak, primer uzantısı olan enzim, yeni DNA sarmallarından sentezini katalize eder. Enzim, 1 dakika boyunca 72 Cº'ye yeniden ısıtılarak tavlanmış primer üzerine eşleştirilmemiş DNA zincirindekilere tamamlayıcı nükleotidler ekleyen bir DNA polimerazdır. Her döngünün tamamlanmasıyla DNA iplikçiklerinin sayısı iki katına çıkar. 30 döngüden sonra, tek bir DNA kopyası 1.000.000 kopyaya kadar arttırılabilir. Ayrıca, Çizelge 3.7 ve devamı ek 1'de gösterildiği gibi tüm PCR reaksiyonları için tam uzamayı sağlamak için son döngü 72°C'de 7 dakika daha takip edildi.

Çizelge 3.7 PCR programı.

Adımlar	**Sıcaklık (ºC)**	**Süre (dakika:saniye)**	**Döngü**
İlk Denatürasyon	95	05:00	1
Denatürasyon	95	00:30	30
Tavlama	55	00:30	
Uzatma	72	01:00	
Nihai Uzatma	72	07:00	1
Tutma	10	10:00	

- **Agaroz jel elektroforezi**

PCR amplifikasyonundan sonra, amplifikasyonun varlığını doğrulamak için agaroz jel elektroforezi uygulandı (Sambrook *et al.* 1989).

1 Agarozun hazırlanması

- 100 mL 1X TAE behere alındı.
- Tampona 1,5 gm (%1,5 için) agaroz eklendi.
- Çözelti, tüm jel partikülleri eriyene kadar (Mikrodalga kullanılarak) kaynama noktasına kadar ısıtıldı.
- Agaroza 1µL Ethidium Bromide (10mg/mL) eklendi.

- Agaroz karışmaması ve kabarcık oluşmaması için karıştırılmıştır.
- Solüsyon 50-60C°'de soğumaya bırakıldı

2 Yatay agaroz jelin dökümü

Agaroz çözeltisi, her iki kenar selofan bantlarla kapatıldıktan sonra jel tepsisine döküldü ve agarozun oda sıcaklığında 30 dakika katılaşmasına izin verildi. Tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel, jel tepsisine yerleştirildi. Tepsi, tampon jel yüzeyi üzerinde 3-5 mm'ye ulaşana kadar 1X TAE-elektroforez tamponu ile doldurulduğu.

3 DNA yüklemesi

PCR ürünleri doğrudan yüklendi. PCR ürünü için 10µL doğrudan kuyucuğa yüklendi. Elektrik gücü 75 dakika boyunca 100v/mAmp'de açıldı. DNA, Katottan artı Anot kutuplarına hareket eder. Jel içindeki etidyum bromür lekeli bantlar, bir Jel görüntüleme sistemi kullanılarak görselleştirildi.

3.4.4 UPEC izolatlarında hly, cnf1 ve küçük kodlamayan RNA (RfaH) ekspresyon genlerinin belirlenmesi

- **RNA ekstraksiyonu**

UPEC bakteri hücreleri peletlendi. Ardından 1 mL AccuZolTM (Kore BIONEER şirketi) içinde parçalandı ve hücre lizatını birkaç kez pipetten geçirdi. Daha sonra, 1 mL AccuZolTM başına kloroform (200 uL) eklendi ve 15 saniye kuvvetlice çalkalandı. Karışım buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra karışım 12000 rpm'de 4ºC'de 15 dakika santrifüj edildi. Sulu faz yeni bir 1,5 mL tüpe aktarıldı ve eşit hacimde izopropil alkol ilave edildi. Tüpler 4-5 kez alt üst edilerek karıştırıldı ve -20ºC'de 10 dakika inkübe edildi. 4ºC'de 10 dakika 12000 rpm'de santrifüj yapıldı ve süpernatan dikkatlice çıkarıldı. Bir mL %80 etanol eklendi ve vorteks ile iyice karıştırıldı. 4ºC'de 5 dakika 12000 rpm'de santrifüj yapıldı, ardından süpernatant dikkatlice çıkarıldı ve peletler kurutuldu. RNA, pipetin ucundan solüsyonu birkaç kez atlayarak Rnaz içermeyen suda çözündürüldü ve kullanılıncaya kadar -80ºC'de saklandı (Gambino *et al.* 2008).

- **Ribonükleik Asit Saflık ve Konsantrasyon Ölçümü**

Ekstrakte edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı, bir spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Konsantrasyon mg/ul birimlerinde ölçüldü ve saflık 260/280 nm'de optik yoğunluk (O.D) oranıyla ölçüldü. RNA saflığının kabul edilen aralık değeri 1,7 ila1,9 arasındadır (Sambrook *et al*. 1989).

1. Primerlerin hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan primerler ve dizilimleri Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8 Hly, CNF1 ve RfaH'nin spesifik primerleri, PCR koşulları ve amplikon boyutları.

Primerler	**Primer dizileri 5'-3'**	**Ürün boyutu (bp)**
Hly-F	ATGAATGGTGTGGTGTTGCG	143 BP
Hly-R	TTGCGCTTCATTCAGCTTCG	
Cnf1-F	TTCTTTGCCTGGTGTTTGCG	128 BP
Cnf1-R	AGTACAGCAATTCCGGAGACTG	
RFaH-F	AACATCTTCCTGCCCCAATG	137 BP
RFaH-R	AATTCGTGACCGCACTTTGC	
E. coli rssA HKG -F	TTGCTATTCGCGCATCATGC	131 BP
E. coli rssA HKG -R	AATATCAGCCCCCAATGCAC	

2. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi

cDNA'nın sentezi ve amplifikasyonu, Easy Script tek adımlı genomik DNA (gDNA) çıkarma ve DNA sentezi süper karışımı kullanılarak aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

RNA primeri ve su karıştırıldı ve 65°C'de 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra Çizelge 3.9'da bileşenler eklenerek iki dakika buzda bekletildi.

Çizelge 3.9 Sentez tamamlayıcı DNA (cDNA) bileşenleri.

Bileşen	**Hacim**
RNA	10 pg- 500ng
Rastgele primer (0.1µg/µL)	1 µL
2xES reaksiyon karşımı	10 µL
RT/RI enzimi	1 µL
gDNA sökücü	1 µL
RNaz içermeyen su	20 µL'e kadar

Karışım, Çizelge 3.10'da olduğu gibi ısı döngüleyici kullanılarak aşağıdaki koşullarla muamele edilmiştir.

Çizelge 3.10 Isı döngüleyici kullanılan koşullar.

Sıcaklık (ºC)	**Süre**
25° C	10 dakika
42º C	15 dakika
85° C	enzimleri inaktive etmek için bir saniye

3. Ters transkriptaz PCR (RT-PCR) tekniği

RT-qPCR, aşağıdaki malzemeleri karıştırarak BrightGreen qPCR MasterMix kullanılarak 20µL hacimli bir reaksiyon çözeltide gerçekleştirilir:

- 0,6 µL ileri (F) primer.
- 0,6 µL ters (R) primer.
- 10µL BrightGreen 2X qPCR mastermix.
- ≤ 500 ng cDNA

- 20 µL'e kadar Nükleaz içermeyen H2O

Üretilen çözelti, Döngü Eşiği (CT) değerini ölçmek için termal reaksiyon için Gerçek zamanlı PCR Döngüleyici'ye yerleştirildi. Aşağıdaki döngü protokolü gerçekleştirildi:

Termal döngü reaksiyonu Sure döngüleyici kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonunun optimizasyonu, seçilen bant ürününü hangi sıcaklığın verdiğini benimsemek için gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu Çizelge 3.11'de gösterildiği gibi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.11 PCR programı ve döngü protokolü.

Adım	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü**
İlk denatürasyon	95 ºC	10 dk	1
Denatürasyon	95ºC	15sn	40
Tavlama	60 ºC	60 sn	
Erime eğrisi	Cihaz yönergelerine göre		

RT-PCR, gen ekspresyon seviyelerinin nicelleştirilmesi için kullanılır. Termal reaksiyon sırasında ölçülen döngü eşik (CT) değerleri aşağıdaki ölçümlerle bilgisayara kaydedilir (Dhar *et al.* 2002).

4. Gerçek zamanlı qRT-PCR analizi

Bu protokolün ikinci bölümü, UPEC izolatlarında virülans faktörü Hly, Cnf1 ve küçük kodlayıcı olmayan RNA (RfaH) ile en güçlü hemolitik üretici izolatın cDNA örnekleri seçilerek yapılmıştır ve aynı çalıştırmada kontrol edilmiştir. Her numune için dört PCR tüpü, her gen için bir tüp, Hly, Cnf1 ve küçük kodlamayan RNA (RfaH) ve temizlik geni (E. coli rssA HKG) mevcuttur. Miktar tespiti, Syber Green'in floresan gücüne dayanmakta olup, reaksiyon karışımı, Çizelge'de 3.12 belirtilen miktarları ile bileşenlerden oluşmaktadır.

Çizelge 3.12 Ana amplifikasyon reaksiyonu bileşeni, konsantrasyonu ve hacmi.

Bileşen	Konsantrasyon	Hacim
20 µL'ye kadar nükleaz içermeyen su	-	5.6 µL
Bright Green qPCR Master Karışım	1X	10µL
İleri Primer (6 µM)	300 NM	1 µL
TersPrimer (6 µM)	300 NM	1 µL
qRT PCR enzim Karışımı (50X)	1X	0.4 µL
Toplam RNA	2pg – 0.2 µg 0.01 pg – 2 ng	2 µL

5. Gen ekspresyon hesaplamaları

qRT-PCR'nin veri sonuçları, hedef ve referans (temizlik) genleri arasındaki Ct değerlerinin doğrudan bir karşılaştırması olduğu için hesaplanmıştır. Genler, aşağıdaki denklemlerde gösterildiği gibi (Schmittgen *et al.* 2008) tarafından açıklanan ΔΔCt yöntemi kullanılarak nispi niceleme gen ekspresyon seviyeleri (kat değişimi) ile analiz edilmiştir:

İlk olarak, her numune için (bilinmeyen numuneler ve kalibratör numunesi için) hedef gen ile referans gen arasındaki ΔCt hesaplandı.

ΔCt = Ct hedef – Ct referans gen

İkinci olarak, bilinmeyenin ΔCt değeri ile kalibratörün ΔCt değeri arasındaki farkın hesaplanması ΔΔCt değerini vermiştir:

ΔΔCt = (Ct hedef – Ct referans) numune– (Ct hedef – Ct referans) Kontrol

Üçüncü olarak, numunedeki normalleştirilmiş hedef miktar daha sonra 2-ΔΔCt'ye eşitlendi. Bu değer, örneklerin ekspresyon düzeylerini karşılaştırmak için kullanılmıştır:

Kat değişimi = 2-ΔΔCT

Böylece, metanolik ekstrakt ile muamele edilmiş ve muamele edilmemiş bakteri izolatları arasında karşılaştırmalı eşik döngüsü (CT) değer yöntemi (2- ΔΔCt) kullanılarak mRNA ekspresyon seviyelerindeki nispi ifade değişiklikleri belirlenmiştir.

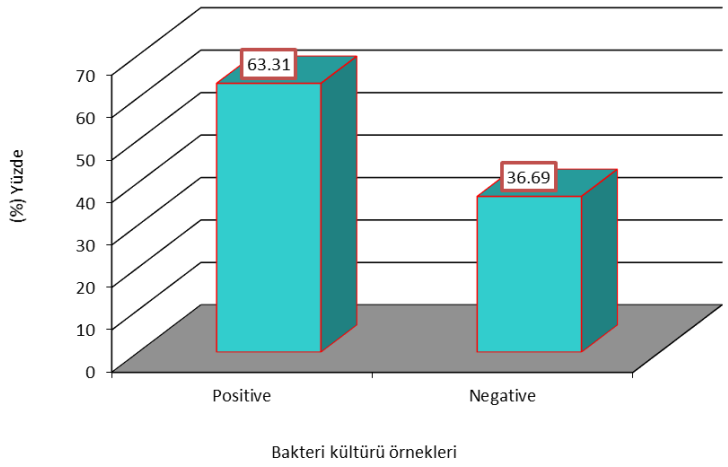
3.5 İstatistiksel Analiz

Çalışma parametrelerinde farklı faktörlerin etkisini tespit etmek için İstatistiksel Analiz Sistemi-SAS (2012) programı kullanılmıştır. Ortalamalar arasında anlamlı karşılaştırma yapmak için en az önemli fark –LSD testi (Varyasyon Analizi-ANOVA) kullanıldı. Bu çalışmada yüzde (0,05 ve 0,01 olasılık) arasında anlamlı karşılaştırma yapmak için ki-kare testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 İdrar Örneklerinde Bakteriyel Enfeksiyonların Prevalansı

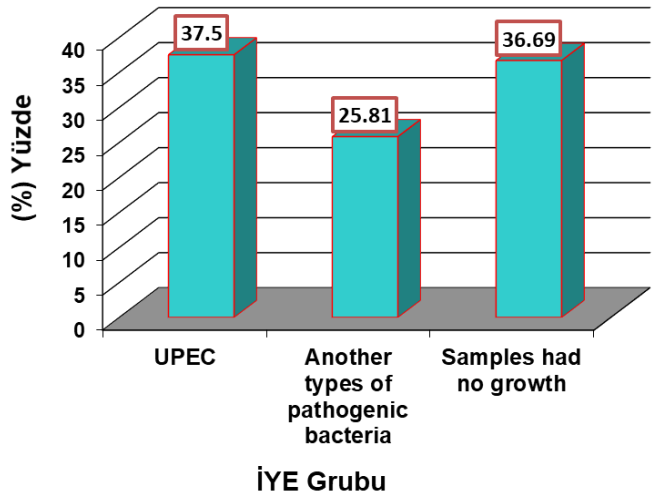
Hastalardan toplam 248 idrar numunesi alındı, Şekil 4.1'de gösterildiği üzere, numunelerin farklı bakteriyolojik besiyerlerde kültürlenmesinden sonra,157 numunede (%63,31) önemli ölçüde (6,43, p≤0,040) Bakteriyel patojenler için pozitif bulunurken, 91 (%36,69) numunede üreme olmadığı, bunun mantar veya viral enfeksiyonlara bağlı olabileceği gözlenmiştir, Ek 2'de gösterilmektedir.



