ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ESCHERICHIA COLI VE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN PATOJENEZİNDE DEMET OLUŞTURAN PİLUS (BFP) FAKTÖRÜNÜN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Hadeel Mohammed Fadhil FADHIL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Hadeel Mohammed Fadhil FADHIL tarafından hazırlanan **"*Escherichia coli* ve Antibiyotik Direncinin Patojenezinde Demet Oluşturan Pilus (BFP) Faktörünün Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi"** adlı tez çalışması 17/04/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN

Eş Danışman : Prof. Dr. Ahmed Mohammed TURKI

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Fiziki Coğrafya Anabilim Dalı
Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ
Biyoloji Anabilim Dalı
Gazi Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi. Ebru GÜL
Orman Mühendisliği Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "***Escherichia coli* ve Antibiyotik Direncinin Patojenezinde Demet Oluşturan Pilus (BFP) Faktörünün Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (17/04/2023).

Hadeel Mohammed Fadhil FADHIL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ESCHERICHIA COLI VE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN PATOJENEZİNDE DEMET OLUŞTURAN PİLUS (BFP) FAKTÖRÜNÜN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Hadeel Mohammed Fadhil FADHIL

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Eş Danışman: Prof. Dr. Ahmed Mohammed TURKI

Bu çalışma, biberiye yapraklarının alkollü ekstraktının çeşitli patolojik durumlardan izole edilen *Escherichia coli* bakterisi üzerindeki sinerjistik etkisini ortaya koymayı amaçlamaktadır. Bu nedenle 20.02-11.05.2021 tarihleri arasında Al-Ramadi ve Felluce Eğitim Hastanelerinden çeşitli patolojik vakalardan 302 klinik örnek toplanmıştır. Bakteri izolatlarının fenotipik tanısı için MacConkey agar, kanlı agar ve eozin metil mavisi besiyerlerinde kültüre edilmiştir. Ardından izolatlar geleneksel yöntemlerle teşhis edilip mikroskobik ve biyokimyasal incelemeler yapılmıştır. Bu incelemeler sonucunda 107 izolatın *E. coli* bakterisine ait olduğu belirlenmiş ve bu sonuç Vitek 2 sistemi ile doğrulanmıştır. Bunlara ek olarak tüm *E. coli* izolatlarında 12 tip antibiyotiğe karşı antibiyotik duyarlılık testi yapılmıştır. Buna göre, izolatların çoğunun antibiyotiklere direnç ve duyarlılık gösterdiği ve en yüksek direncin sırasıyla, Tetrasiklin (%82,24), Seftazidim (%79,44) ve Aztreonam (%85,98), en yüksek duyarlılığın ise Imipenem (%85,05), Meropenem (%80,37) ve Sefepim (%80,03) olduğu tespit edilmiştir. Mikrotitrasyon kapları (MTP) yöntemi kullanılarak *E. coli* izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneğinin tespiti yapılırken, 56 *E. coli* izolatının iki farklı biyofilm oluşumu seviyesiyle biyofilm oluşturduğunu göstermiştir. Biyofilm oluşturan bakteriyel izolatlar, biberiye yapraklarının alkollü özü ile muamele edildiğinde, biyofilm inhibisyon yüzdesi, tedavi edilmeyen izolatlara kıyasla biyofilm inhibisyon oranı üzerinde yüksek etkinlik belirlenmiştir. Ayrıca, DNA'nın ekstraksiyonu ile *E. coli* izolatlarında FLU geninin araştırılması için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılmıştır. Elektroforez sonuçlarında, tüm *E. coli* izolatlarında FLU geni içerdiğini görülmüştür. *E. coli* bakterilerinin biberiye yaprağı ekstraktının sinerjik etkisine tepkisini incelemek için, seçilen FLU geninin gen ekspresyonu qRT-PCR ile tespit edilmiştir. Biberiye ve antibiyotik siprofloksasin ile tedavi edildiğinde gen ifadesinde bir artış görülürken, antibiyotik seftazidim için gen ifadesinde azalma görülmüştür.

2023, 96 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Antibiyotik direnci, *Escherichia coli,* FLU geni

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF BUNDLING PILUS (BFP) FACTOR IN THE PATHOGENESIS OF *ESCHERICHIA COLI* AND ANTIBIOTIC RESISTANCE BY MOLECULAR METHODS

Hadeel Mohammed Fadhil FADHIL

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Melda DÖLARSLAN
Co-Advisor: Prof. Dr. Ahmed Mohammed TURKI

This study aims to reveal the synergistic effect of the alcoholic extract of rosemary leaves on *Escherichia coli* bacteria isolated from various pathological conditions. Therefore, 302 clinical samples were collected from various pathological cases from Al-Ramadi and Fallujah Training Hospitals between 20.02-11.05.2021. For the phenotypic diagnosis of bacterial isolates, they were cultured on MacConkey agar, blood agar and eosin methyl blue media. Then, the isolates were identified by traditional methods and microscopic and biochemical examinations were made. As a result of these examinations, it was determined that 107 isolates belonged to *E. coli* bacteria and this result was confirmed with the Vitek 2 system. In addition, antibiotic susceptibility testing was performed against 12 types of antibiotics in all *E. coli* isolates. Accordingly, most of the isolates showed resistance and susceptibility to antibiotics and the highest resistance was Tetracycline (82.24%), Ceftazidime (79.44%) and Aztreonam (85.98%), the highest susceptibility was to Imipenem (85.05%), Meropenem (80.37%) and Cefepime (80.03%). While determining the biofilm forming ability of *E. coli* isolates using the microtitration pots (MTP) method, it was shown that 56 *E. coli* isolates formed biofilms with two different biofilm formation levels. When biofilm forming bacterial isolates were treated with the alcoholic extract of rosemary leaves, the percentage of biofilm inhibition was higher than the untreated isolates on the rate of biofilm inhibition. In addition, polymerase chain reaction (PCR) technique was used to investigate the FLU gene in *E. coli* isolates by extraction of DNA. Electrophoresis results showed that all *E. coli* isolates contained the FLU gene. To examine the response of *E. coli* bacteria to the synergistic effect of rosemary leaf extract, gene expression of the selected FLU gene was determined by qRT-PCR. An increase in gene expression was seen when treated with rosemary and the antibiotic ciprofloxacin, while a decrease in gene expression was seen for the antibiotic ceftazidime.

2023, 96 pages

Keywords: Antibiotic resistance, *Escherichia coli*, FLU gene

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN'a sabrı, rehberliği ve anlayışı için teşekkür ederim.

Hadeel Mohammed Fadhil FADHIL
Çankırı, Mayıs 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **viii**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **ix**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xi**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **5**
2.1 *Escherichia coli* **5**
2.2 *E. coli*'nin Patojenitesi **6**
2.3 *E. coli*'nin Virülans Faktörü **8**
2.4 Biyofilm Oluşumu **9**
2.5 Enzimler **11**
2.6 Toksinler **11**
2.7 Antibiyotikler **12**
2.8 *E. coli*'nin Antibiyotik Direnci **13**
2.9 *Rosmarinus officinalis* L. (Biberiye) Sınıflandırması **16**
2.10 Bitkinin Genel Tanımı **16**
2.11 *Rosmarinus officinalis* L. Yapraklarının Tıbbi Olarak Kullanımı **17**
2.11.1 Kimyasal bileşikler **17**
2.11.2 Tıbbi kullanımlar **17**
2.12 Bakteriler için Virülans Genleri **18**
2.13 Antijen 43 (Grip Geni) **19**
3. MATERYAL VE METOT **22**
3.1 Cihazlar **22**
3.2 Biyolojik ve Kimyasal Malzemeler **22**
3.3 Kültür Ortamı **23**
3.3.1 Besleyici agar ortamı **23**

3.3.2 MacConkey besiyeri 23
3.3.3 Kan bazlı agar 23
3.3.4 Besin suyu 24
3.3.5 Pepton su ortamı 24
3.3.6 Simmon sitrat agar besiyeri 24
3.3.7 Demirli disakkarit agarın ortası 24
3.3.8 MR-VP ortamı 24
3.3.9 Mueller-hinton agar besiyeri 25
3.3.10 Beyin kalp infüzyon suyu 25
3.3.11 Eozin metilen mavisi ortamı 25
3.3.12 Üre agar besiyeri 25
3.4 Kullanılan Reaktifler, Çözeltiler ve Boyalar 25
3.4.1 Gram boyama 25
3.4.2 Oksidaz reaktifi 26
3.4.3 Katalaz reaktifi 26
3.4.4 Voges-proskauer reaktifi 26
3.4.5 Kovac reaktifi 26
3.4.6 Tris borat EDTA tamponu (TBE) 26
3.4.7 McFarland standart reaktifi 27
3.4.8 Stok antibiyotik solüsyonu 27
3.4.9 Antibiyotikler 27
3.5 Vitek 2 Sistemi 28
3.6 Çalışma Metotları 28
3.6.1 Sterilizasyon 28
3.6.2 Örnekleme 29
3.6.3 *E. coli*'nin patolojik modellerden izolasyonu 30
3.6.4 İzolatların tanımlanması 30
3.6.5 İzolatların saklanması 33
3.6.6 Vitek2 sistemi kullanılarak biyokimyasal teşhis 33
3.6.7 Antibiyotik duyarlılık testi 35
3.6.8 Biyofilm oluşturma yeteneğinin saptanması 36
3.6.9 *Rosmarinus officinalis*'in toplanması ve hazırlanması 37

3.6.10 *Rosmarinus officinalis*'in alkol ekstraktı 37
3.6.11 Alkol ekstraktlarının sterilizasyonu 37
3.6.12 Kontaminasyonunun incelenmesi 38
3.6.13 Doğal ve endüstriyel malzemelerin bakterilere karşı inhibitör aktivitesinin difüzyon yöntemi ile ölçülmesi 38
3.6.14 Biberiye ekstraktının mikro titrasyon kabı yöntemiyle *E. coli*'nin biyofilm oluşumuna etkisi 38
3.6.15 Bakteri izolatlarının genetik içeriğinin incelenmesi 39
3.6.16 DNA polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği 44
3.6.17 Gen ifadesi 46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 52
4.1 İzolasyon ve Teşhis 52
4.2 *E. coli*'nin Bakteriyel Teşhisi 53
4.2.1 Patolojik örneklerden *E. coli* bakterisini izolasyonu 56
4.2.2 Antibiyotiklere duyarlılık ve direnç testleri 56
4.3 *E. coli*'nin Çoklu Antibiyotik Direnci 61
4.4 Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Değerlendirilmesi 62
4.5 Antibiyotik Direnci ve Biyofilm Oluşumu Arasındaki İlişki 65
4.6 Biberiye Ekstraktının Biyofilm Oluşturan *E. coli* İzolatlarına Karşı İnhibe Edici Etkinliğinin Test Edilmesi 66
4.6.1 Biberiye yaprağı alkollü ekstraktının *E. coli* izolatları üzerine etkisi 66
4.7 Biberiye ve Antibiyotik Ömrü için Minimum İnhibitör Konsantrasyonun (MIC) Belirlenmesi 67
4.8 Biberiye Bitkisinin Biyofilm Oluşumuna Etkisi 68
4.9 DNA Ekstraksiyonu 69
4.10 *E. coli* İzolatlarından Ekstrakte Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Saflığının Belirlenmesi 70
4.11 FLU Geninin Saptanması 71
4.12 *E. coli* Bakterisinin RNA Ekstraksiyonu 72
4.13 Biberiye ve Antibiyotik Tedavisi Sonrası ve Öncesi Gen Ekspresyon Miktarının qRT PCR Yöntemi Kullanılarak Ölçülmesi 72
4.13.1 FLU geninin gen ekspresyonunun ölçümü 73
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 75

KAYNAKLAR 76
ÖZGEÇMİŞ..... 96

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
µL	Mikrolitre
℃	Santigrat derece
L	Litre
mL	Mililitre

KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
E. coli	*Escherichia coli*
EPEC	Enteropatojenik *Escherichia coli*
mRNA	Mesajcı RNA
RNA	Ribonükleik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bakteriler arasında plazmid değişimi yoluyla dirençin aktarımı. (a) Kommensal *E. coli*, patojenik *E. coli* ve diğer patojenik bakteriler bağırsakta bir arada bulunur; (b) Bakteriler antibiyotiğe dirençli plazmitleri bağlar ve değiştirir. (c) Bakteriler tarafından elde edilen dirençli plazmidler (Nji *et al.* 2021). 15
Şekil 2.2 Biberiye bitkisi 17
Şekil 4.1 Patolojik vakalardan izole edilen *E. coli* prevalansının yüzdesi 52
Şekil 4.2 *E. coli*'nin antibiyotiklere karşı direnç ve duyarlılık yüzdeleri 60
Şekil 4.3 *Escherichia coli* bakterisinin biyofilm oluşturma yeteneği 64
Şekil 4.4 Biberiye yapraklarının alkollü ekstraktının *E. coli* bakteri izolatı üzerindeki etkisi 66
Şekil 4.5 E 11-E 20 numaralı izolatların %2 agaroz jel üzerinde FLU geninin PCR elektroforezi 71
Şekil 4.6 FLU geninin gen ekspresyonunun qRT-PCR tekniği kullanılarak kantitatif ölçümü 74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar 22
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan biyolojik ve kimyasal maddeler 22
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan boyalar ve reaktifler 23
Çizelge 3.4 Standart antibiyotik inhibisyon bölgelerinin çapları 28
Çizelge 3.5 Vitek2 sistemi bulanıklık değerleri 34
Çizelge 3.6 MİK değerlerini hesaplamak için absorpsiyon sonuçları 37
Çizelge 3.7 Genomik DNA ekstraksiyon kitinin bileşenleri 40
Çizelge 3.8 Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler 44
Çizelge 3.9 FLU geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bileşenleri 46
Çizelge 3.10 FLU geni PCR reaksiyon karışımı için özel termopolimer cihazının programı 46
Çizelge 3.11 Çalışmada kullanılan bakteriyel RNA ekstraksiyon kitinin bileşenleri 48
Çizelge 3.12 Toplam RNA'dan cDNA hazırlamak için kullanılan bileşenler ve reaksiyon hacmi 49
Çizelge 3.13 Termopolimerizasyon programının adımları 49
Çizelge 3.14 qRT-PCR bileşenleri 50
Çizelge 3.15 PCR-qRT reaksiyonu için program ve döngüler 50
Çizelge 4.1 Gram pozitif ve Gram negatif izolatların yüzdesi 53
Çizelge 4.2 *Escherichia coli* izolatlarının mikroskobik ve biyokimyasal inceleme sonuçları 55
Çizelge 4.3 Farklı klinik vakalarda *E. coli* bakterilerinin dağılımı 56
Çizelge 4.4 Farklı antibiyotiklerin *E. coli* bakterisine karşı etkisi 57
Çizelge 4.5 *E. coli* bakterisine karşı çoklu direnç 61
Çizelge 4.6 ELISA cihazında *Escherichia coli* bakterisinin biyofilm konsantrasyonunun ölçülmesi 62
Çizelge 4.7 *E. coli* bakterilerinin biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki 65
Çizelge 4.8 Biberiye ve antibiyotikler için minimum inhibitör konsantrasyonun (MİK) 68
Çizelge 4.9 Biberiye kullanılarak *Escherichia coli* bakterilerinin biyofilm oluşumunun inhibisyon yüzdeleri 69
Çizelge 4.10 *E. coli* izolatlarının DNA konsantrasyonu ve saflığı 70
Çizelge 4.11 *Escherichia coli* izolatlarının RNA konsantrasyonunun ve saflığının ölçümü 72
Çizelge 4.12 FLU geninin gen ekspresyonunun qRT-PCR tekniği kullanılarak kantitatif ölçümü 74

1. GİRİŞ

Escherichia coli ilk olarak 1885 yılında Theodor von Esherich tarafından tanımlanmıştır (Auda *et al.* 2013). *E. coli, Enterobacteriaceae* familyasına aittir ve bu familyanın üyelerinin insan bağırsağında yaşamasından ve Yunanca bağırsak anlamına gelen *Enteron* kelimesinden türetilmiştir.

Bir gram dışkı yaklaşık 107 koloni oluşturan *E. coli* içerdiğinden, bu bakteri bağırsakta doğal olarak bulunur (Jabbar 2013). *Escherichia* cinsine ait gram-negatif basillerdir ve çoğunluğu fakültatif anaerobik, oksidaz, üreaz, jelatin ayrışması, sitrat tüketimi, fosfor, hidrojen sülfit gazı üretimi, katalaz, testi için pozitiftir. Metil kırmızı, indol üretimi (MacFaddin 2000), hidrojen glikoz, sukrozun optimum şekilde fermantasyonu -7°C ve 37°C'lik bir sıcaklıkta gerçekleşir (Fotadar *et al.* 2005). Spor oluşturmaz, ancak bazı suşları bir kapsül oluşturma ve enerji üretim sürecinin bir parçası olarak nitratı nitrite indirgeme yeteneğine sahiptir (Kaur *et al.* 2010). Kolonileri sıradan besiyerinde küçük, hafif dışbükey, MacCokey agar gibi seçici besiyerlerinde pembe ve Eozin metilen mavisi (EMB) besiyerinde metalik parlak olarak görünür. Bunun nedeni, laktozun fermantasyonu nedeniyle pH'ın 4,5'in altına düşmesidir. Bakterilerin Gen Dizilimi ilk kez Blattner *et al.* (1977) tarafından *E. coli*'ye ait K-12 izolatı kullanılarak deşifre edilmiştir (Madigan *et al.* 2000). Nitrojen baz içeriğinin değeri (G + C) %50,8'dir ve bu bakteri suşlarının geri kalanında kaydedilen değerle aynıdır (Marciano *et al.* 2007). Aynı zamanda gıdadaki varlığının kanıtıdır. Dışkı ile bulaşmıştır, doğada yaygın olarak bulunur ve türlerinin çoğu dışkıdan gelir ve insan bağırsağındaki doğal floranın bir parçası olmasına rağmen bazıları patolojiktir, sindirim sistemi iltihabına, idrar yolu iltihabına menenjit ve çürümeye neden olur. *E. coli*, idrar yolu enfeksiyonlarının yaklaşık %90'ına neden olan, özellikle kadınlarda mikrobiyal kontaminasyona katılan en önemli patojenik mikroplardan biridir ve sık görülen bir hastalıktır. Enterik *Escherichia coli* (EPEC), gelişmekte olan ülkelerde ishal vakalarının çoğuna neden olur ve bebek ölümlerinin ana nedenidir (Pearson *et al.* 2016). Yapılan bir çalışmada koliform bakterilere önem verilmiştir. Bunun nedeni, bu bakterilerin çok sayıda önemli virülans faktörüne ve antibiyotik direncini kodlayan belirli genlere sahip olmaları nedeniyle çok

sayıda enfeksiyona neden olmaları olarak açıklanabilir (Farshad and Emamghorashi 2009). Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC), adezyon ve emboli (A/E) olarak bilinen belirgin bir bağırsak patolojisi üreten fakat Shiga toksini üretmeyen bakteriler olarak tanımlanmaktadır. EPEC, intimin adı verilen bir dış zar proteinini kodlayan EAE genini içeren enterositlerde (LEE) patojenik bir bölge taşır (Scaletsky 2019). EPEC, tipik EPEC ve atipik EPEC olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır, atipik EPEC'in daha az öldürücü olduğu kabul edilir (Singh *et al.* 2017). Tipik EPEC suşları, birincil olarak yüksek düzeyde korunmuş bir tekrar protein A alt birimi olan BfpA'dan oluşan bir demet oluşturucu uyaranı (BFP) ifade etmeleri bakımından benzersizdir (Fernandes *et al.* 2003). EPEC'in neden olduğu enfeksiyonların başka sebeplerle oluşan enfeksiyonlardan ayırt edilmesi daha zordur; Semptomlar arasında sulu ishal, ara sıra kusma ve düşük dereceli ateş olabilir, kusma oral rehidrasyonun yönetimini zorlaştırabilir ve EPEC enfeksiyonu şiddetliyse hayatı tehdit eden dehidratasyon meydana gelebilir. Ek olarak, EPEC'in getirdiği hastalık kronik olabilir ve kilo kaybına, açlığa ve hatta ölüme neden olabilir. Kişinin nasıl maruz kaldığına bağlı olarak semptomlar, atipik EPEC (aEPEC), tipik EPEC (tEPEC) aksine, vakadan vakaya, maruz kaldıkları mikropların miktarına ve bağışıklık durumlarına göre farklılık gösterebilir (WHO 2008). Epitel hücrelerine yerel bağlanmaya aracılık eden demet oluşturan demetleri (BFP) kodlayan pEAF (EPEC adezyon faktörü) olarak bilinen zarar verici plazmitten yoksundur. Yoksul ülkelerde, akut yenidoğan ishal salgınları tipik EPEC suşları ile ilişkilendirilmiştir, dünya genelinde atipik EPEC suşları her yaştan insanda ishal salgınları ile ilişkilendirilmiştir. AEPEC, çocuklarda tEPEC'in yaptığından daha az şiddetli ishale neden olur (Scaletsky 2019).

Beta-laktamazlar da dahil olmak üzere antibiyotiklerin keşfi, idrar yolu enfeksiyonlarının oranlarını düşürmede önemli bir etkiye sahipti. Ancak mikroorganizma, antibiyotiğe direnmek için, antikor molekülünü analiz edebilen enzimler üretmek veya antikoru inert ve etkisiz hale getirmek için değiştirmek gibi çeşitli stratejilere yöneldi. Penisilin antibiyotik ve sefalosporin ailesini parçalayan beta-laktamaz enzimleri, en önemli enzimlerden biridir ve birçok tedavi örneğinin başarısız olmasının ana nedenlerinden biridir (Izdebski *et al.* 2013). Ayrıca, sırasıyla plazmitlerde veya kromozomlarda depolanan bu yeni genetik bileşenlerin sentezi üzerinde de kontrole sahiptir.

Çevre dostu veya virülans genlerini kodlayabilen diğer genlerin kaybına yol açan antibiyotik direnç genlerine sahip bakteriler hakkında birçok çalışma vardır. Buna karşılık, bazı araştırmalar (Marciano *et al.* 2007), antibiyotiğin varlığının artan virülans ve doku hasarına yol açabileceğini belirtmektedir.

Biberiye veya *Rosmarinus officinalis* L. (syn. *Salvia rosmarinus* Spenn.) gibi şifalı bitkiler kullanılarak antibiyotiklerin etkinliği artırılabilir. Bu bitkinin, uzun, ince yaprakları, parlak, koyu yeşil üst yüzeyi ve üzerinde altın sarısı veya gümüşi beyaz lekeleri olan çok yıllık bir bitkidir. Çiçek salkımları çivit veya mavidir ve alt yüzeyi küçük beyaz tüylerle kaplıdır. Akdeniz ülkelerinde yabani olarak yetişir. Yaprakları, özellikle spor yapmayan kişilerde kan dolaşımını hızlandırır. Baş ağrılarını azaltır, bakteri ve mantar enfeksiyonlarını tedavi eder, sindirim sistemindeki gazları önler, besinlerin sindirilmesine ve emilmesine yardımcı olur, mide yanmasını giderir. Karaciğeri, sindirim sistemini ve safra kesesini iyileştirir ve taş, böbrek taşı ve mesane taşı oluşumunu azaltır. Ayrıca bu taşların oluşumu ile ilgili olan üreaz enziminin salgılanmasını azaltır. Boğaz, diş etleri ve yaraları tedavi etmek için gargara olarak kullanılır.