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

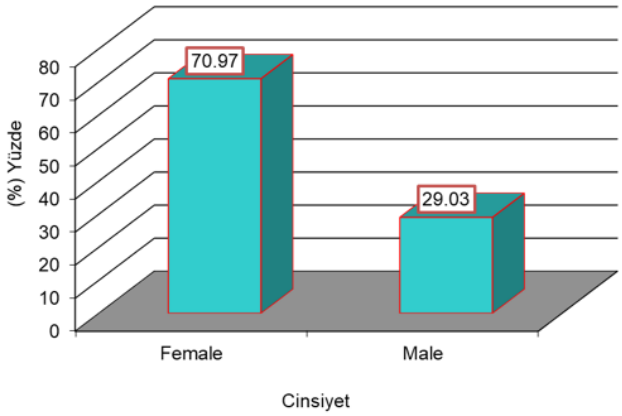
Daha sonra, Şekil 4.2'de gösterildiği gibi, bakterilerin büyüme özelliklerine göre pozitif idrar örneklerinde üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC) 93 (%37,5) ile baskın patojen iken, 64 (%25,81) ile *Staphylococcus, Klebsiella, Proteus ve Pseudomonas spp*. Şekil 4-2'de ve ek 3'teki gösterildiği gibi diğer patojenik bakteri türlerinin olduğu fark edilmiştir. Daha önce yapılan bir çalışma, 170 idrar örneği arasında idrar örneklerinde izole üropatojenlerin prevalansının, sadece 133 (%78,2) olduğu görülmüştür. Daha önce yapılan bir başka çalışmada, 170 idrar örneği arasında idrar örneklerinde izole üropatojenlerin prevalansının, en sık görülen organizma %73,7 ile 98 hastadan izole edilen E. coli olduğunu ve bunu sırasıyla %13,5 ile K. pneumonia , %6,7 ile *P. mirabilis*, %4,5 ile P. aeruginosa ve %1,5 ile A. baumannii'nin izlediğini

göstermiştir.(Elamary *et al.* 2020). Bu durum bizim sonuçlarımızla uyumludur. Ayrıca, (Qadir *et al.* 2018) tarafından yapılan çalışma, pozitif idrar kültüründe (%43,1) UPEC'nin en sık görülen patojen olduğunu ve bunu sırasıyla (%14,67) ile *Klebsiella pneumonia*, (%11,92) ile *Pseudomonas aeruginous* ve (%4,58) ile *Proteus mirabilis*'in izlediğini bildirmiştir.



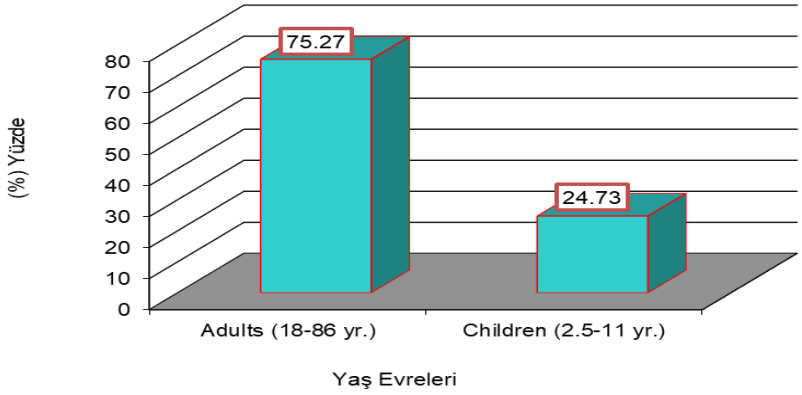
Şekil 4.2 İYE gruplarına göre bakteri üremesinin dağılımı/ Prevalansı.

Ayrıca Cinsiyete göre İYE insidansı incelenip sonuçlar karşılaştırıldığında ve dişilerin oranının erkeklere göre daha yüksek anlamlı İYE (16,35, p≤0,0001) maruziyet oranına sahip olduğu gözlemlendi. 66'sı (%70,97) kadınlara aitken, şekilde gösterildiği gibi 27 (%29,03) örnek erkeklere aittir (Şekil 4.3). Şekil 4.3'te gösterildiği gibi tüm yaş gruplarında kadınlarda İYE insidansının erkeklerden anlamlı derecede yüksek olduğu, bunun kadın üretrasının daha kısa ve daha geniş olmasına bağlı olabileceği ve anüse yakınlığı nedeniyle rektumdan bakterilerin üretraya kolayca geçerek enfeksiyona neden olabilmesi ile açıklanmaktadır (Kolawole *et al.* 2009, Yuan 2021).



Şekil 4.3 Cinsiyete göre hastalarda İYE yüzdesi ve dağılımı.

Ancak, yaşa göre İYE insidansı incelendiğinde, araştırmamızda yetişkinlerin çocuklardan daha fazla İYE'ye maruz kaldıklarını gözlemledik. Oldukça anlamlı farklarla (23,75, p≤0,0001); 70'i (%75,27) 18 ila 86 yaşları arasında yetişkin izolattan, ve 52 (%74,2) yüksek frekansla dağıtılmış izolatın kadınlara ve 18 (%25.73) izolatın erkeklere ait olduğunu bulduk. 2,5-11 yaş aralığında 23 (%24,7) izolat bulunurken, bunlardan (n=14, %60,8) yüksek frekansla izolat kadınlara ve (n=9, %39,1) izolat erkeklere aittir. Şekil 4.4'te bu durumun sebebi, etyolojiyi etkileyebilecek aşırı yaş, diyabet, hamilelik, kateterizasyon veya omurilik yaralanmaları gibi belirli konakçı faktörlere bağlı olabileceği değerlendirilmiştir (Ronald, 2002) ve (Tan 2016) tarafından yapılan çalışma, yetişkin kadınların İYE geliştirme olasılığı erkeklerden 30 kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Neredeyse kadınların yarısı yaşamları boyunca en az bir İYE atağı yaşarlar ve İYE'ler cinsel olarak aktif genç kadınlarda daha yaygındır. Diğer duyarlı yetişkinler, yaşlıları ve üretral katetere ihtiyaç duyan hastaları içerir (Magliano *et al*. 2012)'nun çalışmasına ek olarak, *E. coli* ile üriner patojenlerin prevalansının genç ve yaşlı erkeklerde daha az yaygın olduğu (sırasıyla %51,3 ve %52,2) ve 15 yaşında veya daha büyük kadın hastalarda (yaklaşık %71) daha yaygın olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.4 Örnek çalışmanın yaşa göre dağılımı.

Diğer sonuçlar, kız çocuklar arasında daha yüksek İYE insidansını vurgulamıştır. (Pouladfar *et al.* 2017) gibi, 2 yaşından büyük kızlarda üretranın anatomik daralması ve anüs ile üretral açıklık arasındaki yakın mesafe nedeniyle genellikle İYE ile artan bir ilişki vardır. 2008'de yapılan bir analiz çalışması, sünnetli olmanın İYE ile ilişkiyi belirlemedeki önemli rolünü vurgulamış ve sünnetsiz erkek bebeklerin daha yüksek İYE oranına sahip olduğunu öne sürmüştür (Shaikh *et al.* 2008).

(Erol *et al.* 2018) tarafından yapılan araştırmaya göre kadınlarda İYE, erkeklere göre iki kat daha fazla görülmektedir. Çalışmada toplam 6515 idrar kültürü incelenmiş, izolatların çoğunluğunu kadınlar (%66,8) ve erkek izolatların en büyük oranını 2 yaş altı erkek çocuklar (%46,1) oluşturmuştur. Buna karşılık, kadınlarda izolatların çoğunluğu 6 yaşından büyük kız çocuklardan (%46,8) elde edilmiştir.

4.2 İdrar Yolu Enfeksiyonu Olan Hastalarda *Escherichia Coli* İnsidansı

157 pozitif numuneden 93 (%37,5) izolat *E. coli* olarak tespit edilmiş olup bu bakteriler silindirik, çubuk şekilli, uçları yuvarlak hücrelere sahip gram-negatif basiller olarak ortaya çıkmıştır. 64 (%25,81) izolat ise farklı bakteri türlerine aitti. Ayrıca örneklerin 91'i (%36,69) negatif büyüme vermiştir. Negatif kültür sonuçlarının yorumlanması, viral benzeri veya mantar enfeksiyonlarına bağlı olabilir.

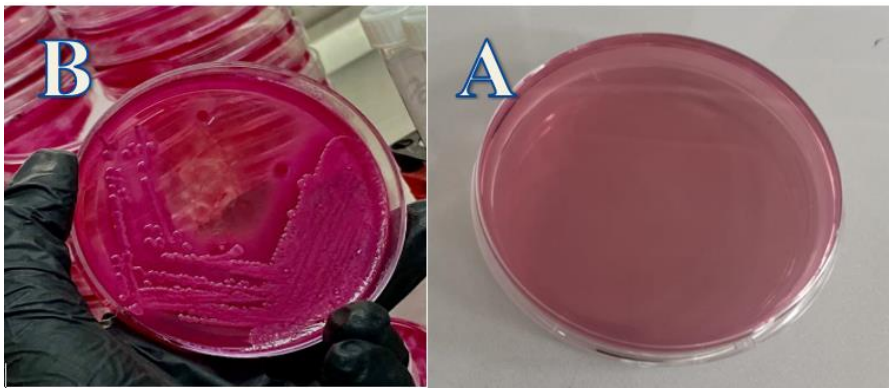
Üropatojenler arasında *E. coli'*nin baskın olmasının sebebi, *E. coli*'nin bağırsaktaki doğal habitatından bulaşması ve idrar yoluna girmesi ve bu yolun enfeksiyonlarına nedeniyle olabilir (Robinson *et al.* 2010).

Irak'ın farklı şehirlerinde daha önce yapılan çalışmalar, Hilla şehrinde (AL-Tememy 2014) ve Kerkük şehrinde (Aljebory *et al.* 2019), İYE hastalarında *E. coli* baskınlığı üzerine yapılmıştır. Buna karşılık, (Zahera *et al.* 2011), İYE'ye neden olan diğer bakteriyel patojenlere kıyasla düşük bir *E. coli* oranı (%30) bulmuştur. UPEC baskınlığının veya çalışmalar arasındaki varlığın bu varyasyonları, numunenin hastane laboratuvarlarında bulunan diğer bakterilerle kontamine olabileceği için numune toplamanın boyutuna, laboratuvar koşullarına, numune toplama yöntemine bağlı olabilir.

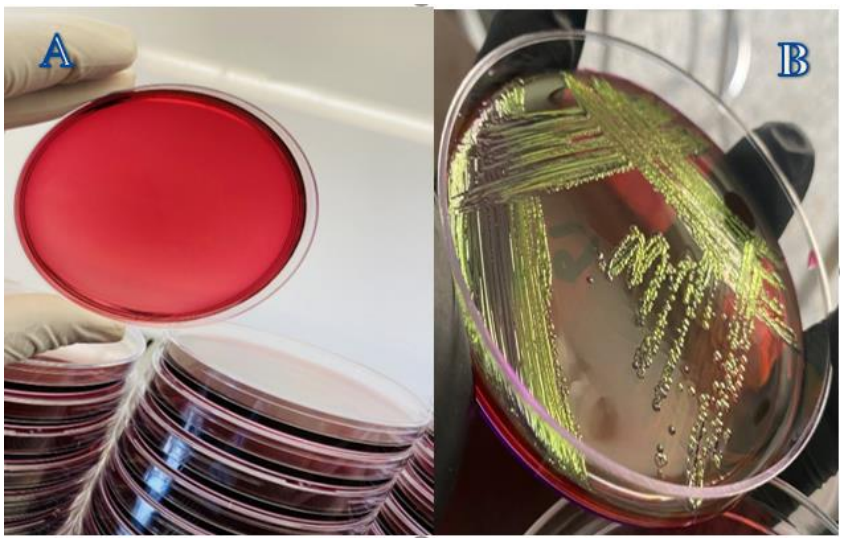
4.3 *Escherichia Coli*'nin Özellikleri

İYE'li hastalardan *E. coli* bakterilerinin tanımlanması, esas olarak mikroskobik modellere, kültürel, biyokimyasal özelliklere ve Vitek 2 kompakt sistem tarafından da doğrulanmasına bağlı olmuştur.

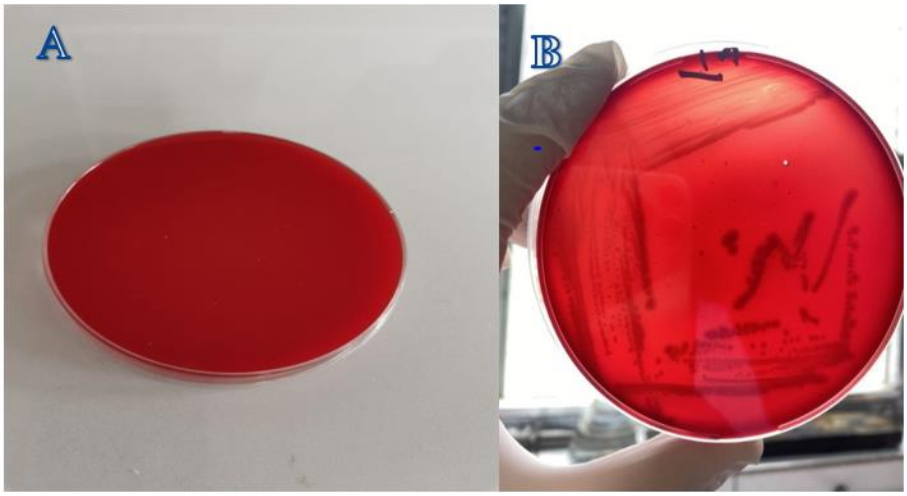
E. *coli* izolatlarının özellikleri düz, silindirik, gram negatif basil, yuvarlak uçlu çubuk şekilli hücrelerdir. UPEC izolatları 37˚C'de üreme kabiliyetine sahip olmakla beraber, Şekil 4.5'de görüldüğü gibi laktozu fermente etme özelliğinden dolayı MacConkeys agar üzerinde pembe koloniler olarak görülmektedir. EMB (seçici ve diferansiyel besiyeri olan) üzerinde yeşil metalik parlaklığa sahip büyüme kolonize olması, Şekil 4.6, diğer gram negatif patojenlerle karşılaştırıldığında *E. coli* için karakteristik bir özellik olarak temsil edilir. Ayrıca kanlı agar üzerinde kokulu hemoliz bölgeleri oluşturan, Şekil 4.7, büyük yassı koloniler göstermektedir.



Şekil 4.5 MacConkey agar plağında *E.coli* izolatlarının özellikleri; A) Kontrol MacConkey ortamı (bakteri üremesi olmadan). B) *E.coli*'nin, MacConkey agarında (kendi koleksiyonu) pembe koloniler olarak görüntüsü.



Şekil 4.6 A)Kontrol EMB besiyeri (bakteri üremesi olmadan).B)Yeşil metalik parlaklığa sahip E.coli büyümesinin EMB agarda kolonize olması (kendi koleksiyonu).



Şekil 4.7 A)Kontrol kanlı agar (bakteri üremesi olmadan). B)*E.coli*'nin, hemoliz bölgeleri oluşturan büyük yassı kolonileri göstermesi.

4.4 UPEC'in Biyokimyasal Özellikleri

Çalışmamızda, İYE'li hastalardan alınan *E. coli* izolatları, tüm izolatların Katalaz, İndol, Metil Kırmızısı için pozitif sonuç verdiğini, ancak bu izolatların Oksidaz, Voges-Proskauer, Simmon sitrat için negatif sonuç verdiğini gösteren biyokimyasal tahlillerle doğrulanmıştır. Üçlü Şekerli Demir besiyeri (TSI) testi, H2S içermeyen gazlı asit eğimli ve asit düğmesi A/A'yı göstermiş olup bu durum, (Aljebory *et al.* 2019) tarafından yapılan çalışmaya yakındır. UPEC'in biyokimyasal tanısal özellikleri Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

E. coli katalaz enzimi üretme kabiliyetine sahiptir. Tüm UPEC izolatlarımız besiyerine hidrojen peroksit eklendiğinde oksijen kabarcıkları oluşturarak katalaz testi için pozitif çıkmıştır (UPEC bakterileri hidrojen peroksit reaktifini analiz edip su ve oksijene çevirmiştir) ve bu sonuç (Munshi *et al.* 2020) tarafından yapılan çalışmaya yakındır. Ek olarak, gaz üretimi ile laktoz fermantasyonu ve glikoz fermantasyonu için pozitif olmuş, ve bu sonuç da (MacFaddin 2000) tarafından yapılan çalışmaya benzerdir.

IMViC bir grup biyokimyasal testtir (İndol testi, Metil kırmızısı testi, Voges-Proskauer testi ve Sitrat kullanım testi). Bakterilerin triptofandan indol üretme kabiliyetini tespit etmek için kullanılan indol testi, 6-8 damla Kovac reaktifi (amil alkolde p-dimetil amino

Benzaldehit) eklenerek yapılmıştır. Tüm UPEC izolatları, (MacFaddin 2000) ve (Awad 2020) tarafından yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi sıvı besiyerin tepesinde kırmızı bir renk halkasının oluşumu ile karakterize edilen bu reaksiyon için pozitif bir sonuç göstermiştir.

Metil kırmızısı testi, UPEC'nin, tamponun varlığına rağmen sistemin pH'ını düşürerek, stabil bir asit son ürüne glikozun fermantasyonunu büyük ölçüde tamamlama yeteneğini göstermek için kullanılmıştır. Metil kırmızısı indikatör pH 4.4'ün altında ise kırmızı ve pH 6.0'ın üzerinde ise sarı remktedir, bu nedenle kırmızı bir sonuç pozitif ve sarı bir sonuç negatif olarak etiketlenmiştir. Tüm izolatlarımız kırmızı renk ile pozitif sonuç vermiş olup bu sonuç, (Abdullah 2016) tarafından yapılan bir çalışmayla hemfikirdir.

Yapılan Voges-Proskauer Testi, E.coli'nin glikoz fermentasyonundan kararlı asitler üretmediğini, bunun yerine glikoz parçalanmasından 2,3 bütandiol ürettiğini ve bu süreçte ara kimyasal asetoinin üretildiğini göstermiştir. Barritt reaktifleri A ve B'nin eklenmesiyle şarap kırmızısı renk değişimi, asetoinin, dolayısıyla 2 ila 3 bütandiolün varlığını saptayan pozitif bir testtir; kahverengi veya bakır rengi negatiftir (Khan 2013) ve (Awad 2020) tarafından yapılan çalışmalarda olduğu gibi tüm izolatlarımız bu testte negatif (kahverengi renk) sonuçlar göstermiştir.

Sitrat Kullanım testinde, Simmon Sitrat agarı, bir organizmanın sitratı, sitrat enzimini kullanarak tek karbon kaynağı olarak kullanıp kullanamayacağını belirlemek için kullanılmaktadır. Sitrat kullanımı aerobik bir işlemdir ve bakteri üremesinin havaya maruz kalmasını artırmak için eğimli bir tüp kullanılır; eğimli aşılama yapılır. pH göstergesi, nötr pH'da yeşil olan ancak 7,6'nın üzerindeki pH seviyelerinde maviye dönen Bromtimol mavisidir.

Test edilen tüm UPEC izolatlarında, besiyerin rengi yeşil kalmış ve bu da negatif bir sonuçtur. Bizim elde ettiğimiz sonuç (Saadi Al-Baer and Hussein 2017, Awad 2020) tarafından yapılan çalışmalarının sonuçlarına yakındır.

Bakteri motilitesini bıçaklama yöntemiyle test etmek için kullanılan motilite testi, büyümenin bıçak hattından yayılması, pozitif bir sonucun göstergesi olmuştur (MacFaddin, 2000). Tüm UPEC bu testler için pozitif olmuş ve bu sonuç da, (Nas 2019) tarafından elde edilen sonuçlarla aynı fikirdedir.

Tüm UPEC izolatlarımız oksidaz, H2S ve üreaz testleri için reaksiyonlarda negatif çıkmıştır. Oksidaz testi için kolonilerin renginin mora dönüşmemesi, hidrojen alıcısı olan sitokrom oksidaz enzimini içermediğini göstermektedir. Üreaz testine göre, üreaz enzimi içermediğinden negatif sonuç vermiştir, bu nedenle besiyerinin rengi değişmemiştir ve bu sonuç da Ghajiri (2020) tarafından yapılan çalışma ile uyumludur.

Ayrıca İYE'den izole edilen *E.coli* izolatlarının biyokimyasal özellikleri test edilen izolatların fenotipini göstermek ve Ek 2'de gösterildiği gibi, bu cihazın doğruluğunun %99'a ulaşabildiği mikrobiyal ve kültürel ve geleneksel biyokimyasal testlere bağlı olan tanıyı doğrulamak amacıyla mikroorganizmalar için otomatik bir tanımlama sistemi olarak kabul edilen Vitek 2 Sistemi ile doğrulanmıştır.

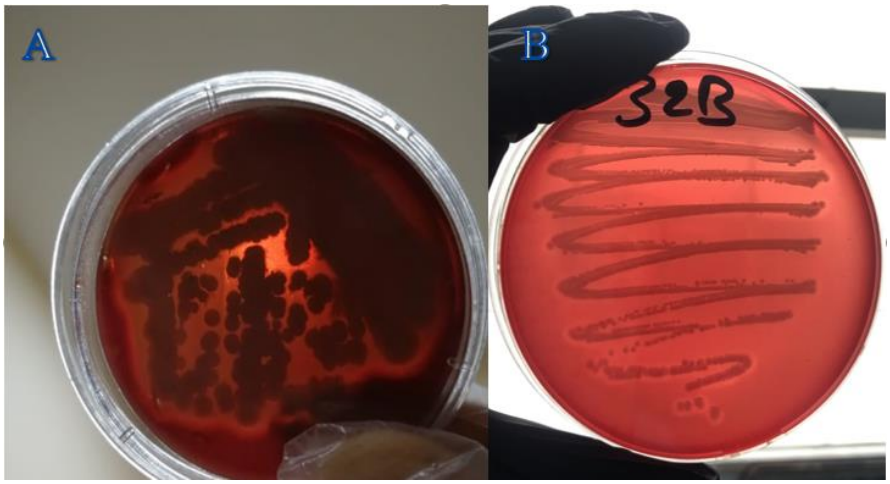
Çizelge 4.1 İYE hastalarından alınan *E.coli* izolatlarının biyokimyasal özellikleri.

Yapılan Tahliller	**Sonuçlar**
Katalaz	+
Oksidaz	-
Motilite testi	+
Üreaz testi	-
Sitrat kullanımı	-
Voges-Proskauer	-
Metil kırmızısı	+
İndol testi	+
H2S üretimi	-
Laktoz fermantasyonu	+
Gaz üretimi ile glikoz fermantasyonu	+

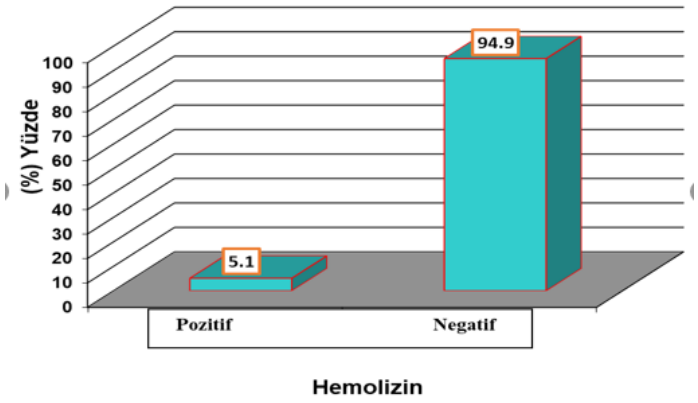
4.5 Kanlı Agarda Hemolizin Üreten *E.Coli* İzolatlarının Görüntülenmesi

Mevcut çalışmada E.coli izolatlarının hemolizin üretimi tespit edilmiştir. Sonuç, *E.coli*'nin 93 (%37,5) izolatından 5 (%5,1)'inin Şekil 4.8'de gösterildiği gibi insan kanlı agar üzerinde hemolizin üretebildiğini, oldukça anlamlıydı (79,02, p≤0,0001) Ek 7'deki *E.coli*'nin 88 (%94,9) izolatının hemolizin üretme yeteneğinin olmadığını doğrulamıştır. Şekil 4.10, UPEC arasındaki hemolitik aktivite yüzdesini göstermektedir.

Aslında hemolizin, büyümenin log fazı sırasında genellikle hücre dışı ortama salınan patojenik bakteriler tarafından üretilen hücreye zarar veren protein toksinleri olarak kabul edilir. Birçok *E. coli* suşu, kanlı agardaki bakteri kolonilerini çevreleyen hemoliz bölgesinden sorumlu olan bir hemolizin üretir (Al-Hasson 2010). Gerçekten de, *Escherichia coli* hemolizin, monositler ve makrofajlar için sitotoksik bir ajan olarak temsil edilir (Şekil 4.9) ve onları otolize ve ölüme götürür (Abe *et al.* 2008).



Şekil 4.8 A)Quadrant sürme yöntemi ile kanlı agarda hemolitik aktivite oluşturan E.coli'nin bakteri üremesi. B)E.coli'nin, sürekli (basit) sürme yöntemiyle kanlı agar üzerinde hemoliz bölgeleri oluşturan büyük yassı koloniler göstermesi.



Şekil 4.9 Hemolizine göre örnek çalışmanın dağılımı.

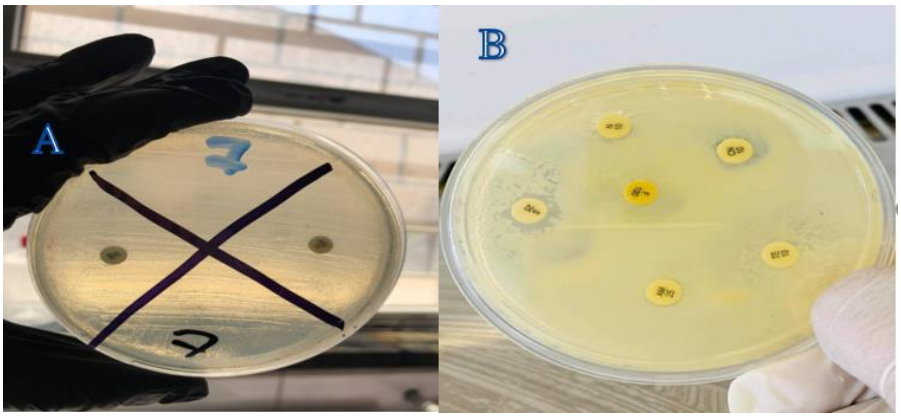
4.6 UPEC İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı

Bu çalışmada; Aminoglikozitler, Kinolonlar, Aminopenisilin, Nitrofuranlar, β-Laktamaz inhibitörü, Tetrasiklinler ve Sefalosporin III gibi farklı sınıflardan 10 antibiyotik kullanılmıştır. Anti-disk çevresindeki sönümleme alanının çapı ölçülerek gösterilen test sonuçları ve antibiyotiklere duyarlılık, Muller-Hinton agar üzerinde CLSI (Weinstein 2019) kriterlerine göre belirlenmiştir.

Sonucumuz maksimum antibiyotik direncinin Ampisilin ve Amoksisilin / klavulanik asit olduğunu göstermiş olup, Şekil 4.10'da gösterildiği gibi yüksek bir yüzde (%100) kaydetmiştir.

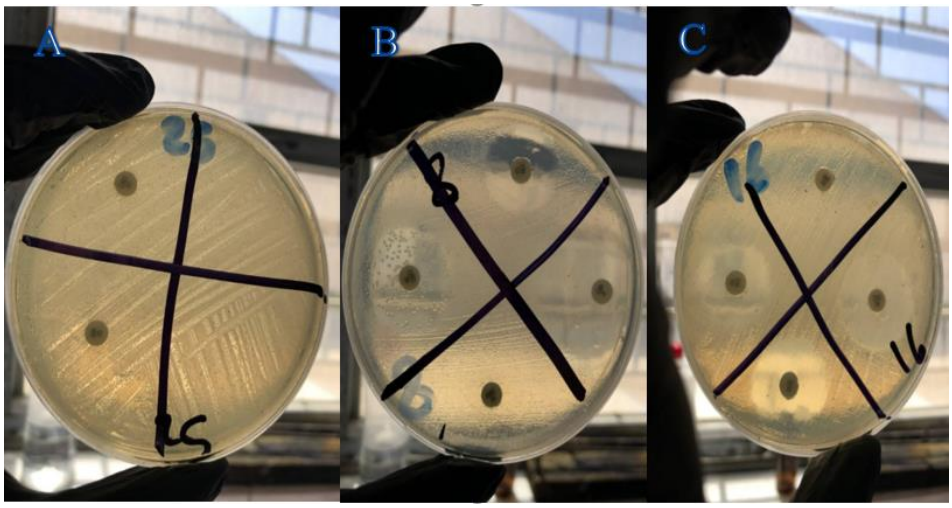
Aminopenisilinler, penisilin ailesindeki bir antibiyotik grubudur. Bu grup, yapısının merkezinde nitrojen bulunan ve bu antibiyotik grubunun antibakteriyel aktivitesi için kritik olan dört membranlı bir β-laktam halkası ile ayırt edilir. Ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, aminopenisilinlerin iki örneğidir. Amoksisilin bazen bir β laktamaz inhibitörü olan klavulanik asit ile birleştirilir. Bu kombinasyon, mikroorganizmalara karşı etki spektrumunu arttırır ve beta-laktamaz üretiminin aracılık ettiği bakteriyel antibiyotik direncinin üstesinden gelmeye yardımcı olur. Klavulanik asit, *Streptomyces clavuligerus* kaynaklı bakteriyel β-laktamaz enziminin bir intihar inhibitörüdür. Tek başına alındığında çoğu organizmaya karşı yalnızca zayıf antibakteriyel aktiviteye

sahiptir. Ancak β-laktam antibiyotiklerle birlikte uygulandığında mikrobiyal laktamazlar tarafından antimikrobiyallerin inaktivasyonunu önler. Bunu, β-laktamazı geri döndürülemez şekilde bağlayarak ve inhibe ederek, β-laktam antibiyotiklerin β-laktamaz dirençli bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesinin restorasyonuyla sonuçlanmasıyla gerçekleştirir. Ayrıca, β-laktamazın inaktive edilmesiyle birlikte penisilin daha etkili hale getirilebilir (Dowling *et al.* 2017).