Biberiye fazla bakım istemeyen bir süs bitkisidir. Özellikle Akdeniz bölgesinde çekiciliği, kuraklığa toleransı, ekim kolaylığı ve haşere direnci nedeniyle yetiştirilmekte ve geliştirilmektedir. Biberiye bitkisinin büyümesi için çok fazla koşula ihtiyacı yoktur. Verimli killi toprağın ve hava akımlarına maruz kalmayan açık güneşli bir yerin mevcudiyeti gelişimi için yeterlidir, ancak toprağın su basmasına tolerans göstermez ve dona dayanamaz (Paratropia Blume 2017). Biberiyede butulonik asit, kafur, rosmarinik asit, kafeik asit ve ursolik asit dahil olmak üzere çok sayıda fitokimyasal, ayrıca karnosik asit ve karnosol dahil olmak üzere birçok antioksidan bulunur (Murata *et al.* 2013, Dobetsberger and Buchbauer 2011, Hanafi *et al.* 2010).

Hint halk tıbbında çiçeklerden ve yapraklardan elde edilen biberiye özü ve yağı birçok rahatsızlığın tedavisinde kullanılmaktadır (Alnahdi 2012). Çalışmalar, biberiyenin gıda kaynaklı patojenlere ve bozulmaya neden olan bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Ruiz-Navajas *et al.* 2012, Mith *et al.* 2014, Marrelli *et al.* 2016). Iseppi *et al.* (2019), biberiyenin gelecekte bir antibakteriyel olarak güvenilebilecek

taze sebzeleri kirleten *E. coli* bakterilerine karşı etkili bir role sahip olduğunu göstermiştir. Jafari-Sales and Pashazadeh (2020) çalışmasında, biberiye esansiyel yağının antibakteriyel özelliklere sahip olduğunu ve sentetik antibiyotiklerin yerine iyi bir alternatif olarak kullanılabileceğini belirtmiştir.

Bu bilgiler doğrultusunda, bağırsakları besleyen *E. coli* bakterilerinin patogenezinde pili faktörü oluşturan bfp demetinin ve değişken zarların oluşumundaki rolü, biyofilmlerin antibiyotik direncini artırmadaki etkisi ve alternatif yöntemler kullanarak bu bakteriler üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Escherichia coli*

Bu mikroorganizma ilk olarak 1885 yılında Theodor Escherichia tarafından tanımlanmıştır (Martinson and Walk 2020). *E. coli* suşlarının çoğu hem insan hem de hayvan gastrointestinal sistemlerinde olağan flora ile uyum içinde yaşar. Migula tarafından *Bacillus coli* olarak tanımlanmasından sonra yeni sınıflandırması *Escherichia* cinsine göre yapılmıştır (Kaper *et al.* 2004).

Escherichia coli; *E. vulneris, E. fergusonii, E. adecarboxylata* ve E. *hermannii*'yi de içeren *Escherichia* cinse ait en sık karşılaşılan tür olarak karşımıza çıkmaktadır (Akbari *et al.* 2021).

E. coli, Gamma proteobakteri sınıfının *Enterobacteriaceae* familyasına ait Gram negatif, çubuk şeklinde bir bakteridir. Optimal büyüme koşulları altında, *E. coli* hızla büyüyebilir ve yaklaşık 20 dakikada çoğalabilir (Tenaillon *et al.* 2016).

Escherichia coli, 2,0 µm uzunluğunda, 0,25-1,0 µm çapında ve 0,6-0,7 μm^3 hacminde geçici bir yapıdır. Hücre duvarı, bir dış zar olan peptidoglikandan oluşur ve 5 ile 20 atmosfer arasında değişen iç ozmotik basınçlardan kendini koruma görevi görür ve ayrıca bakterilerin kendi kendine bölünmesine yardımcı olur. *E. coli*, belirli substratları yakalayan ince filamentler olan villusların yanı sıra yüzmesine izin veren uzun peritrikli kamçılara sahiptir (Guo 2018, Silaban 2021).

Escherichia coli, sporsuz, hareket etmeyen veya peritrik flagella ile hareketli, kemoorganotrofik ve fakültatif olarak anaerobik yani oksijen mevcut olmadığında anaerobik koşullarda hayatta kalabilen, glikozdan asit üretebilen, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve mezofiliktir (Beloin *et al.* 2008, Erjavec 2019). 4 ile 45°C arasındaki sıcaklıklarda büyüyebilir, ancak 37°C, büyümesi için ideal sıcaklıktır. 6 ile 8 arasındaki

pH aralığı büyüme için mükemmeldir. 4'e kadar düşük ve 9'a kadar yüksek pH seviyelerine dayanabilir (Naewkanya and Petiraksakul 2021).

E. coli, biyolojinin en çok çalışılan türlerinden biridir ve kapsamlı tam genom dizilemesi yapılsa bile bu tür grubunun son derece çeşitli olduğu bilinmekteydi. Bu nedenle farklı *E. coli* soylarını ayırt etmek için birden fazla yöntem kullanılmıştır (Waters *et al.* 2020).

Sayısız enzim ve diğer endüstriyel ürünler üreten *E. coli* kullanılarak çok sayıda gen manipülasyon sistemi geliştirilmiştir. 1997'de *E. coli*'nin ilk genom dizisi çalışmasının sonuçları yayınlanmıştır (Tenaillon *et al.* 2016).

Hücre duvarı veya somatik (O) antijenleri, kapsüler (K) antijenleri, pilar veya fimbriyal antijenler ve flagellar (H) antijenleri gibi çeşitli serolojik ve antijenik özellikler, *E. coli*'yi 700'den fazla serotip ile sınıflandırmak için kullanılır (Nataro and Kaper 1998, Peek *et al.* 2018). *E. coli* yaygın olarak incelenmiştir ve genellikle iki temel yüzey antijenine dayanan farklı serotipler halinde sınıflandırılır. Bunlar; lipopolisakkarit tabakasının bir parçası olan O-antijeni ve flagellin proteini (F) olan H-antijenidir (Tuttle *et al.* 2021).

E. coli, insanların ve birçok sıcakkanlı hayvanın terminal ince bağırsağı ve kalın bağırsağında yaygın olarak bulunur. *E. coli* ile konakçı arasındaki ilişki, kommensalizm olarak bilinir çünkü normal *E. coli* mikrobiyotası, bakteriyosinler ve diğer mekanizmalar üreterek diğer patojenlerin kolonizasyonunu önler ve konakçıya fayda sağlar (Tenaillon *et al.* 2010). Bununla birlikte, *E. coli* fırsatçı bir patojen haline gelebilir ve diğer organları ve dokuları kolonize ettiğinde veya konakçı bağışıklık sisteminin bozulması gibi durumlarda enfeksiyona neden olabilir (Ferdous 2017).

2.2 *E. coli*'nin Patojenitesi

E. coli normalde zararsız bir şekilde memelilerin bağırsak lümeninde bulunmasına rağmen; bazı suşlar insanlarda ve hayvanlarda çeşitli bağırsak içi ve dışı hastalıklara neden olabilir (Bélanger *et al.* 2011, Croxen and Finlay 2010). *E. coli* sıklıkla fırsatçı bir

patojen olarak kabul edilir (Hussain *et al.* 2014). *E. coli* suşları, klinik patoloji ve enfeksiyon bölgesine göre üç sınıfa ayrılır. Bunlar; bağırsak patojenik (enterik ve ishalojenik) (IPEC), ekstraintestinal patojenik (ExPEC) ve kommensal *E. coli* suşları olarak sıralanabilir (Lyhs *et al.* 2012, Cummins *et al.* 2022).

Kommensal *E. coli*, sindirim sisteminin (GIT) normal bir bileşenidir. Uzun süreler boyunca, kommensal *E. coli* ve konakçı organizmaları uyum içinde bir arada var olur ve birbirlerine fayda sağlar (Kaper *et al.* 2004). Omurgalı sindirim sisteminin mukus tabakası, kommensal *E. coli* için tipik bir yaşam alanıdır. Bu komensal suşlar, belirli bağırsak bölmelerini doldurur ve konağın sağlığını destekler (Pickard *et al.* 2017), ancak bazı suşlar, çeşitli hastalıklara neden olmalarına izin veren farklı virülans özellikleri geliştirmiştir (Bertelloni *et al.* 2020).

Bağırsak patojenik *E. coli*, gastrointestinal sistemde (GIT) tanımlanan iyi bilinen ve yaygın bir patojenik *E. coli*'dir (Pickard *et al.* 2017). Bağırsakta en yaygın patotipler şunlardır: (1) enteropatojenik *E. coli*, çocuklarda ve hayvanlarda ishale neden olan coli (EPEC); (2) hemorajik kolite ve hemolitik üremik sendroma neden olan enterohemorajik *E. coli* (EHEC) (Gharajalar and Sofiani 2017), (3) enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) , gezgin ishali ile domuz ve sığır ishaline neden olur, (4) insanlarda kalıcı ishale neden olabilen enteroagregatif *E. coli* (EAEC) ve (5) enteroagregatif *E. coli* 'nin bir alt grubu olan diffüz yapışık *E. coli* (DAEC) Çocuklarda ishale neden olan (6) enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), ishale ve dizanteriye neden olan bir türdür (Sora *et al.* 2021).

Ekstraintestinal patojenik *E. coli* suşları, bağırsak dışında hastalıklara neden olan patojenik *E. coli* bakterileridir. İYE (Üropatojenik *E. coli* (UPEC), yenidoğan menenjiti (NMEC) ve sepsis, ExPEC'in (SEPEC) neden olduğu en yaygın bağırsak dışı hastalıklardır (Tapader *et al.* 2019). Özellikle yenidoğanlarda ve küçük çocuklarda gastrointestinal ağrı, ishal, iltihaplanma, ülserler ve hatta hemorajik enterit ve hemoliz gibi daha ciddi vakalara neden olabilen enterotoksinler oluşturabilir (Zhao *et al.* 2018).

E. coli, fırsatçı bir patojen olarak hastane enfeksiyonlarının yaygın bir nedenidir (Abbasi ve Ranjbar 2018). Hem komensal hem de patojenik suşlar, yılda 2 milyondan fazla ölümle sonuçlanan çeşitli insan hastalıklarına neden olur (Jang *et al.* 2017).

2.3 *E. coli*'nin Virülans Faktörü

Virülans, bir organizmanın konakçıyı enfekte etme ve hastalığa neden olma yeteneği olarak tanımlanır. Virülans faktörleri, bakterilerin konakçılarını hücresel düzeyde istila etmesine yardımcı olan moleküllerdir. Bu faktörler ya salgılayıcı zarla ilişkili ya da sitosoliktir (Sharma *et al.* 2017). Virülans faktörlerinin keşfi, bakteriyel patogenezi ve bunların konakçı ile etkileşimlerini anlamak için kritik öneme sahiptir, çünkü bu faktörler ilaç ve aşı geliştirmede yeni hedefler olarak hizmet edebilir (Wu *et al.* 2008). Bakteriyel virülans faktörleri, konakçının savunmasını zayıflatarak veya ondan kaçarak bir konağın çoğalmasına ve yayılmasına yardımcı olur. Genomik yaklaşımların uygulanması, terapötik hedefler olarak kullanılabilecek yeni virülans faktörlerinin keşfiyle sonuçlanmıştır (Cross 2008).

Bu virülans faktörleri, hassas konakçılarda hastalıklara neden olmanın yanı sıra, yüksek sıcaklıklarda mikrobiyal büyümede önemli bir rol oynayarak, etkili patojen girişi ve konakçıya yerleşmeleri için gerekli olan adezyon, penetrasyon ve yayılmayı teşvik eder. Ayrıca, virülans faktörleri, bağışıklık savunmasına karşı patojenik direncin kurulmasına katkıda bulunur. Bu unsurlar, konak ile patojen arasındaki çatışmanın sonucunu ve bu konak-patojen etkileşiminin bir sonucu olarak konağın hayatta kalıp kalmayacağını etkiler (Meena *et al.* 2019).

E. coli'nin en önemli virülans faktörleri; bakteriyel hücre yüzeyi virülans faktörleri ve salgılanan virülans faktörleri olarak iki kategoriye ayrılır. Bakteriyel hücre yüzeyi virülans faktörleri en yaygın olarak fimbriaları, özellikle tip 1 ve P fimbriaları içerir. Tip 1 fimbria (aynı zamanda tip 1 pili olarak da bilinir), konakçı hücre yüzeyine yapışmaya ve doku istilasına (UPEC'in neden olduğu İYE'lerin patogenezinde önemlidir), biyofilm oluşumuna ve sitokin indüksiyonuna yardımcı olur. Bakteriyel hücre yüzeyi virülans

faktörleri ayrıca flagellum, kapsüler lipopolisakarit ve dış zar proteinlerini içerir (Wiles *et al.* 2008, Johnson 1991, Emody *et al.* 2003).

Üropatojenik *E. coli* suşları, çeşitli savunma mekanizmalarının üstesinden gelmelerine ve hastalığa neden olmalarına yardımcı olan çeşitli virülans faktörlerine sahiptir. Fimbria (bakteriyel yapışma ve invazyona yardımcı olan), demir alım sistemleri (bakterilerin idrar yolunun demirle sınırlı ortamında hayatta kalmasına izin veren), kamçı ve toksinler, virülans genlerinde bulunan bakteriyel yayılmayı teşvik eden) virülans faktörleri arasındadır. Virülansa neden olan genler, bulaşıcı genetik elementler (plazmitler) ve/veya kromozom üzerinde bulunur (Farshad *et al.* 2012).

Üropatojenik *E. coli* suşları, konağı kolonileştirmelerine ve istila etmelerine, konağın savunma mekanizmalarını bozmalarına, konakçı dokuları zedelemelerine ve/veya konakçıda zararlı bir inflamatuar yanıtı tetiklemelerine izin veren özel virülans faktörlerine sahiptir. ExPEC suşları, -hemolizin (hly), sitotoksik nekrotize edici faktör (cnf), endotelyal beyin proteininin istilası (ibeA), fimbria kıvrımlı (csgA), toksin salgılayan ototransporter (sat), serin proteaz ototransporter (pic) ile ilişkili amiloid proteini olan toksin ototransporterinin (vat) vakuolizasyonu, serum direnci (traT) ve kapsül K1(kpsMTII) dahil olmak üzere çeşitli virülans faktörlerine sahiptir (Ananias and Yano 2008, Packey and Sartor 2009).

Mikrosinler ve kolikinler gibi bakteriyosinler, *E. coli* tarafından üretilen ve diğer yakından ilişkili suşları öldürebilen ve sınırlı besin içeren ortamlarda mikroorganizmaları geride bırakmada patojenik suşlara yardımcı olabilen antibakteriyel peptitlerdir. Sonuç olarak, kolisinler, konakçı hücrede patotiplerin hayatta kalmasını ve kolonizasyonunu arttırır.

2.4 Biyofilm Oluşumu

Biyofilm oluşumu, ilaçlara, deterjanlara ve konak bağışıklığına karşı koruma ve direnç sağlayan karmaşık bir mekanizmadır (Adamus-Białek *et al.* 2015, Oliveira *et al.* 2020).

Biyofilm, birçok fırsatçı bakterinin patogenezindeki ana faktörlerden biridir, bakterilerin zorlu veya toksik ortamlarda hayatta kalmalarına yardımcı olan çeşitli biyofilm formları oluşturma yeteneği, çok çeşitli türlerin patogenezi için çok önemlidir (Langstraat *et al.* 2001, Adamus-Bialek *et al.* 2015).

Üropatojenler, biyofilm oluşumu yoluyla bağışıklık tepkileri ve açlık gibi mesanedeki streslere yanıt olarak hayatta kalmak için çeşitli mekanizmalar kullanır ve üropatojenin konakçının bağışıklık tepkisinden kaçmasına izin veren morfolojik değişikliklere maruz kalır (Justice *et al.* 2004).

Biyofilm oluşumu, birkaç adım gerektiren karmaşık bir süreçtir (Langstraat *et al.* 2001). Farklı biyofilm yapıları, bakterilerin çeşitli yüzeyleri ve büyüme koşulları ile ilişkilidir (Adamus-Białek *et al.* 2015). Farklı bakteri türleri biyofilm üretebilse de bunların "oluşum süreci" sırasında gerçekleşen eylemler hepsinde aynıdır (Davis and Flood 2011). Biyofilm ilerlemesi, çeşitli çevresel koşullara yanıt olarak adezyona, hücre dışı matrisin atılımına ve ayrılmaya yol açan çoklu genlerin yukarı ve aşağı regülasyonunu içerir (Oliveira *et al.* 2020).

Biyofilm oluşumunun planlanan gelişim dizisi için beş aşama önerilmiştir. İlk iki aşamada, Vander Waals kuvvetleri gibi zayıf kimyasal etkileşimlerle yüzeyle geçici bir yapışma, ardından güçlü yapışma gelir (Rangel *et al.* 2005). Fimbriae, pili ve curli gibi yüzey uzantılarının yanı sıra bu faza giren ekzopolisakkaritlerin oluşumu gerçekleşir (Mohammed *et al.* 2014). Üçüncü ve dördüncü aşamalar, büyüme ve olgunlaşma ile sonuçlanan hücrelerin mikro koloniler halinde toplanmasını içerir. Hücreler büyümeye ve daha fazla hücre dışı polimerik madde (EPS'ler) oluşturmaya devam ederek mikro kolonilerin genişlemesine neden olur (Sapers *et al.* 2000). Daha sonra, bu büyük mikro koloniler birleşerek su dolu yapılar oluşturan daha kalın, daha karmaşık binalar oluşturur (Mohammed *et al.* 2014). Beşinci aşama, biyofilm hücrelerinin planktonik duruma geri dönüşle birlikte ayrı ayrı veya gruplar halinde boşaltıldığı ve dış ortama aktarıldığı geçici hareketliliğe dönüş ile karakterize edilir (Sapers *et al.* 2002). Besin kaynağına bağlı olarak, biyofilm bileşimleri düz veya mantar şeklinde olabilir ve yapısı nedeniyle değişebilir (Mohammed *et al.* 2014).

Biyofilm yapısı, seğirme hareketliliği, büyüme aralığı, hücre sinyali, ekzopolisakkarit üretimi ve fiziksel büyümeden etkilenir. Biyofilm oluşturan bakteriler, çok sayıda kronik enfeksiyondan sorumludur ve serbest yüzen bakterilere kıyasla ağırlıklı olarak antibiyotiğe daha dirençlidir (Méndez-Ortiz *et al.* 2006). Biyofilmler, bakterilere konakçılarında canlı kalmalarını ve gelişmelerini sağlayan bir büyüme tarzı sağlar (Mohammed *et al.* 2014).

2.5 Enzimler

Çeşitli enzimler bakteriyel virülans ile ilişkilendirilmiştir. Genel olarak konak bileşenlerine karşı aktif olan ve konakçı dokuları yok ederek virülans oluşturan virülans faktörleri olarak örneklenen enzimler, doku hasarı sonucu konak mikrobiyal enfestasyona karşı duyarlı hale gelmektedir (Casadevall and Pirofski 2009).

Bununla birlikte, konak hücre reseptörlerini, tamamlayıcı gibi sıradan ligandlarının bağlanmasını yok edebilecek ve istilacılığı, serum direncini ve konağın bağışıklık mekanizmalarından kaçmayı artırmak için mikrobiyal tavrı değiştirebilecek bir şekilde değiştirirler. Üreaz gibi diğer enzimler, fagositik hücrelerde hayatta kalmayı teşvik ederek virülansa girer (Cox *et al.* 2000).

2.6 Toksinler

Patojenik bakteri sentezi iki tür toksin (i) ekzotoksinler, bakteriyel patojen tarafından salgılanır ve konakçı hücrenin lizise neden olarak veya fonksiyonlarını engelleyerek konakçı hücreyi bozar ve (ii) enterotoksinler, ekzotoksinlere benzer şekilde, sıklıkla epitelyal dokuya zarar vermekle ilişkilendirilir. Gastrointestinal sistemi kaplayan hücreler. Konak hücre zarına zarar veren delikler oluştururlar.

UPEC, konakçı hücre zarındaki kolesterol açısından zengin mikro alanlarda Ca + bağımlı bir yöntemle oligomerize olan ve birleşen yüksek konsantrasyonlarda α-hemolizin (HlyA) salgılar (Nagamatsu *et al.* 2015). Bu, şemsiye hücrelerinde delik oluşumuna

neden olur ve parçalanmalarını teşvik eder, bu da bakterilerin demiri ve diğer besinleri emmesini kolaylaştırır (Flores-Mireles *et al.* 2015).

HlyA ayrıca pul pul dökülmeye neden olarak bakterilerin daha derin üroepitelyal katmanları kolonize etmesine izin verir ve hücreler idrarla atıldığında ek konakçılara yayılmalarını teşvik eder (Justice and Hunstad 2012). Ayrıca, HlyA IBC'lerde bol miktarda eksprese edilir, bu da enfeksiyonun bu aşamasında önemli olduğunu gösterir (Flores-Mireles *et al.* 2015). Tip III salgı sistemleri, patojen tarafından oluşturulan ve farklı proteinlerin konakçı hücreye veya konakçı hücre içindeki belirli organellere salınmasına yardımcı olan proteinlerin toplanmasıdır.

2.7 Antibiyotikler

Antibiyotikler, mikroorganizmaların ürettiği bileşikler olmalarına rağmen mikroorganizmaların büyümesini engelleyebilen bileşiklerdir. Bu antibiyotikler 2013 yılında bulaşıcı hastalıkların tedavisinde devrim yaratarak insanlarda ve hayvanlarda bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmede kullanıldı (Breurec *et al.* 2013). Bununla birlikte, mevcut tedavi seçenekleri arasında ilaca dirençli patojenleri tanımlayabilirler, üçüncü ve daha yüksek nesil sefalosporinler, florokinolonlar ve mikrolitler gibi birçok antibiyotik sınıfı insan tıbbı için kritik öneme sahip olmaya devam etmektedir. Bu sınıflardan herhangi birine karşı direnç, insan sağlığı için ciddi bir tehdit olarak kabul edilir (Programme 2010). Antibiyotiklerin getirdiği tıbbi bakım devrimini, bakteriyel enfeksiyonlardan kaynaklanan ölümlerin sayısını artıran yüksek oranda antibiyotik direncinin oluşması izlemiştir (Osundiya *et al.* 2013). Antibiyotiklerin keşfinin asıl başlangıcı 1900 yılında bilim adamı Paul Ehrilich tarafından yapılmış ve onun kemoterapi terimini kullanmasıyla tedavide kullanılmış ve bu teriminin literatüre girmesine neden olmuştur. Antibiyotiklerin gelişigüzel ve aşırı kötüye kullanımı sonucunda antibiyotik direncinin ortaya çıkmasına neden olmuştur ve çoklu ilaca dirençli bakterilerin yayılmasında önemli rol oynamıştır (Woodford *et al.* 2011). Antibiyotik direnci, mikroorganizmaların direnç genlerini kodlayan ve konakçılar arasında plazmitleri aktaran mobil genetik elementleri mutasyona uğratma ve edinme yeteneğinin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Ampisilin C ve Karbapenemazlar gibi geniş spektrumlu beta laktamaz

enzimlerinin üretimi, antibiyotik direncinin en önemli mekanizmalarından biridir. Bağırsak bakterilerinde biyota. Mikropların antibiyotik direncindeki artış, küresel bir halk sağlığı sorunudur. Dirence atfedilen tüm ölümlerin %28'inin, Beta-laktamaz (ESBL) ve Karbapenemler arasındaki geniş spektruma dirençli *E. coli* suşlarından kaynaklandığı gösterilmiştir. Bu bakterilere karşı direnç tüm dünyaya yayıldığı ve geliştiği için küresel önlemler alınmalıdır. Son çare olarak gereksiz antibiyotik kullanımını azaltmak en önemli adımdır (Cassini *et al.* 2019, Hofer 2019) Bununla birlikte, sınırlı mikrobiyolojik tanı yöntemleri nedeniyle, klinik laboratuvarlarda kullanılan rutin mikrobiyolojik tekniklerin en az 48 saat gerektirmesi ve patojen direncine ilişkin sonuçların 4 günü bulması nedeniyle hastalara doğru antibiyotik tedavisini zamanında reçete etmek çoğu zaman mümkün olmamaktadır (Peacock *et al.* 2018, Al Masoud *et al.* 2021 ve Ferrer *et al.* 2014). Bu durum doktorları hastalık öyküsüne ve direnç oranlarına dayalı deneysel tedaviler kullanmaya yöneltmekte ve bu tedaviler Antibiyotik direncinin artmasına katkıda bulunmaktadır. Antibiyotik direncini saptamak için hala hassas, sınırlı, hızlı ve güvenilir bir yönteme ihtiyaç duyulmaktadır (Pahlow *et al.* 2018, Lorenz *et al.* 2017).