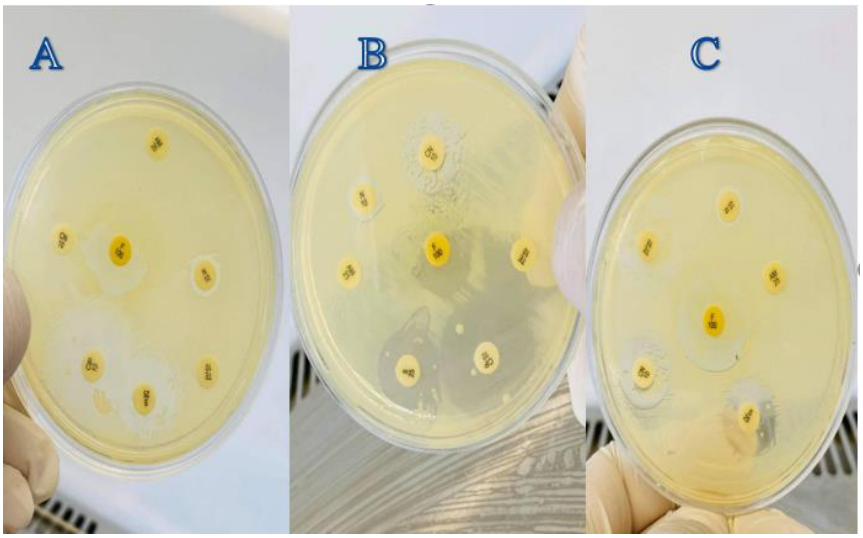
Şekil4.10 A)E.coli'nin Muller-Hinton agar üzerinde tek başına Ampisilin (AM) ve Amoksisilin / klavulanik asit (AMC) antibiyotiklerine direnci. B) Muller-Hinton agar üzerinde diğerlerine ek olarak E.coli'nin Ampisilin antibiyotiklerine direnci (kendi koleksiyonu)

Benzer şekilde, Şekil 4.11'de gösterildiği gibi Ceftriakson'a karşı direnç %72,03 olmuş ancak bu sonuç, UPEC izolatlarının seftriaksona (%80,5) dirençli olduğunu gösteren (Dadi 2020) tarafından yapılan çalışmanın sonucuyla uyuşmamaktadır. Sefalosporinler β-laktam antibiyotiklerdir. Yapısal olarak, fonksiyonel olarak aminopenisilin ile yakından ilişkilidirler. Aynı etki mekanizmalarını, direnç mekanizmalarını ve sefalosporinlerin diğer bazı özelliklerini paylaşırlar. Ayrıca, üçüncü kuşak sefalosporinler, önceki kuşaklarla karşılaştırıldığında, özellikle β-laktamaz içerenler olmak üzere gram-negatif organizmalara karşı daha fazla in vitro aktiviteye sahiptir (Dowling *et al*. 2017). Örneğin, bu üretici seftriakson antibiyotik, *E. coli* gibi Enterobacteriaceae'nin neden olduğu istilacı enfeksiyonları tedavi etmek için sıklıkla kullanılır (Chua *et al.* 2019).



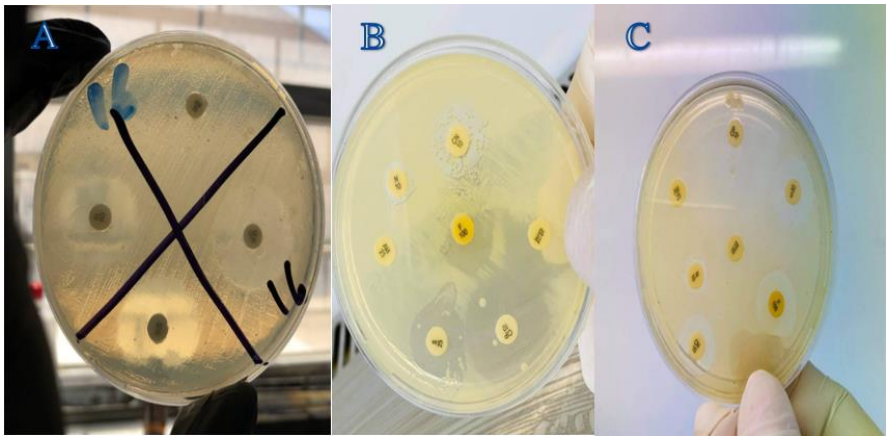
Şekil4.11 A) Muller - Hinton agar üzerinde E. coli izolatlarının Ceftriaxone (CRO) antibiyotiklerine karşı yüksek direnci. B) E.coli izolatlarının Muller-Hinton agar üzerinde Ceftriaxone (CRO) antibiyotiklerine orta düzeyde direnci. C) Muller-Hinton agar üzerinde E.coli izolatlarının Ceftriaxone (CRO) antibiyotiklerine duyarlılığı (kendi koleksiyonu).

Ayrıca, Şekil 4.12'de gösterildiği gibi, tetrasikline direnç oranı %80,3 olup bu (Mortazavi-Tabatabaei *et al.* 2019) tarafından tetrasiklin direncini (%71) gösteren çalışmaya yakındır. Tetrasiklinler, duyarlı organizmanın 30S ribozomal alt birimine bağlanarak antibakteriyel aktivite gösterirler. Ribozoma bağlandıktan sonra tetrasiklin, aminoasil-tRNA'nın RNA molekülüne/ribozomal kompleksine bağlanmasına müdahale eder. Bu bakteriyel protein sentezini bozar. Tetrasiklin mitokondrideki 70S ribozomlarına bağlanır ve mitokondriyal protein sentezini de bloke edebilir. Tetrasiklin antibakteriyeldir ve bakteri üremesine karşı büyük etkisi vardır. Tetrasiklin, çok çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakteriyel enfeksiyonlar için kullanılan geniş spektrumlu bir antimikrobiyaldir (Dowling *et al.* 2017).



Şekil4.12 A) E. coli izolatlarının Muller - Hinton agar üzerinde Tetrasiklin (TE) antibiyotiklerine karşı yüksek direnci. B) E.coli izolatlarının Muller-Hinton agar üzerinde Tetrasiklin (TE) antibiyotiklerine orta düzeyde direnci. C) E.coli izolatlarının Muller-Hinton agar üzerinde Tetrasiklin (TE) antibiyotiklerine duyarlılığı. (kendi koleksiyonu).

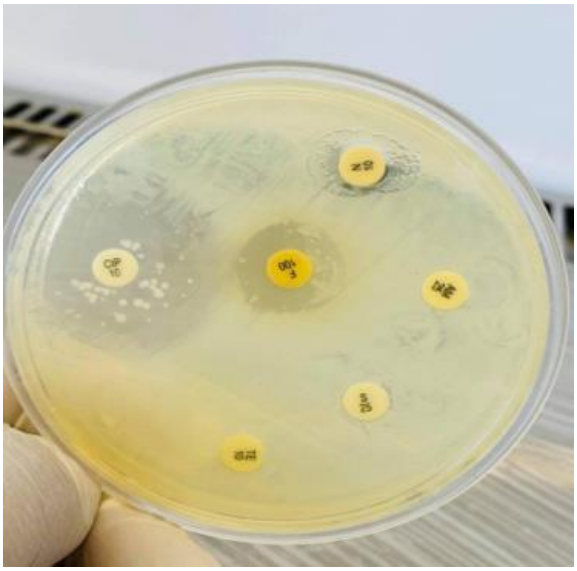
Aminoglikozid antibiyotikler arasında, amikasine duyarlılık oranı %86.9, streptomisine %63,17 ve gentamisine %57,98 olmuştur (Kwami 2020) tarafından yapılan çalışmaya göre de *E.coli* izole türlerinin streptomisine %43,6, gentamisin'e %28,2 ve amikasin'e %12,8 dirençli olduğunu gösterilmiştir. Bu yaklaşık olarak Şekil 4.13'de gösterilen sonucumuzla uyumludur. Gram-negatif bakterilerde aminoglikozitlere direnç, temel olarak aminoglikozit değiştirici enzimlerin (AME'ler) üretimi veya ribozomun 16S rRNA metiltransferazlar (RMTazlar) tarafından modifikasyonundan kaynaklanır. Hedef bölgenin modifikasyonu, amikasin, gentamisin'e karşı yüksek düzeyde direnç ile sonuçlanarak elde edilebilir. Aminoglikozit fosfotransferazlar arasında, dünya çapında en yaygın olarak *E. coli*'de karşılaşılır. Streptomisine karşı dirence aracılık ederler ve sıklıkla benzersiz bir mobil motifle ilişkilendirilirler (Poirel *et al.* 2018).



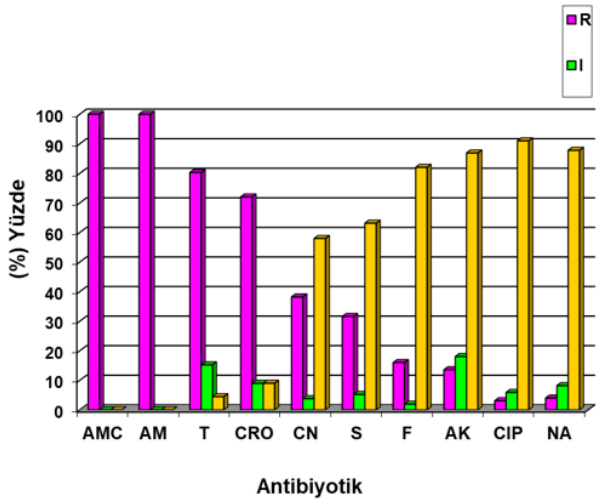
Şekil4.13 A) E. coli izolatlarının Muller - Hinton agar üzerinde Amikasin (AK) antibiyotiklerine duyarlılığı. B) E.coli izolatlarının Muller-Hinton agar üzerinde Streptomisin (S) antibiyotiklerine duyarlılığı. C) E.coli izolatlarının Muller-Hinton agar üzerinde Gentamisin (CN) antibiyotiklerine duyarlılığı. (kendi koleksiyonu).

Dikkate değer bir şekilde, *E. coli*'ye karşı en etkili antibiyotikler siprofloksasin ve nalidiksik asit gibi kinolonlar olmuştur. Bu antibiyotiklere karşı UPEC duyarlılık oranı Şekil 4.14'de gösterildiği gibi sırasıyla %91 ve %87,8'dir. Ayrıca Şekil 4.15'de gösterildiği gibi nitrofurantoine duyarlılık %82,05 olmuştur.

Florokinolonlar, dar bir aktivite spektrumu sergileyen nalidiksik asit ve siprofloksasin gibi geniş spektrumlu antibakteriyel ajanların önemli bir sınıfıdır. Kinolonlar, bakteri canlılığı, DNA giraz ve topoizomeraz IV aktiviteleri için gerekli olan iki enzimin aktivitesini inhibe eder (Fàbrega *et al*. 2009). UPEC'in antimikrobiyal duyarlılığı Şekil 4.15'de gösterilmiştir. Ayrıca, Ki-kare testi P-değeri Ek 8'de gösterildiği gibi ($P \leq 0,01$) olmuş ve bu sonuç, UPEC bakterilerinin antibiyotik duyarlılık testine göre anlamlı bir orana sahip olduğu anlamına gelmektedir.



Şekil 4.14 E.coli'nin Muller-Hinton agar üzerinde Siprofloksasin (CIP) ve Nalidiksik asit (N) antibiyotiklerine duyarlılığı (kendi koleksiyonu).



Şekil4.15 UPEC izolatlarının Antibiyotik Duyarlılığına göre örnek çalışmanın dağılımı. (R: dirençli; I: orta; S: duyarlı) CRO = Seftriakson, AK =Amikasin, CIP=Siprofloksasin, CN = Gentamisin, F=Nitrofurantoin, AM=Ampisilin

4.7 Moleküler Analiz Çalışması

4.7.1 UPEC izolatlarının DNA konsantrasyonu

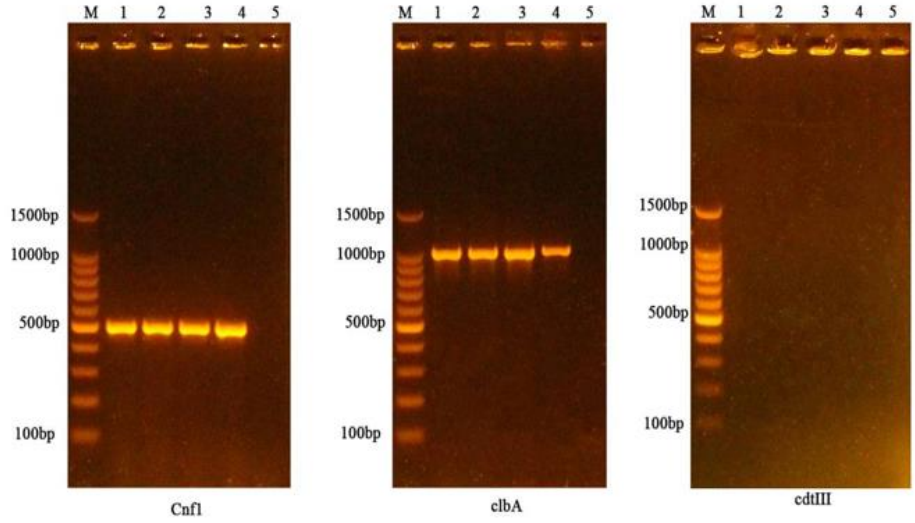
Hemolitik aktivite üreten beş UPEC izolatından DNA ekstrakte edildi ve saflığı ve konsantrasyonu nanodrop ile doğrulandı. DNA saflığı 1,8-2 arasında ve konsantrasyonu ise 50-360 mg/μL arasında olmuştur. DNA'nın saflığı, ekstraksiyon işleminin iyi bir göstergesi olmakla beraber işlemi engelleyebilecek safsızlıkların olmadığını doğrulamaktadır (Wilfinger *et al.* 2006).