2.8 *E. coli*'nin Antibiyotik Direnci

Antibiyotik olarak bilinen ilaçlar, bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılır. Direnç, antibiyotikler, bakterilerin hayatta kalması için önemli olan proteinleri, nükleik asitleri, hücre duvarlarını veya folatı yapan bir veya daha fazla işlemi durduramadığında ortaya çıkarır (Nkansa-Gyamfi *et al.* 2019). Antibiyotik direnci artık dünya sağlığının yanı sıra gıda güvenliği ve gelişimi için en ciddi tehlikelerden biri olarak kabul edilmektedir. Antibiyotik direnci, antibiyotikler (bakteriyel enfeksiyonları önlemek ve tedavi etmek için kullanılan ilaçlar) bakteriyel büyümeyi önlemedeki etkinliğini kaybettiğinde gelişir (Alcock *et al.* 2020).

Bir organizmanın daha önce duyarlı olduğu antimikrobiyal ajanların etkilerine direnme kabiliyeti, antimikrobiyal direnç olarak adlandırılır (Paramythiotou and Routsi 2016). Bu, belirli ilaçların artık bakterileri öldürmede veya kontrol etmede etkili olmadığı anlamına gelir. Antimikrobiyal ajanlar yanlış kullanıldığında birden fazla ilaca dirençli bakteriler ortaya çıkar. Çoklu ilaç direnci (MDR), üç veya daha fazla antibiyotik sınıfına direnç

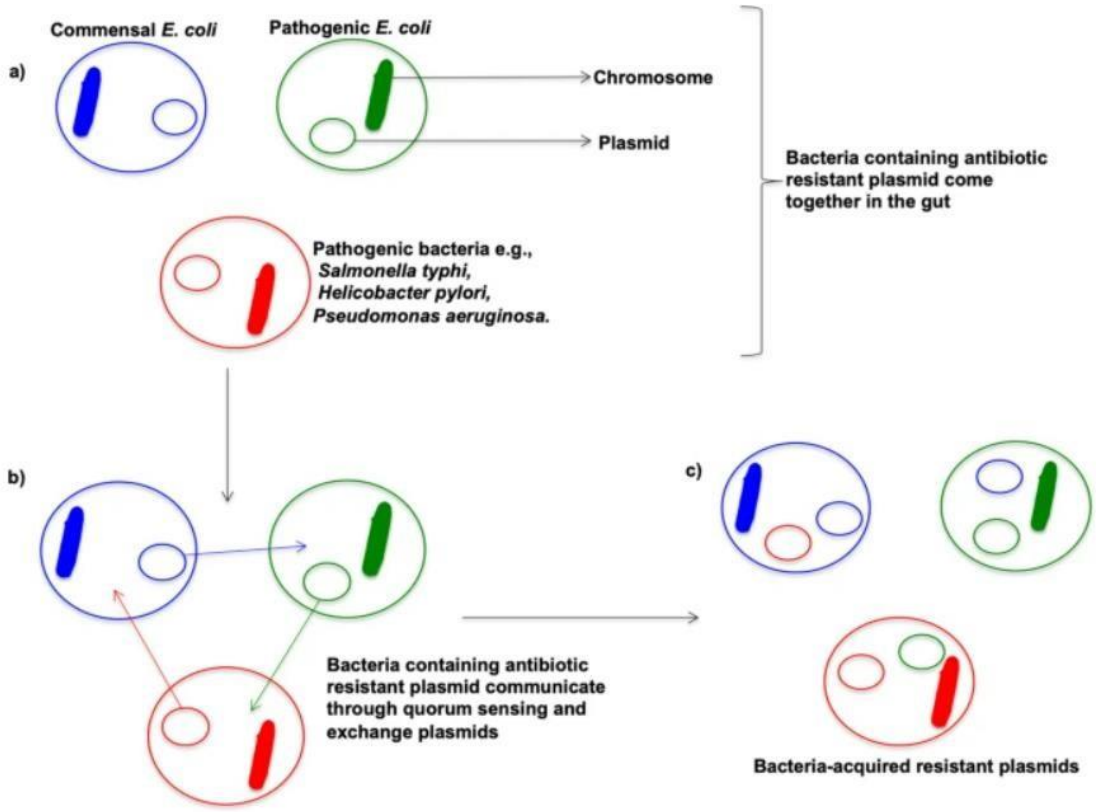
olarak tanımlanırken, yaygın ilaç direnci (XDR), bir veya iki antibiyotik sınıfı dışında tümüne direnç olarak tanımlanır. Pan-ilaç direnci (PDR) ise tüm antimikrobiyal sınıflardaki tüm ajanlara direnç olarak tanımlanır (Magiorakos *et al.* 2012).

Purohit *et al.* (2017) yapmış oldukları çalışmada, disk difüzyon yöntemini kullanarak insanlardan, hayvanlardan ve sudan alınan kommensal *E. coli* izolatlarında antibiyotik direncinin (ampisilin, sefoksitin, nalidiksik asit, polimiksin-B, vb.) prevalansını aratırmıştır. Kommensal *E. coli*, polimiksin-B dışında test edilen tüm antibiyotiklere direnç göstermiş olsa da insan izolatlarında çevreden veya hayvanlardan gelenlerle karşılaştırıldığında daha yüksek bir antibiyotik direnç prevalansı oluşturmuştur (Purohit *et al.* 2017). Aynı doğrultuda, Samore *et al.* (2011), insan kommensal *E. coli*'sinde yüksek bir antibiyotik direnci prevalansı belirlemiştir. Başka bir çalışmada, yetişkinlerin çocuklardan daha fazla antibiyotiğe dirençli komensal *E. coli* taşıdığı keşfedilmiştir (Bok *et al.* 2018).

E. coli antibiyotik direncindeki istikrarlı artış, hastalarda tedavisi zor enfeksiyonlar yaratarak dünyanın dört bir yanındaki sağlık kuruluşlarında önemli etkiye neden olur. Bu nedenle yapılan çalışmalrada, genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) üreten ve karbapenem dirençli *E. coli*'deki artışla ilgili endişeler dile getirilmiştir. Karbapenem dirençli *E. coli* (CRE), çoklu ilaca dirençli bakteriler için son çare tedavi olarak kullanılan karbapenemler dahil olmak üzere mevcut antibiyotiklerin çoğuna karşı direnç geliştirmiştir. Bu sıklıkla florokinolon ve aminoglikozid direnci ile ilişkilendirilir (Hassan *et al.* 2020).

Aslında, Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'ne (ECDC) göre, 2007'de antibiyotiğe dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlardan 25,000 kişi öldü; bu, aynı ülkelerdeki trafik kazalarında ölen kişi sayısının yarısından fazladır (ECDC 2009). 2015 yılında, antibiyotiğe dirençli bakterilerin neden olduğu tahmini 671,689 enfeksiyon sonucunda yaklaşık 33,000 kişi yaşamını yitirmiştir (Cassini *et al.* 2019). Dünya Sağlık Örgütü, 2050 yılına kadar antimikrobiyal direncin neden olduğu yıllık ölüm sayısının dünya çapında 700,000'den 10 milyona yükseleceğini tahmin etmektedir (De Kraker *et al.* 2016).

Düşük ve orta gelirli ülkelerdeki (LMIC'ler) toplum ortamlarında sağlıklı kişilerden izole edilen çoklu ilaca, yaygın ilaca ve pan ilaca dirençli kommensal *E. coli* insidansının yüksek olduğu bildirilmiştir (Nkansa-Gyamfi *et al.* 2019). Antibiyotikler bakteriyel hastalıkları tedavi etmek için alınır ve kommensal *E. coli* bunlara maruz kalır ve doğal seçilim yoluyla onlara karşı direnç geliştirebilir. Antibiyotik direnci, komensal *E. coli*'den plazmid değişimi yoluyla diğer patojenik bakterilere bulaşır (Şekil 2.1) (Nji *et al.* 2021).



Şekil 2.1 Bakteriler arasında plazmid değişimi yoluyla dirençin aktarımı. (a) Kommensal *E. coli*, patojenik *E. coli* ve diğer patojenik bakteriler bağırsakta bir arada bulunur; (b) Bakteriler antibiyotiğe dirençli plazmitleri bağlar ve değiştirir. (c) Bakteriler tarafından elde edilen dirençli plazmidler (Nji *et al.* 2021).

Geleneksel antibiyotiklere dirençli patojenik organizmaların artan sorunu nedeniyle, enfeksiyonu tedavi etmek için antimikrobiyal peptitlerin farmakolojik uygulamasına artan bir ilgi vardır (Da Silva and Teschke 2003).

2.9 *Rosmarinus officinalis* L. (Biberiye) Sınıflandırması

Rosmarinus officinalis L.'nin bilimsel sınıflandırması Bertelloni *et al.* (2020)'e göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

- Kingdom *Tracheobionta*
- Sub kingdom *Spermatophyta*
- Super division *Magnoliophyta*
- Division *Magnoliopsida*
- Sınıf *Asteridae*
- Alt Sınıf *Tracheobionta*
- Order *Lamiales*
- Aile *Lamiaceae*
- Cins *Rosmarinus* L.
- Tür *Rosmarinus officinalis* L.

2.10 Bitkinin Genel Tanımı

Halk arasında biberiye olarak bilinen *Rosmarinus officinalis* L. bitkisi, menşei Akdeniz bölgesi olan bir bitki türü olmakla birlikte tüm kıtalarda bulunabilmekte ve yetiştirilebilmektedir. Yaprakları yaygın olarak baharat ve tıbbi amaçlar için kullanılan aromatik ve yağlı bir bitkidir (Rašković *et al.* 2014). *Lamiaceae* familyasına ait tıbbi aromatik bir bitkidir. Kurak ve kayalık bölgelerde yetişebilir ve kireç bakımından zengin topraklarda yetişebilir. Şekil 2.2'de gösterildiği gibi küçük, yaprakları dökülmeyen 1 ile 2 metre yüksekliğinde yabani bir çalıdır. Çiçeğin kendisinden veya yağ bezlerinin çoğunun bulunduğu yapraklardan elde edilebilen uçucu yağ açısından nispeten zengindir. Ancak en kaliteli uçucu yağ yapraklardan elde edilir. Doğal bir antioksidan olan biberiye bitkisi, antioksidan aktivitesi en yüksek baharatlardan biri olarak kabul edilmektedir (Hailemariam 2016).



Şekil 2.2 Biberiye bitkisi

2.11 *Rosmarinus officinalis* L. Yapraklarının Tıbbi Olarak Kullanımı

2.11.1 Kimyasal bileşikler

Biberiye ekstraktının inhibitör özelliği glikozitler, flavonlar, alkaloidler, taninler, reçineler, fenoller ve saponinler gibi birçok aktif bileşeni içermesinden kaynaklanmaktadır (Abd Majeed 2011). Biberiye; meşe asidi, rosmarinik asit, diterpeninler ve rosmirsine borneol, kamfen ve sineol içeren uçucu yağ içerir. Biberiyede bulunan en önemli bileşikler kafeik asit ve rosmarinik asit gibi türevleridir (Herrero *et al.* 2005). Biberiye, 1,8-Cineole, kafur ve α-pinen gibi farmakolojik aktivitelerden sorumlu birkaç bileşen ihtiva eder (Da Silva Bomfim *et al.* 2015).

2.11.2 Tıbbi kullanımlar

Santoyo *et al.* (2005) yapmış oldukları çalışmada, aktif bileşikleri, duvar ve zar hasarına neden olarak, protein sentezini inhibe ederek, metabolizmaya müdahale ederek veya DNA / RNA sentez fonksiyonlarına müdahale ederek biyolojik etkileri sınırladığını tespit

etmiştir (Bilcu *et al.* 2014). *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis* gibi gram-pozitif bakterilerin yanı sıra *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi Gram-negatif bakteriler biberiyenin alkollü özü tarafından inhibe edilir. Abdul Latif (2009) çalışmasında, farklı bitkileri *Aspergillus flavus* tarafından salgılanan mikotoksin aflatoksin B1'den korumak için doğal bir fungisit olarak biberiye yapraklarının alkollü ekstraktını kullanmıştır. Ayrıca, biberiye yaprağı ekstraktı anti-kanser ve anti-HIV içermektedir (Altinier *et al.* 2007). Bunlara ek olarak, safranın safra salgısını arttırmak ve dalağa fayda sağlamak için de kullanılır. Sinir spazmlarını hafifletmek ve adet döngüsünün sonunu hızlandırmak için kullanılır. Yaprakları, bakteri ve mantar gibi patojenlere karşı dirençli olmaları nedeniyle, bu mikroorganizmalar üzerindeki biyolojik olarak öldürücü etkisiyle yara iyileşmesini hızlandırmada, et ve balık ürünlerini uzun süre saklamada, çürümelerini ve bozulmalarını önlemede etkilidir. Bitki ayrıca tıbbi olarak sinir hastalıkları ve sinirlilikten iyileşme döneminde ve baş ağrıları ve migreni tedavi etmek ve kadınlarda menopoz ve sinir kaynaklı hazımsızlık tedavisinde ve epileptik nöbetlerde kullanılır kullanılır (Bown 2002).

2.12 Bakteriler için Virülans Genleri

PCR analizinin sonuçlarına göre, komensal *E. coli* izolatları virülans genlerinden bazılarına sahiptir (Beutin *et al.* 2003, Dixit *et al.* 2004). Bununla birlikte, söz konusu suş belirli bir konakçıda hastalığa neden olmak için gerekli virülans gen kombinasyonunu elde etmediği sürece, yalnızca bir veya birkaç virülans genine sahip olmak bir suşa patojenik statü vermez (Gilmore and Ferretti 2003). Patojenler, filogenetik gruplar B2 ve D olan ECOR suşlarını birincil olarak komensal olanlardan (filogenetik gruplar A ve B1) ayırt etmek için üç gen kombinasyonunu tanımlamıştır. Tek başına bu üç gen, çok lokuslu enzim elektroforezi ile daha karmaşık bir genetik analize dayanan benzer gruplandırmaları yakından yansıtan bir filogenetik sınıflandırma sağlama yeteneğine sahiptir. Ayrıca, bu bağlantılar, öncelikle kommensal kökenli bir araya getirilmiş klon popülasyonu kullanılarak yapılmıştır. Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) suşları, işlevsel olarak onaylanmış virülans genlerinden oluşan bir panele sahip olmadıkları için, konakçılarıyla kommensaller gibi uzun süreli simbiyotik bağlantılar oluşturmazlar (GenStat Committee 2003, McCartney *et al.* 1996). ExPEC suşları, tıpkı insanlarda

bağırsak enfeksiyonlarına neden olan bakteriler gibi, bağlanma/istila toksini üretme, demir temizleme ve bağışıklıktan kaçınma gibi çeşitli görevleri yerine getiren virülans genlerine sahiptir. ExPEC suşları, idrar enfeksiyonlarına neden olan üropatojenik (UPEC) suşlar (Marrs *et al.* 2002), neonatal menenjite neden olan suşlar (MENEC) ve septisemiye neden olan suşlar dahil olmak üzere üç ana patotipte gruplandırılır (Bekal *et al.* 2003). ExPEC suşları, onları bağırsak hastalığına neden olan muadillerinden ayıran virülans gen kombinasyonlarına sahiptir. Her patotip, virülans genleri tarafından tam olarak tanımlanamaz. Bunun yerine, her bir patotipin ilişkili virülans genleri, örneğin ND suşlarının, olgunlaşmamış ve gelişmemiş bağışıklığı ile yenidoğanın bağırsak duvarını kolonize etmek için fimbria gerektirmemesi gerçeği gibi, hastalık sendromunu simgeleyen kendine özgü semptomatolojisini üretmeye yardımcı olarak patotipin aktivitesini destekler. Sistem onlara PWD suşlarına göre hayatta kalma avantajı sağlar. İstenmeyen virülans genlerine sahip klonlar, çeşitli seçim baskılarına tabi tutulduklarında çıkarılabilir ve başka klonlarla değiştirilebilir. Bu değişiklikler, kolostrumlarda koruyucu antikorlar üretmek için dişi domuz aşılamasının *E. coli* ile artan kullanımına bağlanabilir (Woodward *et al.* 1993).

2.13 Antijen 43 (Grip Geni)

Fimbrial adezinler, üropatojenik *E. coli*'nin (UPEC) patojenitesinin önemli bir bileşenidir ve konak reseptörlerine özel bağlanmaya aracılık eder ve doğuştan gelen konak tepkilerini indükler. Proteinlerin ototransporter alt grubu, başka bir adezin kategorisinin temsilcisidir. Bu proteinler arasında en iyi çalışılmış olan Antijen 43 (Ag43), *E. coli* K-12'de hücre agregasyonu ve biyofilm gelişimi ile bağlantılı olan kendi kendini tanıyan bir adezindir. Ag43a (Ag43b değil), bir K-12 bağlamında Ag43a ve Ag43b'nin ifadesine göre idrar kesesinde uzun süreli sağkalımı arttırır. Prototip UPEC suşu CFT073'ün sekanslanmış genomu, patojenite adalarında yer alan iki değişken Ag43 kodlayan gene sahiptir (Ulett *et al.* 2007). Ürovirülans ayrıca faz değişkenli yüzey yerleşimli adhesin antijen 43 (Ag43) ile de bağlantılıdır (Anderson *et al.* 2003).

Flu geni tarafından kodlanan Ag43, kendini tanıyan bir AT adezinidir ve Flu geni tarafından ifade edilir, konakçı hücrelere otoagregasyon ve kıvırcık bir koloni şekli gibi

ayırt edici yüzey özellikleri verir (Hasman *et al.* 2000). Otomatik taşıyıcı (AT) ailesinin örnek bir üyesi Ag43'tür. AT proteinlerinin çekirdek dizisi, hem değişken bir yolcu alanının, alfa alanının, hücre yüzeyine nihai yönlendirmesini hem de bunların bakteriyel zar sistemi yoluyla ticaretini kontrol etmek için yeterli olması bakımından dikkat çekicidir. Alfa alanının dış zar boyunca hareket etmesine yardımcı olan taşıyıcı modülün beta alanı, yapı olarak genellikle AT proteinlerininkine oldukça benzerdir, ancak AT proteinlerinin spesifik fonksiyonel özelliklerini belirleyen alfa alanı büyük ölçüde farklılık gösterir. Alfa alanı bakteri yüzeyinde sindirilebilir ve hücre dışı ortama salınabilir veya bölünebilir ancak beta alanı ile kovalent olmayan etkileşimler sayesinde hücre yüzeyi ile temas halinde kalabilir. Sonuç olarak AT proteinleri, salınan zehirler gibi davranmaktan hücre ile ilişkili adezinlere kadar çeşitli görevleri yerine getirir (Henderson *et al.* 2004). Ag43, mesane epitelindeki dahili biyofilm benzeri bakteriyel bölmeler içindeki UPEC hücrelerinin yüzeyinde üretildiğinden, uzun süreli enfeksiyon sırasında bakterilerin hayatta kalmasına ve devam etmesine yardımcı olabilir (Anderson *et al.* 2003). Çeşitli farklı elementlerin, belirli bir bakteri suşunun bir biyofilm oluşturma kapasitesi için çok önemli olduğu gösterilmiştir. Birincisi, hücreler flagella destekli hareket (seğirme hareketliliği) sayesinde yüzeylere erişebilir (Watnick and Kolter 1999), ikincisi, ekzopolisakkarit matrislerinin oluşturulması, biyofilmin üç boyutlu yapısının kurulmasına yardımcı olur. Fimbria eaeA ve curli gibi yapışma faktörleri, bağlanmaya ve hedef yüzeyde erken kolonizasyonun kurulmasına yardımcı olur (Danese *et al.* 2000). N-asil-homoserin lakton gibi çekirdek algılayıcı moleküller, hücreden hücreye teması kolaylaştırır ve biyofilmin son şekline katkıda bulunur (Taghadosi *et al.* 2015). Ag43 aktivitesi, biyofilm oluşumunun ilk aşamalarına bağlıdır (Ulett *et al.* 2007). Bakteriyel agregasyon ve biyofilm gelişimi, ilaçlara ve konak immünolojik faktörlerine karşı direnç için önemli mekanizmalardır. Bu özellikler, Gram-negatif bakterilerde en büyük dış zar koleksiyonunu ve salgılanan proteinleri içeren ototransporter (AT) proteinlerinden büyük ölçüde etkilenir. AT proteinlerinin çoğunluğu, prevalanslarına ve bakteriyel patogenezdeki rollerine rağmen yapısal olarak tanımlanmamıştır. Konak immünolojik yanıtlarına ve ilaçlara karşı bakteriyel direnç, çoğunlukla bakteriyel agregasyon ve biyofilm gelişimi aracılık eder. Gram-negatif bakterilerin en büyük dış zar koleksiyonu ve salgılanan proteinler, ototransporter (AT) proteinleri, bu fenotiplerde çok önemli bir rol oynar. AT proteinlerinin çoğu yapısal olarak tanımlanmamıştır ve sayılarına ve

bakteriyel patogenezdeki önemlerine rağmen etki yöntemlerine ilişkin spesifik bilgi eksikliği vardır (Heras *et al.* 2014). Üropatojenik *E. coli* (UPEC) dahil olmak üzere, *E. coli* patotiplerinin çoğu Ag43'ü içerir (Ulett *et al.* 2007). Bunlara ek olarak, birçok UPEC suşu, Ag43 proteinini kodlayan agn43 (veya Flu) geninin birden çok kopyasını içerir (Roche *et al.* 2001, Ulett *et al.* 2007). Birkaç AT proteininin önemli virülans aktiviteleri ile bağlantılı olmasına rağmen gram-negatif bakterilerde bulunan çok çeşitli AT proteinleri, bunların çeşitli patogenez ile ilgili süreçlerde yer aldıklarını göstermektedir (Webb *et al.* 2012).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar liste halinde Çizelge 3.1'degösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar

Sıra	Cihaz adı	Şirket	Menşei
1	Otoklav	Hirayama	Japonya
2	Santrifüj	GallenKamp	İngiltere
3	Hassas elektronik Terazi	Kevn	Almanya
4	Vitek2 kompakt	BioMerieux	Fransa
5	Damıtma aparatı	G.F. L	Almanya
6	Soğutma İnkübatörü	Binder	İngiltere
7	Densi kontrolü	BioMerieux	Fransa
8	Su banyosu	Gallenkamp	İngiltere
9	Elektrikli fırın	Binder	İngiltere
10	Bileşik Işık Mikroskobu	Olympus	Japonya
11	Soğutma Santrifüjü	GallenKamp	İngiltere
12	Jel Dokümantasyonu	Difco	ABD
13	Vorteks	Bioneer	Kore
14	Nano Damla DNA	Bioneer	Kore
15	Güç kaynağı	Cleaver	İngiltere
16	Buzdolabı	Concord	Türkiye
17	Jel Elektroforez Aparatı	Bioneer	Kore

3.2 Biyolojik ve Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan biyolojik ve kimyasal maddeler Çizelge3.2'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan biyolojik ve kimyasal maddeler

Sıra	Cihaz adı	Şirket	Menşei
1	Agar	Agarose	ABD
2	Şeker Glikozu	D-Glucose	Birleşik Krallık
3	Etanol % 99	BDH	Birleşik Krallık
4	Regülatör reaktifi	TBE buffer 10X	ABD
5	Üre	Urea	Birleşik Krallık
6	Gliserol	BDH	Birleşik Krallık
7	DNA markör	Biolabs	İngiltere

Çalışmada kullanılan boyalar ve reaktifler Çizelge3.3'te listelenmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan boyalar ve reaktifler

Sıra	Cihaz adı	Menşei
1	Etidyum bromür boya	ABD
2	Kristal Menekşe	İsviçre
3	Metil kırmızı reaktifi	Hindistan
4	Oksidaz reaktifi	Hindistan
5	Voges – Proskauer testi	Birleşik Krallık
6	Gram boyama reaktifi	Suriye
7	Boya yükleme	ABD
8	Kovac reaktifi	Fransa

3.3 Kültür Ortamı

3.3.1 Besleyici agar ortamı

Bu besiyeri, üretici şirketin (Oxoid) talimatlarına göre hazırlanmış ve bakteri izolatlarının geliştirilmesi ve korunması amacıyla kullanılmıştır.