4.7.2 Hemolizin üreten UPEC izolatlarında virülans genlerinin (Cnf 1, cdtIII ve clbA) prevalansı

Bu çalışmada, beş hemolitik üropatojenik Escherichia coli (UPEC) izolatında (H22, H33, H40, H48 ve H53) üç virülans geni olan cnf 1, cdtIII ve clbA'nın prevalansı araştırıldı. Bu izolatlardan dördü (H22, H40, H48) ve H53), genleri (cnf 1 ve clbA) kodlayan toksinleri barındırır. Bir izolat (H33) her iki gen, cnf1 ve clbA için negatifti, oysa beş izolatın hepsinde cdtIII geni yoktu. Ayrıca Hemoliz Üreten UPEC izolatlarında cdtIII genine (%0) göre cnf1 ve clb genleri (%80) daha yüksek oranda bulunmuştur (Şekil 4.16) (13,58, $p \leq 0,01$) Ek 9.

Kolibaktin ve *Cnf1* (Cnfs toksinler grubunun alt kümesi) yaygın virülans belirleyicileridir ve neredeyse yalnızca ekstra bağırsak patojenik *E. coli*'yi (ExPEC) içeren *E. coli* filogrup B2 ile sınırlıdır. Ekzotoksinleri ve kolonizasyon faktörlerini kodlayan genler, kromozomal DNA'nın patojenite adaları (PAI'ler) adı verilen bir bölgesinde bulunur. PAI V, alfa-hemolizin (Hly) operonu ile Pap (prs) ile ilgili genleri kodlayan adezinler arasında yer alan *cnf1* genini içerir. hlyCABD operonunu ve sitotoksik nekrotizan faktör 1'i barındıran poliketid sentaz (pks) genomik adası ve patojenite adası II (PAI II), kadınlarda sistite, prostatit, piyelonefrit ve ürosepsise neden olan UPEC türleri arasında en sık görülen PAI'lerdir. Bu patojenite adaları, kolorektal karsinom hastalarının (CRC) kolonunu kolonize eden mikrobiyota *E. coli* arasında da

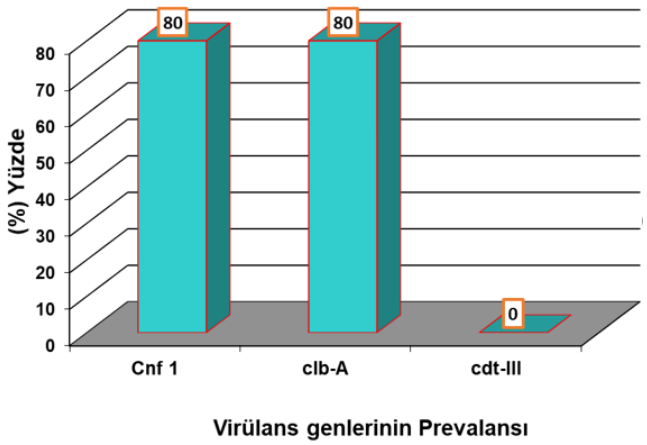
yaygındır. CNF1- üreten *E. coli* suşları, yukarı akışta *cnf1* geninde hemolizin (*hly*) genini içerir. CNF1, *Hly* hemolizin ile birlikte, bakterilere fayda sağlayan virülans mekanizmasında yer almaktadır. CNF1, herhangi bir sinyal dizisi içermez ve bu nedenle tip 2 salgılama sistemi tarafından salgılanmaz. *E. coli*'li hastalarda anti-CNF1 antikorları bulunduğundan, CNF1 in vivo (insan vücudunda) salgılanır, CNF-1 üretimi idrar yolu hastalıklarının patogenezinde artan virülans ile ilişkilidir ve ayrıca konakçının inflamatuar yanıtını artırabilir.



Şekil4.16 %1.5 agaroz jel üzerinde Hemoliz Üreten UPEC İzolatlarında virülans toksin genleri (Cnf1, clb ve cdtIII). M: Merdiven, Şerit 1-5: UPEC İzolatları Üreten Hemolisin H22, H33, H40, H48 ve H53.

UPEC'de bu gen ile ilgili birçok çalışma ile karşılaşılmıştır. (Morgan *et al*. 2019), tarafından yapılan çalışmaya göre 125 izolattan sadece 21'i (%16,8) hemolitikken, bu izolatların 10'u (%47,62) *cnf 1* ve *clbA* genlerini kodlayan toksinleri barındırmıştır. Guneri et al. (2020), 645 klinik örneğin 156'sında (%24) en az 1 virülans gen pozitif bulunduğunu göstermiştir. Bu örneklerin yüz ondörtünde (%18) sadece CNF, otuz altısında (%5,4) ö sadece CDT (*cdt3*) geni tespit edilmiş ve altısında (%0,9) her iki toksin faktörü (*CDT* ve *CNF*) mevcuttu. Üriner sistemde *cnf* gen ailesi oranı %20, *cdt* gen ailesi için oran %3 olmuştur. Bu sonuçlar, çalışmamızın sonucuyla uyumlu kanıtlar sunmaktadır (Şekil 4.17). Ki-kare testinde de Ek 10'da gösterildiği gibi P değeri

(P≤0,01) olmuştur. Bu durum, hemolizin üreten UPEC izolatları arasında virülans genlerinin (Cnf1 ve clbA) bozulmasının oldukça anlamlı olduğunu göstermektedir.



Şekil4.17 Hemolizin Üreten UPEC izolatlarında toksin genlerinin (Cnf 1, cdtIII ve clbA) prevalansı.

4.7.3 UPEC izolatlarında küçük regülatör RNA, RfaH ve virülans genlerin, hly ve cnf1'in ifadesi

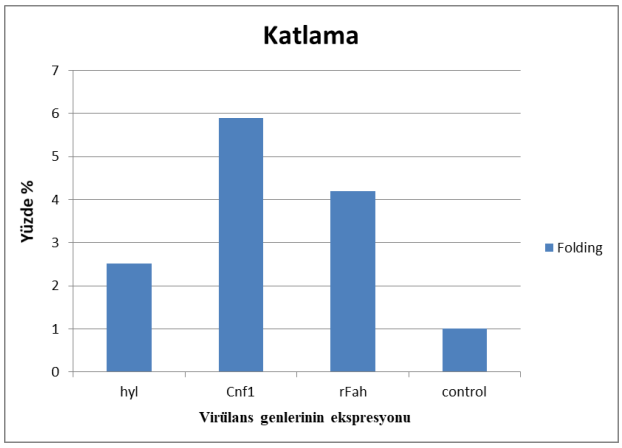
Küçük regülatör RNA, *RfaH*, hemolizin geni, *hly* ve sitotoksik nekrotizan faktör gen, *cnf1*, güçlü hemolitik aktiviteye sahip (H22) olduğu ve hemolizin üretimi olmayan UPEC izolatı H61 (kontrol olarak), RT-qPCR ile tespit edildi.

Şekil 4.18'deki sonuçlar hemolizin ekspresyon geni, *Hly*, kontrol ile karşılaştırıldığında iyi bir ifade elde edildi. Katlama değeri sırasıyla anlamlı farklılıklar ile 2,51 ve 1,00 idi (0,65, p≤0,05) (Ek 11). Bu sonuç, UPEC izolatı H22'nin hemolizin üretmesi için kabiliyetini doğrulamıştır. Ek olarak, hemolizin üreten UPEC izolatı H22'de yüksek oranda *cnf1* ekspresyonu tespit edildi, kontrol ile karşılaştırıldığında, katlama değeri sırasıyla 5,89 ve 1,00 idi (1,073, P≤0,01) (Ek 11).

Ayrıca, Isolate H22'deki *RfaH* geninin ekspresyonu, kontrolle karşılaştırıldığında yüksek ekspresyon gösterdi. Katlama değeri anlamlı farklılıklarla sırasıyla 4,19 ve 1,00 idi (0,98, p≤0,01) (Ek 12).

Bu bulgu, sistematik olarak toksin faktörü geninin, *cnf1*'in, E.coli izolatlarındaki *Hly* geninin sistematik olarak birliğini doğrulamaktadır ve bu korelasyon, bakterileri daha virülalı hale getiren küçük kodlama olmayan RNA (RfaH) tarafından düzenlenmektedir. Aslında, hemolisin operonu, *cnf1* geninden yukarı akmaktadır (Bonacorsi *et al*. 2000). Diğer çalışmalar (Blum *et al*. 1995, Swenson *et al*. 1996), *E. coli* K1 suşunda aynı *hly* ve *cnf1* ile aynı ilişkiyi göstermiştir.

UPEC suşlarının CNF1 toksini için pozitif olduğu gerçeği, hemolisin üretimidir (Blanco *et al.* 1992, Landraud *et al.* 2000) ve bu birleşme regülatör gen *RfaH* sayesinde korunabilir. *Cnf1* ve *Hly* genlerinin birleşmesi, konakçıda bakteriyel içselleştirme ve çoğalma için gerekli olabilir. *Cnf1* bakteriyel içselleştirmeye izin verir (Falzano *et al.* 1993). Listeriolizin için bildirildiği gibi konakçı hücre Rho GTPazların aktivasyonu yoluyla fagolizozomunun rüptürüne neden olur(Landraud *et al.* 2003).



Şekil4.18 Virülans genlerinin (Hly ve CNF 1) ve hemolizin üreten UPEC izolatı H22'nin hemolizin üreten yalıtlı H61'e kıyasla kontrol olarak hemolizin üreten UPEC izolatıdaki küçük regülatör RNA (RfaH) ekspresyonu.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonuçlarından, *E.coli*'nin İYE'ye neden olan diğer patojenik bakteri türleri arasında en baskın izolat olduğu sonucuna varılabilir. Cinsiyet ve yaş risk faktörleri olarak kabul edilir. Çünkü kadınlar ve çocuklar İYE'lere erkeklere göre daha duyarlıdır. Ayrıca UPEC izolatlarının ampisilin ve amoksisilin/klavulanik aside karşı yüksek antibiyotik direnci gösterdikleri ancak siprofloksasine duyarlı oldukları görülmüştür.

Hemolitik aktivite ile İYE'lerde bakterileri daha patojenik enfeksiyon yapan bazı virülans toksin genlerinin prevalansı arasında bir bağlantı vardır. Ayrıca, *cnf1* toksin geni, *hly* geni ile sistematik olarak ilişkilidir ve kodlama yapmayan küçük RNA, RfaH, hem *cnf1* hem de *hly* genlerinin düzenlenmesinden sorumludur.

UPEC izolatlarında virülans faktörlerinin düzenlenmesinde küçük RNA'ların rolünü kanıtlamak için biyoinformatik analiz yapılması önerilebilir. Ayrıca, bu virülans faktörlerinin konakçı genetik veya epigenetik mekanizmaların modülasyonundaki rolü incelenmelidir.

KAYNAKLAR

Abdallah, M. S., Mustapha, T., Gambo, A., and Ishaq, S. 2016. Biochemical identification and cultural characterization of some Gram-negative bacteria obtained from fecal/Diarrhoeal samples. *Cibtech Journal of Microbiology An Online International Journal*., *5*: 17-24.

AbdElmajed, A. A. M., Alnoor, E. M., Siddig, E., Ahmed, K. O., & Joubara, S. J. 2014. *Antimicrobial Susceptibility of E. coli and Klebsiella spp. Isolated From Leafy Green Vegetables* (Doctoral dissertation, university of khartoum).

Abe, C.M., Salvador, F. A., Falsetti, I. N., Vieira, M. A., Blanco, J., Blanco, J. E. and Machado, A.M. Elias 472 WP, Hernandes RT, Gomes TA. 2008. Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) strains may carry 473 virulence properties of diarrhoeagenic E. coli. *FEMS Immunol Med Microbiol*., *52*: 397-406.

Adlan, A. H., Alobaid, A., El Nima, E. I., Waggiallah, H. A., and Eltayeb, L. B. 2021. Antimicrobial Susceptibility Pattern for Community-Acquired Uro-pathogens among UTI Geriatric Patients. International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences., 10: 1.

Åhman, J., Matuschek, E., & Kahlmeter, G. 2019. The quality of antimicrobial discs from nine manufacturers—EUCAST evaluations in 2014 and 2017. *Clinical Microbiology and Infection*, *25*(3), 346-352.

Ahumada-Santos, Y. P., Báez-Flores, M. E., Díaz-Camacho, S. P., de Jesús Uribe-Beltrán, M., Eslava-Campos, C. A., Parra-Unda, J. R. and Delgado-Vargas, F. 2020. Association of phylogenetic distribution and presence of integrons with multidrug resistance in Escherichia coli clinical isolates from children with diarrhoea. Journal of infection and public health., 13: 767-772.

Al-Guranie, D. and Al-Mayahie, S. 2020. Molecular Detection and Characterization of Escherichia coli ST131 among Uropathogenic E.coli: A comparision study. M.Sc. Thesis, College of science, University of Wasit, Iraq.

AL-Hasson, H. F. A. A. 2010. Characterization and Partial Purification of Hemolysin Produced by Uropathogenic Escherichia coli. M. Sc. Thesis. College of Medicine, University of Babylon. Iraq.86.

Aljebory, I. S. and Mohammad, K. A. 2019. Molecular Detection of Some Virulence Genes of Escherichia coli Isolated from UTI Patients in Kirkuk City, Iraq. Journal of Global Pharma Technology., 11: 349-355.

AL-Oqaili, N. A. D. 2020. Genotypic Description of Certain Virulence Factors in Isolated Strains of Escherichia Coli in Women with Urinary Tract Infection. Annals of Tropical Medicine and Public Health., 23: 23-1147.

AL-Tememy, A. H. 2014. Dissemination of IRs of Escherichia coli isolated from patients with Urinary Tract Infection in Hilla City. M. Sc. Thesis. College of Medicine, University of Babylon. Iraq.

Angshumanjana, Anirbanjana, Dipjitdey, Arijitmajumdar, Jayantabikashdey and Nikhil Tudu. 2016. Selection of Storage Methods for Maintenance of Different Stock Cultures.Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci., 5: 1097-1104.

Arrieta-Ortiz, M. L. Hafemeister, C. Shuster, B. Baliga, N. S. Bonneau, R. and Eichenberger, P. 2020. Inference of bacterial small RNA regulatory networks and integration with transcription factor-driven regulatory networks. Msystems., 5: e00057-20.

Arthur, M. I. C. H. E. L., Johnson, C. E., Rubin, R. H., Arbeit, R. D., Campanelli, C., Kim, C. and Goldstein, R. 1989. Molecular epidemiology of adhesin and hemolysin virulence factors among uropathogenic Escherichia coli. Infection and immunity., 57: 303-313.

Atlas, R. M., Alfred, E. B. and Lawrence, C. P. 1995. Laboratory Manual of Experimental Microbiology. Mosby-year.

Awad, M. M., Mowafy, A. M. and Osman, Y. A. 2020. Characterization and Differentiation of some Clinical Isolates from Urine. *International Journal of Progressive Sciences and Technologies*., *23*: 390-396.

Bailey, M. J. Hughes, C. and Koronakis, V. 1997. RfaH and the ops element, components of a novel system controlling bacterial transcription elongation. Molecular microbiology., *26*: 845-851.

Bailey, M. J., Hughes, C. and Koronakis, V. 1996. Increased distal gene transcription by the elongation factor RfaH, a specialized homologue of NusG. Molecular microbiology., *22*: 729-737.

Baron, E. J., Peterson, L. R. and Finegold, S. M. 1994. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 9th Ed. The C.V. Mosby Company, U.S.A.

Begadiya, H., Nayak, J., Mathakiya, R., Parmar, B. and Solanki, K. 2018. Isolation, Biotyping and Serotyping of Escherichia coli Isolated from Fresh Water Fish. Biosciences., 3572.

Behzadi, P. 2018. Uropathogenic Escherichia coli and fimbrial adhesins virulome. Urinary Tract Infection: The Result of the Strength of the Pathogen, or the Weakness of the Host. Croatia: InTechOpen., 65-83.

Benson, R.H. 1998. Microbiological application: laboratory manual in general microbiology .17th ed. WB; M.C. Graw HILL.

Beveridge, T. J., Lawrence, J. R., & Murray, R. G. 2007. Sampling and staining for light microscopy. *Methods for general and molecular microbiology*, 19-33.

Bhatia, R.; and Ichhpujani, R. L. 2008. Essentials of Medical Microbiology (4th . Ed., Part 2).

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

Blanco J., Blanco M., Alonso M.P., Blanco J.E., Gonzalez E.A., Garabal J.I. 1992. Characteristics of haemolytic Escherichia coli with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). Res Microbiol., 143: 869–878.

Blum, G., Falbo, V., Caprioli, A. and Hacker, J. 1995. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and α-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic Escherichia coli strain J96. FEMS Microbiology Letters., 126: 189-195.

Bonacorsi, S. P. P., Clermont, O., Tinsley, C., Le Gall, I., Beaudoin, J. C., Elion, J. and Bingen, E. 2000. Identification of regions of the Escherichia coli chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. Infection and immunity., 68: 2096-2101.

Bonkat, G., Pickard, R., Bartoletti, R., Bruyère, F., Geerlings, S., Wagenlehner, F. and Veeratterapillay, R. 2018. Urological infections. Arnhem: European Association of Urology.

Breland, E. J., Eberly, A. R. and Hadjifrangiskou, M. 2017. An overview of two-component signal transduction systems implicated in extra-intestinal pathogenic E. coli infections. Frontiers in cellular and infection microbiology., 7: 162.

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

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

Cock, I., Mavuso, N. and Van Vuuren, S. 2021. A Review of Plant-Based Therapies for the Treatment of Urinary Tract Infections in Traditional Southern African Medicine. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

Collee, J. G., Miles, R. S. and Watt, B. 1996 Tests for identification of bacteria Mackieand McCartney, practical medical microbiology, Churchil Livingston., 14: 131-149.

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

Daga, A. P., Koga, V. L., de Matos, C. M., Perugini, M. R. E., Pelisson, M. Kobayashi, R. K. T. and Vespero, E. C. 2019. Escherichia coli bloodstream infections in patients at a university hospital: virulence factors and clinical characteristics. Frontiers in cellular and infection microbiology., 9: 191.

Dale, A. P. and Woodford, N. 2015. Extra-intestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC): disease, carriage and clones. Journal of Infection., *71*: 615-626.

DeBoy, J. M., Wachsmuth, I. K. and Davis, B. R. 1980. Hemolytic activity in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of Escherichia coli. Journal of Clinical Microbiology., 12: 193-198.

Derakhshan, S., Farhadifar, F., Roshani, D., Ahmadi, A. and Haghi, F. 2019. Study on the presence of resistant diarrheagenic pathotypes in Escherichia coli isolated

from patients with urinary tract infection. Gastroenterology and hepatology from bed to bench., 12: 348.

Desvaux, M., Dalmasso, G., Beyrouthy, R., Barnich, N., Delmas, J. and Bonnet, R. 2020. Pathogenicity factors of genomic islands in intestinal and extraintestinal Escherichia coli. Frontiers in Microbiology, 11.

Dhar, A. K., Roux, M. M., & Klimpel, K. R. 2002. Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry. *Journal of virological methods*, *104*(1), 69-82.

Diallo, I. and Provost, P. 2020. RNA-sequencing analyses of small bacterial RNAs and their emergence as virulence factors in host-pathogen interactions. International journal of molecular sciences., 21: 1627.

Dowling, A., O'Dwyer, J. and Adley, C. 2017. Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs*., *1*: 536-545.

Eberspächer, B., Hugo, F. E. R. D. I. N. A. N. D., & Bhakdi, S. U. C. H. A. R. I. T. 1989. Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of Escherichia coli hemolysin. Infection and Immunity, 57(3), 983-988.

Ejrnæs, K. 2011. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by Escherichia coli. Dan Med Bull., 58: B4187.

Ekici, G., & Dümen, E. 2019. Escherichia coli and food safety. In *The Universe of Escherichia coli*. IntechOpen.

Elamary, R. B., Albarakaty, F. M. and Salem, W. M. 2020. Efficacy of Acacia nilotica aqueous extract in treating biofilm-forming and multidrug resistant uropathogens isolated from patients with UTI syndrome. Scientific Reports., 10: 1-14.

Elliott, S. J., Srinivas, S., Albert, M. J., Alam, K., Robins-Browne, R. M., Gunzburg, S. T. and Chang, B. J. 1998. Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic Escherichia coli linked to human diarrhea. Infection and immunity., *66*: 2040-2051.

Erol, B. Ü. L. E. N. T. Culpan, M. E. F. T. U. N. Caskurlu, H. Sari, U. Cag, Y. A. S. E. M. İ. N. Vahaboglu, H. and Caskurlu, T. U. R. H. A. N. 2018. Changes in antimicrobial resistance and demographics of UTIs in pediatric patients in a single institution over a 6-year period. *Journal of pediatric* n*urology*., *14*: 176-e1.

Etefia, E. U. and Ben, S. A. 2020. Virulence markers, phylogenetic evolution, and molecular techniques of uropathogenic Escherichia coli. Journal of Nature and Science of Medicine., 3: 13.

Fabbri, A., Gauthier, M. and Boquet, P. 1999. The 5′ region of cnf1 harbours a translational regulatory mechanism for CNF1 synthesis and encodes the cell-binding domain of the toxin. *Molecular microbiology., 33*: 108-118.

Fabian, N. J., Mannion, A. J., Feng, Y., Madden, C. M. and Fox, J. G. 2020. Intestinal colonization of genotoxic Escherichia coli strains encoding colibactin and cytotoxic necrotizing factor in small mammal pets. Veterinary microbiology., 240: 108506.

Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E. and Vila, J. 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial biotechnology*., *2*: 40-61.

Faïs, T., Delmas, J., Barnich, N., Bonnet, R. and Dalmasso, G. 2018. Colibactin: more than a new bacterial toxin. Toxins., 10: 151.

Falzano, L., Fiorentini, C., Donelli, G., Michel, E., Kocks, C., Cossart, P. and Boquet, P. 1993. Induction of phagocytic behaviour in human epithelial cells by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor type1. Molecular microbiology., 9: 1247-1254.

Farajzadeh-Sheikh, A., Savari, M., Ahmadi, K., Nave, H. H., Shahin, M. and Afzali, M. 2020. Distribution of genes encoding virulence factors and the genetic diversity of enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) Isolates from patients with diarrhea in Ahvaz, Iran. *Infection and drug resistance*., *13*: 119.

Fatima, R. and Aziz, M. 2020. Enterohemorrhagic Escherichia Coli (EHEC). *StatPearls.*

Flores-Encarnación, M., Nava-Nolazco, R. M., Aguilar-Gutiérrez, G. R., Espino-Benítez, A. S., Morales-Baéz, J. R. and Cabrera-Maldonado, C. 2019. The Survival Strategies of Uropathogenic Escherichia coli. Int J Cur Res Rev| Vol., 11: 6.

Forbes, B. A., Daniel, F. S. and Alice, S. W. 2007. Baily and Scott's Diagnostic microbiology. Mosby.

Galindo-Méndez, M. 2020. Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. E. Coli Infections-Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment., 1-20.

Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, *19*(6), 520-525.

Georg, J. and Hess, W. R. 2011. cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *75*(2), 286-300.

Geslain, G., Birgy, A., Adiba, S., Magnan, M., Courroux, C., Levy, C. and Bonacorsi, S. 2019. Genome sequencing of strains of the most prevalent clonal group of O1: K1: H7 Escherichia coli that causes neonatal meningitis in France. *BMC microbiology*., *19*: 1-8.

Ghajiri, H. A., Abdullah, R. A. S. H. A. Nasser, M. H. and Roomi, A. B. 2020. Isolation and diagnosis of some bacteria that cause urinary tract infection and the effect of some antibiotics on them in nasiriyah in the shattera general hospital. *Int J Pharm Res*., *12*: 1218-1224.

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

Gu, H., Cai, X., Zhang, X., Luo, J., Zhang, X., Cai, W. and Li, G. 2021. A bacterial" shield and sword": A previously uncharacterized two-component system protects uropathogenic Escherichia coli from host-derived oxidative insults and promotes hemolysin-mediated host cell pyroptosis. bioRxiv.

Guiral Vilalta, E. 2018. Interplay of virulence, antibiotic resistance and epidemiology in Escherichia coli clinical isolates.

Guneri, C. O., Koksal, F., Kizilyildirim, S., Bedir, B., & Nagiyev, T. 2020. The Distribution of Cytotoxic Necrotizing Factors (CNF-1, CNF-2, CNF-3) and Cytolethal Distending Toxins (CDT-1, CDT-2, CDT-3, CDT-4) in Escherichia coli Strains Isolated from Extraintestinal Infections and The Determination of Their Philogenetic Relationship by PFGE.

Harkes, G. D. J. F., Dankert, J., & Feijen, J. 1992. Bacterial migration along solid surfaces. *Applied and environmental microbiology*, *58*(5), 1500-1505.

Hassan, M. T., Ghaima, K. K., Abdulhassan, A. A. and Alwan, M. K. 2021. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Gram-negative Bacteria in Pediatric Patients with Urinary Tract Infections in Baghdad Hospitals, Iraq. Annals of the Romanian Society for Cell Biology., 25: 6102-6109.

Hebbelstrup Jensen, B., Olsen, K. E., Struve, C. ,Krogfelt, K. A. and Petersen, A. M. 2014. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative Escherichia coli. *Clinical microbiology reviews.*, *27*: 614-630.

Heil, E. L., & Johnson, J. K. 2016. Commentary: Impact of CLSI Breakpoint Changes on Microbiology Laboratories and Antimicrobial Stewardship Programs. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(4), 840-844.

Hidalgo, A. F. E., Gault, M. D. T., Cepeda, J. A. A., Buagas, M. J. C., Veloso, C. D. C., Bacus, H. H. R. and REY, H. A. 2021. A Case Study on a Pediatric Patient diagnosed with Urinary Tract Infection.

Hossain, M., Tabassum, T., Rahman, A., Hossain, A., Afroze, T., Momen, A. M. I. and Colwell, R. R. 2020. Genotype–phenotype correlation of β-lactamase-producing uropathogenic Escherichia coli (UPEC) strains from Bangladesh. *Scientific reports*., *10*: 1-13.

Huang, J. 2017. *Characterization of the A subunit epitopes in immunogenicity and enterotoxicity of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) heat-labile toxin* (Doctoral dissertation, Kansas State University).

Iqbal, W., Khattak, M., Ishaq, M., Rehman, A. and Ali, G. 2018. Investigation of bacteria liable for Urinary Tract Infections and their antibiogram analysis. Abasyn Journal of Life Sciences., 1: 26-35.

Javadi, K., Mohebi, S., Motamedifar, M. and Hadi, N. 2020. Characterization and antibiotic resistance pattern of diffusely adherent Escherichia coli (DAEC), isolated from paediatric diarrhoea in Shiraz, southern Iran. *New Microbes and New Infections*., *38*: 100780.

Johar, A., Al-Thani, N., Al-Hadidi, S., H. Dlissi, E., Mahmoud, M. H. and Eltai, N. O. 2021. Antibiotic Resistance and Virulence Gene Patterns Associated with Avian Pathogenic Escherichia coli (APEC) from Broiler Chickens in Qatar. Antibiotics., 10: 564.

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

Johnson, J. R., Scheutz, F., Ulleryd, P., Kuskowski, M. A., O'Bryan, T. T. and Sandberg, T. 2005. Phylogenetic and pathotypic comparison of concurrent urine

and rectal Escherichia coli isolates from men with febrile urinary tract infection. Journal of clinical microbiology., 43: 3895-3900.

Kamal, M. M. 2019. Effect of anandamide in mercuric chloride-induced nephrotoxicity in rats. CU Theses.

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

Kassim, A., Omuse, G., Premji, Z., & Revathi, G. 2016. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, *15*(1), 1-7.

Kathayat, D., Closs Jr, G., Helmy, Y. A., Lokesh, D., Ranjit, S. and Rajashekara, G. 2021. Peptides affecting outer membrane lipid asymmetry (MlaA-OmpC/F) system reduce avian pathogenic Escherichia coli (APEC) colonization in chickens. *Applied and Environmental Microbiology.*, AEM-00567.

Khan, G. M. 2013. *A research report on Prescribing and sensitivity patterns of antimicrobials in uncomplicated urinary tract infections in females*.

Khoo, L. L., Hasnah, Y., Rosnah, Y., Saiful, N., Maswati, M. A. and Ramlan, M. 2010. The prevalence of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) in Peninsular Malaysia. *Malays J Vet Res.*, *1*: 27-31.

Kolawole, A. S., Kolawole, O. M., Kandaki-Olukemi, Y. T., Babatunde, S. K., Durowade, K. A and Kolawole, C. F. 2009. Prevalence of urinary tract infections (UTI) among patients attending Dalhatu Araf Specialist Hospital, Lafia, Nasarawa State, Nigeria. International Journal of Medical Science., 1:163-167.

Kot, B. 2017. Virulence factors and innovative strategies for the treatment and control of uropathogenic Escherichia coli. Escherichia coli-Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications.

Kotłowski, R., Grecka, K., Kot, B. and Szweda, P. 2020. New approaches for Escherichia coli Genotyping. Pathogens., 9: 73.

Kudinha, T. 2012. Prevalence and significance of virulence genes in Escherichia coli isolates causing urinary tract infections (uropathogenic E. coli) (Doctoral dissertation, Charles Sturt University).

Kudinha, T. 2017. The pathogenesis of Escherichia coli urinary tract infection. Escherichia coli—Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications. InTech., 45-61.