3.3.2 MacConkey besiyeri

Hintli üreticinin (Himedia) talimatlarına uygun olarak hazırlanmıştır. Laktoz fermantasyon testine ek olarak gram negatif bakterileri teşhis etmek için kullanılmıştır.

3.3.3 Kan bazlı agar

Üretici şirketin (Himedia) talimatlarına göre bu besiyeri, 40 g kanlı agar bazının bir litre distile suda çözülmesi ve otoklavda sterilize edilmesiyle yapılmıştır. Besiyeri 45-50ºC sıcaklığa kadar soğutulur, ardından buna %5 insan kanı eklenir. Bakterilerin kanı parçalama yeteneğine sahip olup olmadığının belirlenmesi için kullanılır.

3.3.4 Besin suyu

Üretici şirketin (Oxoid) talimatlarına göre hazırlanır ve kısa süreli izolatları geliştirmek ve korumak amacıyla kullanılır.

3.3.5 Pepton su ortamı

Üreticinin (Oxoid) belirttiği şekilde hazırlanır ve izolatların triptofanaz oluşturarak triptofanı parçalayıp parçalayamayacağını ve indol üretip üretemeyeceklerini belirlemek için kullanılır (Hemraj *et al.* 2013).

3.3.6 Simmon sitrat agar besiyeri

Tedarik eden şirketin (Himedia) talimatlarına göre hazırlanır ve bakterilerin tek karbon kaynağı olan sitratları tüketme yeteneğini tespit etmek için kullanılır (Hemraj *et al.* 2013).

3.3.7 Demirli disakkarit agarın ortası

Tedarikçinin talimatlarına (Himedia) uygun olarak hazırlanır. Bakterilerin glikoz ve laktozu fermente etme kapasitesinin yanı sıra ortada demir tuzlarıyla reaksiyona giren ve siyah bir renk oluşumuyla sonuçlanan hidrojen sülfür gazı üretme kapasitelerini test etmek için kullanılır (Baron and Finegold 1990).

3.3.8 MR-VP ortamı

Üreticinin (Himedia) talimatına göre, bakterilerin dekstroz ve laktozu parçalayıp H_2S üretip üretemeyeceğini belirlemek için bu besiyerini metil kırmızısı testinde ve Fox-Proskawer testinde kullanılır (Forbes *et al.* 2016).

3.3.9 Mueller-hinton agar besiyeri

Üretici firmanın (Rashmi) talimatlarına göre hazırlanmıştır. Bakterilerin antibiyotiklere duyarlılığını test etmek için kullanılır (MacFaddin 2000).

3.3.10 Beyin kalp infüzyon suyu

Üretici firmanın (Oxoid) talimatlarına göre hazırlanır. Uzun süreli muhafaza için her 85 mL et suyuna 15 mL gliserin ilave edildikten sonra kullanılır.

3.3.11 Eozin metilen mavisi ortamı

Üreticinin (Himedia) talimatlarına göre hazırlanmış ve 35,96 gram EMB medyumunun bir litre distile su ve steril oksidan içinde çözülmesiyle kullanılmıştır. 121ºC sıcaklıkta 15 dakika süreyle ve *E. coli* bakterisini diğer bağırsak familyası grubundan ayırmak için kullanılır.

3.3.12 Üre agar besiyeri

Hintli üreticinin (Himedia) talimatlarına göre hazırlanır. Bu besiyeri, üreaz enzimi üreterek bakterilerin üreyi analiz etme yeteneğini tespit etmek için kullanılır.

3.4 Kullanılan Reaktifler, Çözeltiler ve Boyalar

3.4.1 Gram boyama

Gram boya bileşik ve diferansiyel bir lekedir. Bu boya kristal menekşe, lugol iyot solüsyonu, mutlak alkol (rengi giderici solüsyon) ve safraninden oluşur (Gadallah 1994).

3.4.2 Oksidaz reaktifi

Fenildiamanedihidro klorürün 100 mL damıtılmış suda çözülmesiyle hazırlanır (Baron and Finegold 1990).

3.4.3 Katalaz reaktifi

3 hidrojen peroksit H_2O_2'den oluşur.

3.4.4 Voges-proskauer reaktifi

Bu reaktif iki çözeltiden oluşur:

- Potasyum hidroksit KOH'nin VP1 çözeltisi (%40) damıtılmış suda çözülür.
- BioMerieux tarafından sağlanan şirketin talimatlarına göre hazırlanmış bir VP2 (%5) a-naftol çözeltisi içerir.

3.4.5 Kovac reaktifi

Paradimetil amino benzaldehitin 150 mL izomil alkol içinde eritilmesi ve ardından 50 mL konsantre asit HCl'nin dikkatlice ve kademeli olarak eklenmesiyle hazırlanır ve bakterilerin triptofanı analiz etme yeteneği indol testi ile kontrol edilir (Gadallah 1994).

3.4.6 Tris borat EDTA tamponu (TBE)

95 mL distile suya 5 mL TBE ilave edilerek hazırlanır.

3.4.7 McFarland standart reaktifi

0,5 McFarland tüpü (McFarland No. 0,5), antibiyotik duyarlılık tahlilinde ve bakteriyel tanıda bakteri kolonilerinin yoğunluğunu test etmek için kullanılır.

3.4.8 Stok antibiyotik solüsyonu

Antibiyotik stok solüsyonu oluşturmak için 1 gram antibiyotik, 10 mL damıtılmış suda eritilir ve daha sonra hacmi 100 mL'ye çıkarılır.

Bundan sonra, parçalar 0,22 m gözenek boyutuna sahip bir millipore filtre kullanılarak sterilize edilmeden önce soğutulur. Baz stok olarak, bu stok çözeltinin nihai konsantrasyonu 100,000 g/mL'dir. 2048 g/mL baz stok solüsyonu 100,000 g/mL konsantrasyonunda Stok 2'yi oluşturmak için aşağıdaki Denklem (3.1) kullanılır (Weinstein *et al.* 2020).

$$C1 * V1 = C2 * V2 \quad (3.1)$$

O zamandan beri:

- C1: stok konsantrasyonu
- V1: Envanter boyutu (Bilinmeyen)
- C2: Konsantrasyon stoğu II (2048)
- V2: Cilt II stok (100)

3.4.9 Antibiyotikler

Fallujah Kadın ve Çocuk Hastanesi'nden Oxoid firmasının ürettiği antibiyotik tabletleri temin edildi. Çizelge 3.4, bu antibiyotiklerin tabletlerdeki konsantrasyonlarını göstermektedir.

Çizelge 3.4 Standart antibiyotik inhibisyon bölgelerinin çapları

Sıra	Antibiyotik	Kod	Antikonsantrasyon	Milimetre cinsinden sönümleme çapı		
				Hassas	Orta Hassasiyet	Dirençli
1	Tetrasiklin	TE	75	≥20	15-19	≤14
2	Kloramfenikol	C	30	≥18	13-17	≤12
3	Sefoksitinler	FOX	30	≥18	15-17	≤14
4	Aztreonam	ATME	30	≥21	18-20	≤14
5	Piperasilin	PI	100	≥21	18-20	≤17
6	Amoksisilin-klavulant	AMC	10	≥18	14-17	≤13
7	Siprofloksasin	CIP	5	≥26	22-25	≤21
8	Imipenem	IPM	10	≥25	21-24	≤20
9	Naldix asit	NA	30	≥19	14-18	≤13
10	Meropenem	MEME	10	≥18	13-17	≤14
11	Sefepim	FEP	30	≥25	19-24	≤18
12	Seftazidim	CAZ	30	≥21	--	≤20

3.5 Vitek 2 Sistemi

BioMerieux tarafından sağlanan ve aşağıdakilerden oluşan birincil biyokimyasal testlerle doğrulandıktan sonra bakteriyel izolat türlerini teşhis etmek için kullanılır.

- Vitek kaseti
- Normal salin
- Vitek 2 GN kartı
- Vitek 2 yoğunluk

3.6 Çalışma Metotları

3.6.1 Sterilizasyon

Kültür ortamı Brown and Smith (2005)'de belirtilene göre sterilize edilmiştir.

a) Otoklavlama

Tüm kültür ortamları otoklavda 121°C'de ve 15 atm basınçta 15 dakika sterilize edilir.

b) Kuru sterilizasyon

Tüm cam eşyalar 2 saat 180°C fırında sterilize edilir.

c) Filtreleme ile sterilizasyon

Değişik gözenek boyutlarına (0,22 m) sahip millipore filtreler kullanılarak, şekerler ve üre dahil olmak üzere tüm çözeltiler ve ısıya duyarlı malzemelerle sterilize edilir.

3.6.2 Örnekleme

Ramadi Kadın ve Çocuk Eğitim Hastanesi ile Felluce Kadın ve Çocuk Eğitim Hastanesinden 20.02.2021-11.05.2021 tarihleri arasında idrar, yanık, yara ve akıntı dahil olmak üzere farklı patolojik vakalardan 302 numune toplanmıştır.

İdrar örneklerinin alınması; 148 orta akım idrar örneği steril cam şişelerde toplandı ve alındıktan sonra bir saati aşmayan bir süre içinde kültivasyon için laboratuvara aktarıldı.

Yara örneklerinin alınması; Yara bölgesinden 41 örnek pamuklu çubuklar fizyolojik tuz solüsyonuna batırılarak toplandı ve yara yerinde döndürülerek kültür amacıyla doğrudan laboratuvara aktarıldı.

Yanık örneklerinin alınması; Yanık bölgesinden steril pamuklu çubuklar fizyolojik tuz solüsyonuna daldırılarak ve ardından yanık bölgesinde döndürülerek ve ardından kültür için doğrudan laboratuvara nakledilerek 16 örnek toplandı.

Akıntı örneklerinin alınması; 4 yaşın altındaki çocuklar için toplam 97 ayakta tedavi örneği steril plastik şişelerde toplandı ve doğrudan laboratuvara aktarıldı.

3.6.3 *E. coli*'nin patolojik modellerden izolasyonu

EMB besiyerinde solid MacConkey agar besiyerine Layout yöntemiyle "Loop" konveyör kullanılarak bakteriler ekildi ve petri kapları 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Bu koloniler daha sonra *E. coli*'nin doğrulayıcı teşhisini yapmak amacıyla saf izolatlar elde etmek için birden çok kez saflaştırıldı.