Kurnick, S. A., Mannion, A. J., Feng, Y., Madden, C. M., Chamberlain, P. and Fox, J. G. 2019. Genotoxic Escherichia coli strains encoding Colibactin, Cytolethal Distending Toxin, and Cytotoxic necrotizing factor in laboratory rats. Comparative medicine., 69: 103-113.

Kwami, W. S., Dahab, R. A., Merghani, A. B., Gad-Alseed, R. H. and Hamad, M. N. M. 2020. Detection of Aminoglycosides Resistance among Strains of Escherichia Coli Isolated From Patients with Urinary Tract Infection.

Landraud L., Gibert M., Popoff M.R., Boquet P., Gauthier M. 2003. Expression of cnf1 by Escherichia coli J96 involves a large upstream DNA region including the hlyCABD operon, and is regulated by the RfaH protein. Mol Microbiol 47:1653–1667.

Landraud, L., Gauthier, M., Fosse, T. and Boquet, P. 2000. Frequency of Escherichia coli strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. Letters in applied microbiology., 30: 213-216.

Leeds, J. A. and Welch, R. A. 1997. Enhancing transcription through the Escherichia coli hemolysin operon, hlyCABD: RfaH and upstream JUMPStart DNA sequences function together via a postinitiation mechanism. *Journal of bacteriology*., *179*: 3519-3527.

Lemonnier, M., Landraud, L. and Lemichez, E. 2007. Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS microbiology reviews*., *31*: 515-534.

Li, M., Yang, F., Lu, Y. and Huang, W. 2020. Identification of Enterococcus faecalis in a patient with urinary-tract infection based on metagenomic next-generation sequencing: a case report. BMC infectious diseases., 20: 1-7.

Llorens-Rico, V., Cano, J., Kamminga, T., Gil, R., Latorre, A., Chen, W. H. and Lluch-Senar, M. 2016. Bacterial antisense RNAs are mainly the product of transcriptional noise. *Science advances*., *2*: e1501363.

Luna-Guevara, J. J., Arenas-Hernandez, M. M., Martínez de la Peña, C., Silva, J. L. and Luna-Guevara, M. L. 2019. The role of pathogenic E. coli in fresh vegetables:

Behavior, contamination factors, and preventive measures. *International journal of microbiology, 2019*.

Ma, L., Bajic, V. B. and Zhang, Z. 2013. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA biology*., *10*: 924-933.

MacFaddin, J. F. 2000. Individual biochemical tests. Biochemical tests for identification of medical bacteria., 3- 453.

MacFaddin, J. F. 2002. Biochemical Tests For Identification of Medical Bacteria, 3rd ed. The Williams and Willkins company London.

Madkour, A. Z. H. 2017. Studies on virulence-critical proteins of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) (Doctoral dissertation, Newcastle University).

Magliano, E., Grazioli, V., Deflorio, L., Leuci, A. I., Mattina, R., Romano, P. and Cocuzza, C. E. 2012. Gender and age-dependent etiology of community-acquired urinary tract infections. *The scientific world journal, 2012*.

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

Mare, A. D., Ciurea, C. N., Man, A., Tudor, B., Moldovan, V., Decean, L. and Toma, F. 2021. Enteropathogenic Escherichia coli—A Summary of the Literature. Gastroenterology Insights., 12: 28-40.

McCoy, C. S., Mannion, A. J., Feng, Y., Madden, C. M., Artim, S. C., Au, G. G. and Fox, J. G. 2021. Cytotoxic Escherichia coli strains encoding colibactin, cytotoxic necrotizing factor, and cytolethal distending toxin colonize laboratory common marmosets (Callithrix jacchus). Scientific reports., 11: 1-12.

Medina, M. and Castillo-Pino, E. 2019. An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. Therapeutic advances in urology., 11: 1756287219832172.

Meena, P. R., Yadav, P., Hemlata, H., Tejavath, K. K. and Singh, A. P. 2021. Poultry-origin extraintestinal Escherichia coli strains carrying the traits associated with urinary tract infection, sepsis, meningitis and avian colibacillosis in India. *Journal of Applied Microbiology*., *130*: 2087-2101.

Mellies, J. L. and Barron, A. M. 2006. Virulence gene regulation in Escherichia coli. *EcoSal Plus*., *2*: 1.

Mezerová, K., Starý, L., Zbořil, P., Klementa, I., Stašek, M., Špička, P. and Raclavský, V. 2021. Cyclomodulins and Hemolysis in E. coli as Potential Low-Cost Non-Invasive Biomarkers for Colorectal Cancer Screening. Life., 11: 1165.

Michaud, J. E., Kim, K. S., Harty, W., Kasprenski, M. and Wang, M. H. 2017. Cytotoxic Necrotizing Factor-1 (CNF1) does not promote E. coli infection in a murine model of ascending pyelonephritis. BMC microbiology., 17: 1-8.

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: 5869-5880.

Morgan, R. N., Saleh, S. E., Farrag, H. A. and Aboulwafa, M. M. 2019. Prevalence and pathologic effects of colibactin and cytotoxic necrotizing factor-1 (Cnf 1) in Escherichia coli: experimental and bioinformatics analyses. Gut pathogens., 11: 1-18.

Mortazavi-Tabatabaei, S. A. R., Ghaderkhani, J., Nazari, A., Sayehmiri, K., Sayehmiri, F. and Pakzad, I. 2019. Pattern of antibacterial resistance in urinary tract infections: A systematic review and meta-analysis. *International journal of preventive medicine, 10*.

Mühlen, S. and Dersch, P. 2015. Anti-virulence strategies to target bacterial infections. How to overcome the antibiotic crisis., 147-183.

Munshi, R., Talele, G. and Shah, R. 2020. Preparation and standardization of Escherichia coli nosodes sourced from select E. coli strains. *Homeopathy*.

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

Nagy, G., Dobrindt, U., Kupfer, M., Emödy, L., Karch, H. and Hacker, J. 2001. Expression of hemin receptor molecule ChuA is influenced by RfaH in uropathogenic Escherichia coli strain 536. *Infection and immunity*., *69*: 1924-1928.

Nagy, G., Dobrindt, U., Schneider, G., Khan, A. S., Hacker, J. and Emödy, L. 2002. Loss of regulatory protein RfaH attenuates virulence of uropathogenic Escherichia coli. *Infection and immunity*., *70*: 4406-4413.

Nas, F. S., Ali, M., Abdallah, M. S. and Zage, A. U. 2019. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of Escherichia coli isolated from urine samples of urinary tract infection patients. *ARC Journal of Urology*., *4*: 14-20.

Nascimento, J. A., Santos, F. F., Valiatti, T. B., Santos-Neto, J. F. M., Santos, A. C., Cayô, R. and AT Gomes, T. 2021. Frequency and Diversity of Hybrid Escherichia coli Strains Isolated from Urinary Tract Infections. *Microorganisms*., *9*: 693.

Natarajan, M., Kumar, D., Mandal, J., Biswal, N. and Stephen, S. 2018. A study of virulence and antimicrobial resistance pattern in diarrhoeagenic Escherichia coli isolated from diarrhoeal stool specimens from children and adults in a tertiary hospital, Puducherry, India. *Journal of Health, Population and Nutrition*., *37*: 1-11.

Nhu, N. T. K., Phan, M. D., Forde, B. M., Murthy, A. M., Peters, K. M., Day, C. J. and Schembri, M. A. 2019. Complex multilevel control of hemolysin production by uropathogenic Escherichia coli. Mbio., 10: e02248-19.

Nielsen, D. W., Ricker, N., Barbieri, N. L., Allen, H. K., Nolan, L. K. and Logue, C. M. 2020. Outer membrane protein A (OmpA) of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. *BMC research notes*., *13*: 1-7.

Nowicki, S., deLaurent, Z. R., de Villiers, E. P., Githinji, G. and Charles, K. J. 2021. The utility of Escherichia coli as a contamination indicator for rural drinking water: Evidence from whole genome sequencing. Plos one., 16: e0245910.

Ocampo, K., Riveros, M., Pinedo-Bardales, M., Ruiz, J. and Ochoa, T. J. 2021. Frequency of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATE) encoding genes in diffusely adherent escherichia coli (DAEC) isolates from children with and without diarrhea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*., *38*: 124-129.

OCHIEN, G., & Atieno, L. 2021. *Prevalence of enterotoxigenic escherichia coli among children for five years in Siaya County, western Kenya* (Doctoral dissertation, Maseno University).

Ochoa, T. J. and Contreras, C. A. 2011. Enteropathogenic E. coli (EPEC) infection in children. Current opinion in infectious diseases., 24: 478.

Odongo, I., Ssemambo, R. and Kungu, J. M. 2020. Prevalence of Escherichia Coli and its antimicrobial susceptibility profiles among patients with UTI at Mulago

Hospital, Kampala, Uganda. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases, 2020.

Oliva, G., Sahr, T. and Buchrieser, C. 2015. Small RNAs, 5′ UTR elements and RNA-binding proteins in intracellular bacteria: impact on metabolism and virulence. *FEMS microbiology reviews*., *39*: 331-349.

Olson, P. D. and Hunstad, D. A. 2018. APPENDIX TWO SUBVERSION OF HOST INNATE IMMUNITY BY UROPATHOGENIC ESCHERICHIA COLI. *Sex Differences in Uropathogenic Escherichia coli Urinary Tract Infection*, 217.

Owrangi, B., Masters, N., Kuballa, A., O'Dea, C., Vollmerhausen, T. L. and Katouli, M. 2018. Invasion and translocation of uropathogenic Escherichia coli isolated from urosepsis and patients with community-acquired urinary tract infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*., *37*: 833-839.

Ozkan, I. A., Koklu, M. and Sert, I. U. 2018. Diagnosis of urinary tract infection based on artificial intelligence methods. Computer methods and programs in biomedicine., 166: 51-59.

Pakbin, B., Brück, W.M. and Rossen, J. W. 2021. Virulence Factors of Enteric Pathogenic Escherichia coli: A Review. *International journal of molecular sciences*., *22*: 9922.

Papenfort, K. and Vanderpool, C. K. 2015. Target activation by regulatory RNAs in bacteria. *FEMS microbiology reviews*., *39*: 362-378.

Paris, D., Caltagirone, M., Minzulli, P., Valzano, A., Ferrara, F. E. O. and Magliano, E. 2020. Epidemiology and antibiotic resistance in community-acquired lower urinary tract infections in the Milan area. Microbiologia Medica., 35: 2.

Parvez, S. A. and Rahman, D. 2018. Virulence Factors of Uropathogenic E. coli. Microbiology of Urinary Tract Infections-Microbial Agents and Predisposing Factors., 7-21.

Peerayeh, S. N., Navidinia, M., Fallah, F., Bakhshi, B. and Jamali, J. 2018. Pathogenicity determinants and epidemiology of uropathogenic E. coli (UPEC) strains isolated from children with urinary tract infection (UTI) to define distinct pathotypes. *Biomedical Research*., *29*: 2035-2043.

Pluta, D. H. 2021. Characterization of Genetic Diversity within the FimH adhesin of Uropathogenic Escherichia coli and Phenotypic Outcomes in a Canine Model.

Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P. and Schwarz, S. 2018. Antimicrobial resistance in Escherichia coli. Microbiology Spectrum., 6: 6-4.

Pokharel, P., Díaz, J. M., Bessaiah, H., Houle, S., Guerrero-Barrera, A. L. and Dozois, C. M. 2020. The serine protease autotransporters tagb, tagc, and sha from extraintestinal pathogenic Escherichia coli are internalized by human bladder epithelial cells and cause actin cytoskeletal disruption. International journal of molecular sciences., 21: 3047.

Ponnusamy, P., Natarajan, V. and Sevanan, M. 2012. In vitro biofilm formation by uropathogenic Escherichia coli and their antimicrobial susceptibility pattern. Asian Pacific journal of tropical medicine., 5: 210-213.

Porumbel, I., Chelariu, M., Gheorghe, I., Curutiu, C., Popa, M., Delcaru, C. and Dimov, T. V. 2018. Genotypic characterization of virulence and resistance markers in ESBL positive Escherichia coli strains isolated from ambulatory urinary tract infections. Rom Biotechnol Lett., 23: 13572-80.

Pouladfar, G., Basiratnia, M., Anvarinejad, M., Abbasi, P., Amirmoezi, F. and Zare, S. 2017. The antibiotic susceptibility patterns of uropathogens among children with urinary tract infection in Shiraz. Medicine., 96: 37.

Prasad, B. and Arora, P. 2021. Antibiotic Susceptibility Profiling of Bacterial Biodiversity Associated with Urinary Tract Infections. World Scientific News., 155: 129-139.

Qadir, H. A. H., Abdulla, A. B. A. S. and Abduljabbar, H. N. (2018). Molecular Study of Virulence Factors of Escherichia coli Isolated from Patient with urinary tract infection in Wasit Province.

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

Riley, L. W. 2020. Distinguishing pathovars from nonpathovars: Escherichia coli. Microbiology Spectrum., 8: 8-4.

Robinson, D. A., Feil, E. J. and Falush, D. (Eds.). 2010. Bacterial population genetics in infectious disease. John Wiley and Sons. Inc. publication. p:269-280.

Ronald, A. 2002. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. The American journal of medicine., 113: 14-19.

Rubini, D., Varthan, P. V., Jayasankari, S., Vedahari, B. N. and Nithyanand, P. 2020. Suppressing the phenotypic virulence factors of Uropathogenic Escherichia coli using marine polysaccharide. Microbial pathogenesis., 141: 103973.

Saadi Al-Baer, A. and Hussein, A. A. 2017. Isolation and Identification of Escherichia coli Producing Cytosine Deaminase from Iraqi patients. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*., *4*: 1-6.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G. and Choroszy-Krol, I. 2019. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from different sources: recent reports. Gut pathogens., 11: 1-16.

SAS. 2012. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.

Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*., *3*: 1101-1108.

Schochetman, G., Ou, C. Y. and Jones, W. K. 1988. Polymerase chain reaction. *The Journal of infectious diseases*., *158*: 1154-1157.

Schulz, E., Schumann, M., Schneemann, M., Dony, V., Fromm, A., Nagel, O. and Bücker, R. 2021. Escherichia coli Alpha-Hemolysin HlyA Induces Host Cell Polarity Changes, Epithelial Barrier Dysfunction and Cell Detachment in Human Colon Carcinoma Caco-2 Cell Model via PTEN-Dependent Dysregulation of Cell Junctions. Toxins., 13: 520.

Segev, G. 2017. Chronic Urinary Tract Infection. Chronic Disease Management for Small Animals., 261.

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

Shaikh, N., Morone, N. E., Bost, J. E. and Farrell, M. H. 2008. Prevalence of urinary tract infection in childhood: a meta-analysis. *The Pediatric infectious disease journal*., *27*: 302-308.

Shareef, S. M. and Risan, M. H. 2021. EAS Journal of Biotechnology and Genetics.

Shi, Y., Tyson, G. W. and DeLong, E. F. 2009. Metatranscriptomics reveals unique microbial small RNAs in the ocean's water column. *Nature*., *459*: 266-269.

Singh, R., Upadhyay, S. K., Singh, M., Yadav, M., Kumar, V. and Sehrawat, N. 2019. A report on antibiotic susceptibility and resistance of pathogens causing urinary tract infection (UTI) to human patients. Bulletin of Pure and Applied Sciences-Zoology., 38: 170-176.

Smirnov, A., Förstner, K. U., Holmqvist, E., Otto, A., Günster, R., Becher, D. et al. 2016. Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 113: 11591–11596.

Smith, J. L., Fratamico, P. M. and Gunther, N. W. 2007. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli. *Foodborne pathogens and disease*., *4*: 134-163.

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. Journal of Pharmaceutical Research International., 1-11.

Sora, V. M., Meroni, G., Martino, P. A., Soggiu, A., Bonizzi, L. and Zecconi, A. 2021. Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. Pathogens., 10: 1355.

Storz, G., Vogel, J. and Wassarman, K. M. 2011. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. Molecular cell., 43: 880-891.

Swenson, D. L., Bukanov, N. O., Berg, D. E. and Welch, R. A. 1996. Two pathogenicity islands in uropathogenic Escherichia coli J96: cosmid cloning and sample sequencing. Infection and Immunity., 64: 3736-3743.

Taggart, J. C., Lalanne, J. B. and Li, G. W. 2021. Quantitative Control for Stoichiometric Protein Synthesis. *Annual review of microbiology*., *75*: 243-267.

Tan, C. W. and Chlebicki, M. P. 2016. Urinary tract infections in adults. Singapore medical journal., 57: 485.

Tang-Fichaux, M., Chagneau, C. V., Bossuet-Greif, N., Nougayrède, J. P., Oswald, É. and Branchu, P. 2020. The polyphosphate kinase of Escherichia coli is required for full production of the genotoxin colibactin. Msphere., 5: e01195-20.

Tóth, 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: 4285-4291.

Treuting, P. M. and Kowalewska, J. 2012. Urinary system. In Comparative Anatomy and Histology (pp. 229-251). Academic Press.

Trinquier, A., Durand, S., Braun, F. and Condon, C. 2020. Regulation of RNA processing and degradation in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*., *1863*: 194505.

Turunen, K., Antikainen, J., Lääveri, T., Kirveskari, J., Svennerholm, A. M. and Kantele, A. 2020. Clinical aspects of heat-labile and heat-stable toxin-producing enterotoxigenic Escherichia coli: a prospective study among Finnish travellers. *Travel medicine and infectious disease*., *38*: 101855.

Turyatunga, G. 2021. The Prevalence of Bacterial Pathogens associated with Urinary Tract Infection (UTI) among Patients attending Kam Medical Consult Clinic, Uganda. Student's Journal of Health Research Africa., 2: 8-8.

Updegrove, T. B., Zhang, A. and Storz, G. 2016. Hfq: the flexible RNA matchmaker. *Current opinion in microbiology*., *30*: 133-138.

Valiatti, T. B., Santos, F. F., Santos, A. C., Nascimento, J. A., Silva, R. M., Carvalho, E. and Gomes, T. A. 2020. Genetic and virulence characteristics of a hybrid atypical enteropathogenic and uropathogenic Escherichia coli (aEPEC/UPEC) Strain. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *10*.

Van Assche, E., Van Puyvelde, S., Vanderleyden, J. and Steenackers, H. P. 2015. RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria. *Frontiers in microbiology*., *6*: 141.

Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Rohner, P., Piot, P., Heuck, C. C. and Heuck, C. C. 2003. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology.2nd ed. World Health Organization.

Verma, V., Kumar, P., Gupta, S., Yadav, S., Dhanda, R. S., Thorlacius, H. and Yadav, M. 2020. α-Hemolysin of uropathogenic E. coli regulates NLRP3 inflammasome activation and mitochondrial dysfunction in THP-1 macrophages. Scientific reports., 10: 1-17.

Vogel, J. and Luisi, B. F. 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nature Reviews Microbiology.*, *9*: 578-589.

Wagenlehner, F. M., Johansen, T. E. B., Cai, T., Koves, B., Kranz, J., Pilatz, A. and Tandogdu, Z. 2020. Epidemiology, definition and treatment of complicated urinary tract infections. Nature Reviews Urology., 17: 586-600.

Wang, S., Peng, L., Gai, Z., Zhang, L., Jong, A., Cao, H. and Huang, S. H. 2016. Pathogenic triad in bacterial meningitis: pathogen invasion, NF-κB activation, and leukocyte transmigration that occur at the blood-brain barrier. Frontiers in microbiology., 7: 148.

Wayne, P. A. 2011. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.

Weinstein, M. P. (Ed.). 2019. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute. 29th Ed.

Welch, R. A. and Pellett, S. H. A. H. A. I. R. E. E. N. 1988. Transcriptional organization of the Escherichia coli hemolysin genes. *Journal of bacteriology*., *170*: 1622-1630.

White, A. B. 1996. Sterilization and disinfection in the laboratory. (In: Collee, J. G.; Frasel, A. G.; Marimon, B. P. and Simmons, A. (e ds.). Practical Medical Microbiology. 14th ed. Churchill. Livingstone. London. P. 813-834.

Wilfinger, W. W., Mackey, K. and Chomczynski, P. 2006. DNA Following Nucleic Acid Purification. DNA Sequencing II: Optimizing Preparation and Cleanup., 2: 291 .

Wu, J. Miao, Y. and Abraham, S. N. 2017. The multiple antibacterial activities of the bladder epithelium. Annals of translational medicine., 5: 2.

Xiong, A. S., Yao, Q. H., Peng, R. H., Li, X., Fan, H. Q., Cheng, Z. M. and Li, Y. 2004. A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences. *Nucleic acids research*., *32*: e98-e98.

Yamada, J., Yamasaki, S., Hirakawa, H., Hayashi-Nishino, M., Yamaguchi, A. and Nishino, K. 2010. Impact of the RNA chaperone Hfq on multidrug resistance in Escherichia coli. *Journal of antimicrobial chemotherapy*., *65*: 853-858.

Yoshikawa, Y., Tsunematsu, Y., Matsuzaki, N., Hirayama, Y., Higashiguchi, F., Sato, M. and Watanabe, K. 2020. Characterization of colibactin-producing Escherichia coli isolated from Japanese patients with colorectal cancer. Japanese journal of infectious diseases, JJID-2020.

Yuan, S., Shi, Y., Li, M., Hu, X. and Bai, R. 2021. Trends in incidence of urinary tract infection in Mainland China from 1990 to 2019. *International Journal of General Medicine*., *14*: 1413.

Zahera, M., Rastogi, C., Singh, P., Iram, S., Khalid, S. and Kushwaha, A.2011. Isolation, Identification and Characterization of Escherichia coli from Urine Samples and their Antibiotic Sensitivity Pattern. Eur. J. Exp. Biology., 1: 118-124.

Zalewska-Piątek, B. and Piątek, R. 2020. Phage therapy as a novel strategy in the treatment of urinary tract infections caused by E. coli. Antibiotics., 9: 304.

Zamani, H. and Salehzadeh, A. 2018. Biofilm formation in uropathogenic Escherichia coli: association with adhesion factor genes. Turkish journal of medical sciences., 48: 162-167.

Zeb, Z., Azam, S., Rehman, N., Khan, I., Afzal, S., Ullah, A. and Absar, M. 2021. Phenotypic and molecular characterization of virulence factors of extra-intestinal pathogenic Escherichia coli isolated from patients of Peshawar, Pakistan. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences., 34: 1.

Zhang, Z., Wang, M., Zhang, Y., Zhang, Y., Bartkuhn, M., Markmann, M. and Bhushan, S. 2021. Uropathogenic Escherichia coli Virulence Factor α-Hemolysin Reduces Histone Acetylation to Inhibit Expression of Proinflammatory Cytokine Genes. The Journal of Infectious Diseases., 223: 1040-1051.

Zhuge, X., Sun, Y., Jiang, M., Wang, J., Tang, F., Xue, F. and Dai, J. 2019. Acetate metabolic requirement of avian pathogenic Escherichia coli promotes its intracellular proliferation within macrophage. Veterinary research., 50: 1-18.

EKLER

EK 1. Malzeme ve Yöntem

EK 2. Sonuçlar

EK 3. Bakteri kültürü sonuçlarına göre örnek çalışmanın dağılımı.

EK 4. İYE gruplarına/Prevalansa göre örnek çalışmanın dağılımı

EK 5. UPEC'de cinsiyete göre örnek çalışmanın dağılımı

EK 6. Örnek çalışmanın yaşa göre dağılımı

EK 7. Hemolizine göre örnek çalışmanın dağılımı

EK 8. UPEC izolatlarının antibiyotik duyarlılığına göre örnek çalışmanın dağılımı

EK 9. Hemolizin üreten UPEC izolatlarında virülans genlerinin (Cnf 1, cdtIII ve clbA) prevalansı

EK 10. Hly gen ekspresyonunun sonuçları

EK 11. Cnf1 gen ekspresyonunun sonuçları

EK 12. rFah gen ekspresyonunun sonuçları

EK 1. Malzeme ve Yöntem

Ek 1. PCR Bileşen Hesaplaması

Master karışım bileşenleri	**Mevcut**	**Birim**	**Nihai**	**Birim**	**Hacim**	
					1 Numune	5,05 numune
Ana karışım	2	X	1	X	10	50,5
İleri primer	10	µM	1	µM	1	5,1
Ters primer	10	µM	1	µM	1	5,1
Nükleazsız Su					7	35,4
DNA		ng/µL		ng/µL	1	
Toplam hacim					20	
rxn başına alikot	Tüp başına 19 µL Master karışımı ve 1 µL Şablon eklenmesi					

EK 2. Sonuçlar

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed Mar 2, 2021 15:50 CST

Patient Name: Patient ID:
Location: Physician:
Lab ID: HIBA Alsaho 30 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: **Collected:**

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	4.80 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	96% Probability **Bionumber:**	**Escherichia coli** 0405610554526610		
ID Analysis Messages				

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	6	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	16	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	+
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Ek 2. Mikroorganizmaların test edilen izolatların fenotipini göstermesi ve mikrobiyal ve kültürel ve geleneksel biyokimyasal testlere dayanan tanıyı doğrulaması için Vitek 2 Sistemi (Otomatik tanımlama sistemi).

Ek 3. Bakteri kültürü sonuçlarına göre örnek çalışmanın dağılımı.

Bakteri kültürü için numuneler	**Sayı**	**(%) Yüzde**
Pozitif	157	63,31
Negatif	91	36,69
Toplam	248	100%
Ki-Kare (χ^2)	---	17,564
P- değeri	---	0.0001
** ($P \leq 0.01$).		

Ek 4. İYE gruplarına/Prevalansa göre örnek çalışmanın dağılımı

IYE Grupları	**Sayı**	**(%) Yüzde**
UPEC	93	37,50
Diğer patojenik bakteri türleri	64	25,81
Büyüme olmayan numuneler	91	36,69
Toplam	248	100%
Ki-Kare (χ^2)	---	6.435 *
P- değeri	---	0.040
* ($P \leq 0.05$).		

Ek 5. UPEC'de cinsiyete göre örnek çalışmanın dağılımı

Cinsiyet	**Sayı**	**(%) Yüzde**
Kadın	66	70,97
Erkek	27	29,03
UPEC Toplam	93	100%
Ki-Kare (χ^2)	---	16,354
P- değeri	---	0.0001
** (P≤0.01).		

Ek 6. Örnek çalışmanın yaşa göre dağılımı

Yaş aralığı	**Sayı**	**(%) Yüzde**
Yetişkinler (18-86 yaş)	70	75,27
Çocuklar (2.5-11 yaş)	23	24,73
UPEC Toplam	93	100%
Ki-Kare (χ^2)	---	23,757 **
P- değeri	---	0.0001
** (P≤0.01).		

Ek 7. Hemolizine göre örnek çalışmanın dağılımı

Hemolizin	**Sayı**	**(%) Yüzde**
Pozitif	5	5,10
Negatif	93	94,90
Toplam	98	100%
Ki-Kare (χ^2)	---	79,02
P-değeri	---	0.0001
** (P≤0.01).		

Ek 8. UPEC izolatlarının antibiyotik duyarlılığına göre örnek çalışmanın dağılımı

Antibiyotik	R	S	I	P-değeri
AMC	100	0	0	0.0001 **
AM	100	0	0	0.0001 **
T	80.3	15.24	4.46	0.0001 **
CRO	72.03	8.97	9	0.0069 **
CN	38.21	3.81	57.98	0.0026 **
S	31.6	5.23	63.17	0.0007 **
F	16	1.95	82.05	0.0001 **
AK	13.6	18.04	86.9	0.0001 **
CIP	3.1	5.9	91	0.0001 **
NA	4	8.2	87.8	0.0001 **
P-value	0.0001 **	0.0001 **	0.0001 **	---
** (P≤0.01). R: Dirençli, S: duyarlı, I: orta.				

Ek 9. Hemolizin üreten UPEC izolatlarında virülans genlerinin (Cnf 1, cdtIII ve clbA) prevalansı

virülans genlerinin prevalansı	(%) Yüzde
Cnf 1	%80,00
cib-A	%80,00
cdt-III	%0,00
Chi-Square (χ^2)	13,58 **
P-value	0.0001
** (P≤0.01).	

Ek 10. Hly gen ekspresyonunun sonuçları

İşlem	HGK	hly	Δhly	ΔΔhly	Katlama
Kanlı agar	20,39	17,65	-2,74	-1,33	2,514027
Kanlı agar	27,6	26,19	-1,41	0	1,00
T-testi	--	--	--	--	0,659 *
* (P≤0.05).					

Ek 11. Cnf1 gen ekspresyonunun sonuçları

İşlem	HGK	Cnf1	ΔCnf1	ΔΔCnf1	Katlama
Kanlı agar	20,39	17,92	-2,47	-2,56	5,897077
Kanlı agar	27,6	27,69	0,09	0	1,00
T-testi	--	--	--	--	1,073 **
** (P≤0,01).					

Ek 12. rFah gen ekspresyonunun sonuçları

İşlem	HGK	rFah	ΔrFah	ΔΔrFah	Katlama
Kanlı agar	20,39	17,72	-2,67	-2,07	4,198867
Kanlı agar	27,6	27	0,6	0	1,00
T-testi	--	--	--	--	0,988 **
** (P≤0,01).					

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Hiba Naser Ali ALSAHO

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Bağdat Üniversitesi Bilim Fakültesi Biyoloji Bölümü	2014-2018