3.6.4 İzolatların tanımlanması

Bakterileri teşhis etmek için küresel olarak kullanılan bilimsel kaynaklara dayalı olarak mikroskobik ve biyokimyasal incelemeler yapılmıştır (Mahon *et al.* 2022).

3.6.4.1 Morfolojik özellikler

Besiyerinde büyüyen kolonilerin doku, renk, koloni yüksekliği, viskozite, koku, koloni çapı ve kenarı dahil olmak üzere özellikleri gözlendi.

3.6.4.2 Mikroskobik test

Bakterinin şeklini, Gram boyasının onunla etkileşimini ve idrara çıkma, yanıklar, yaralar ve dışkıdan toplanma yöntemlerini belirlemek için az miktarda üreyen bakteri kolonileri ekstrakte edildi ve mikroskobik lamlara yerleştirildi. Damıtılmış su damlası, gram boyamanın ardından smear, bakterinin rengi ve yayılması, yağa batırıldığında hücrelerin şeklini ve düzenini not etmek için ışık mikroskobu kullanılarak incelendi (Mahon *et al.* 2022).

3.6.4.3 Biyokimyasal test

Bu testler, incelenen bakteriyel izolatları teşhis etmek için kullanıldı.

- **Motilite testi**

Yarı katı besiyeri içeren tüpler, bıçaklama yöntemiyle inoküle edildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi (Cruickshank *et al.* 1975).

- **Oksidaz testi**

Sterilize tahta çubuklar ve filtre kağıtları kullanılarak MacConkey agarda gelişen koloniler aktarıldı. Filtre kâğıdı daha sonra bir damla oksidaz reaktifi (4N-Tetramthyal para Phenol1) ile işlendi. Koloninin beyaz renkte olması, testin sonucunun negatif olduğunun göstergesi olarak kabul edildi (Biswas and Rather 2019).

- **Katalizör reaktifi**

İncelenecek bakteri kolonilerinin bir kısmı, taşıyıcı öze vasıtasıyla bir cam lam yüzeyine aktarıldı ve bir damla %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi ilave edildi. Slaytların yüzeyinde oluşan baloncuklar testin pozitif olduğunun göstergesi olarak kabul edildi (Baron and Finegold 1990).

- **İndol üretim testi**

Bu tahlil, izole edilen bakterinin pepton suyu içeren tüplere inoküle edilmesi ve ardından 37°C'de 24 saat inkübe edilmesi, ardından birkaç damla Kovac reaktifi eklenmesi ile gerçekleştirldi. Yüzeyde kırmızı halka görünümü testin sonucunun pozitif olduğunu gösterdi. Bu test sayesinde bakterilerin triptofanı parçalama yeteneği test edilmiş oldu (Hemraj *et al.* 2013).

- **Metil kırmızı testi**

Metil kırmızı-Voges-Proskauer ortamı içeren tüplere bakteri kolonileri eklendi, bunlar daha sonra 4-5 damla metil kırmızı reaktif alınmadan önce 24 saat boyunca 37°C'de kültürlendi. Tonun sarıdan kırmızıya değişmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Hemraj *et al.* 2013).

- **Voges-proskauer besiyeri**

Metil kırmızısı-Voges-Proskauer (MR-VP) besiyeri içeren tüpler bakteri kolonileri ile inoküle edildi ve ardından 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra kırmızı bir ton oluşturması için Voges-Proskauer VP1+VP2 reaktif solüsyonu eklendi.

Bakterilerin karbonhidratların fermantasyonu sonucu asetoin üretmedeki etkinliği bu deney kullanılarak incelenmiştir.

- **Sitrat kullanımı**

Eğimli Simon Sitrat agar besiyeri, incelenecek bakterilerle inoküle edildi ve 24 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi.

- **H_2S üretim testi**

Eğimli Kligler demir agar besiyeri, incelenecek bakteri ile "düğme" yöntemi kullanılarak inoküle edildi ve 37°C sıcaklıkta 24 saat, altta oluşan pozitif reaksiyonu gösteren siyah bir çökelti olana kadar inkübe edildi.

- **Üreaz Üretim Testi**

Bakteriler, eğimli üre agar ortamına aşılandı. Tüpler 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

Sarıdan pembeye renk kayması başarılı bir sonucun göstergesi olarak kabul edildi. İzole edilen bakteri hem üre üretti hem de hidrolize etti (Lindsley *et al.* 2015).

3.6.5 İzolatların saklanması

Klinik örneklerden alınan örneklerin (idrar, yanıklar, yaralar ve atılım) nakledilmesinden sonra koloniler tespit edildi ve izolatlar, saf kolonilerle aşılamadan sonra geçici olarak besin-agar eğimli bir ortamda muhafaza edildi ve ardından 4°C'de tutuldu.

İzolatlar, günlük çalışma için her seferinde aynı ortama nakledilerek muhafaza edildi. Uzun süreli muhafaza için, %20 gliserol kalp ve beyin infüzyon suyu ilave edildi ardından izolatlar -20°C'de muhafaza edildi (WHO 2008).

3.6.6 Vitek2 sistemi kullanılarak biyokimyasal teşhis

Bu cihaz; kaset tutucu, her biri test yapmak için temel malzeme veya ortamı temsil eden 64 delikli Reaktif Kartları, plastik tüpler, DensiChek cihazı ve bilgi giriş ve çıkış ünitesinden oluşur.

Ön biyokimyasal testler ile doğrulandıktan sonra bakteri izolatlarının türlerini teşhis etmek için kullanılır.

Bakteri süspansiyonunun hazırlanması

- Steril plastik tüp hazırlanır.
- Steril tüpe 3 mL tuz solüsyon (%4,5-5,0) eklenir.
- Bir miktar saf koloniyi kültür kabından tüpe steril vektör butonu ile aktarılır ve solüsyon bulanıklaşana kadar iyice karıştırılır.
- Süspansiyonun bulanıklığı DensiChek cihazı kullanılarak ölçülür. Cihazın bulanıklık değerlerine göre türler belirlenir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Vitek2 sistemi bulanıklık değerleri

Ürün	McFarland bulanıklık aralığı
Gram negatif bakteriler=GN	0,63-0,50
Gram pozitif bakteriler=GP	0,63-0,50
Mayalar=YST	2,20-1,80
Gram-pozitif sporotropik basil=BCL	2,20-1,80

Kasetin aşılanması

- Kasetin cihaz tutucuya aktarılması ve kendileri için ayrılan yerlere yerleştirilmesi. Daha sonra çok ince bir bağlantı kanalından (mikro kanal) kaset ile sıkışan kaset birbirine bağlanarak tarayıcıdan kart kodu girildi.
- Havayı boşaltma işlemi mikropları kasete aktarmanın yanı sıra içindeki deliklere dağıtmak için tutucuyu özel bir vakum odasına konuldu.

Kart kapatma ve kuluçka

İletim kanalı cihaz tarafından 10-15 dakika içerisinde otomatik olarak kesilir ve herhangi bir sızıntı olmaması için kaset ağzı sıkıca kapatılarak kanal ağzı kapatılır. Daha sonra inkübatöre aktarılır ve kasetler 35,5+1,0°C sıcaklıkta inkübe edilir.

Optik sistem

Cihazdaki optik sistem, reaksiyonların dalga boylarını belirlemek ve bunları renk değişimleri ve bulanıklığın yanı sıra metabolik ürünler aracılığıyla çevirmek için karta doğru bir dizi ışık huzmesi yansıtmak üzere çalışır.

Test reaksiyon sonuçları ve analitik yöntemler

Cihaz, sonuçları hesaplar ve çeşitli koşullar altında çeşitli konumlardan izole edilen çok sayıda suşu ve çeşitli test ölçümlerini içeren sonuçlarla karşılaştırır. Cihaz test sonuçlarını +,-, (+) ve (-) olarak gösterir ve parantez içindeki puan zayıf testi belirtir.

Kimlik düzeyleri

Nesnenin teşhis düzeyi, testlerinin haritası aracılığıyla belirlenir ve cihazın taksonomik özellikleri ile karşılaştırılır. Nesneye bir olasılık oranı ve güven düzeyi verilir. Örneğin, olasılık oranı %96-99 ise, o zaman mükemmel bir güven seviyesindedir.

3.6.7 Antibiyotik duyarlılık testi

Disk Yöntemi

Bu test CLSI (2021)'de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

- Bakteri süspansiyonu, agar besiyerinde gelişen bakteri kolonilerinden, otoklavda 15 dakika sürekli çalkalanarak sterilize edildikten sonra 10 mL serum fizyolojik inoküle edilmek üzere hazırlanır, böylece MacFarland standart çözeltisinin bulanıklığına yakın bir bulanıklık elde edilir.
- Steril pamuklu çubuklar bakteri süspansiyonuna daldırılarak homojen üreme sağlanacak şekilde Muller-Hinton katı besiyeri içeren plaklara ekilir ve ardından kültürü absorbe etmek ve besiyerini kurutmak amacıyla oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
- Konsantrasyonları üretici firma tarafından belirlenen antibiyotik tabletler (Çizelge 3.4) steril forseps ile besiyeri yüzeyine 4 tablet olacak şekilde kültür ortamının yüzeyine dağıtılır, daha sonra kaplar 24 saat boyunca 37°C inkübatöre yerleştirilir. Daha sonra sonuçlar ölçülerek kaydedilir.

Minimum inhibisyon konsantrasyonu

Dirençli ve hassas izolatları araştırmak için bir mikrotitre plakası kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi benimsenir. Her izolat için sefetazidim ve siproflozasinin MİK'i aşağıdaki adımlar kullanılarak belirlenir (De Boer *et al.* 2015).

- Standart MacFarland bulanıklığına (1,5 x 108 hücre/mL) benzer bir bulanıklık elde etmek için, besin agarları üzerinde yetiştirilen ve 24 saat kültürlenen iki ila dört bakteri kolonisi alındı ve ardından 5 mL normal salin içeren tüplere aktarıldı.
- Daha sonra 100 µL MHH ilave edilerek bir dizi konsantrasyonda (4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048 µg/mL) antibiyotik tozu (seftazidime ve Siprofloksasin) hazırlanır. Çukurlarda, bir numaralı çukura hazırlanan antibiyotik çözeltisinden 100 µL eklenir ve 0,5 ile 2048 µg/mL arasında değişen bir yarım konsantrasyon elde etmek için bir dizi seyreltme yapılır. 37ºC sıcaklıkta 24 saat inkübe edilir ve ardından okunur.

3.6.8 Biyofilm oluşturma yeteneğinin saptanması

Biyofilm oluşumu, kantitatif mikrotiter-plaka yöntemi kullanılarak tespit edildi. Mikrodilüsyon yöntemi, dirençli ve hassas izolatları araştırmak için bir mikrotitre plakası kullanılarak aşağıdaki şekilde benimsenmiştir:

- Kültür ortamından besin agar ortamına iki ile dört koloni aktarıldı ve bulanıklıkları Macfarland'ın standart bulanıklığı ile karşılaştırıldı.
- 96 delikli bir polistiren levha ve her izolatın üç kopyası 200 µL bakteri süspansiyonu ile doldurulduu, negatif kontrol görevi gören boş bir akar besin ortamı ile plaka kaplandı ve 24 saat 37°C'de tutuldu.
- Kuluçka döneminden sonra kapak açılarak, bakteri süspansiyonu nazikçe çıkarıldı ve tüm çukurlar %0,9 NaCl ile üç kez dikkatlice temizlendi.
- Çukurlardaki hücreleri sabitlemek için 200 µL metanol döküldü ve 10 dakika bekletildi.
- Her çukura 200 µL %0,5 kristal menekşe uygulandı ve biyofilmleri lekelemek için 15 dakika bekletildi, ardından damıtılmış suda 2-3 kez yıkandı.
- Hücrelerden fazla boyayı çıkarmak için her deliğe 200 µL %95 etanol döküldü ve 10 dakika bekletildi.
- Dalga boyu 630 nm olan bir spektrofotometre kullanılarak her bir delik için absorbans ölçüldü, değerler kontrol ile karşılaştırıldı (Çizelge 3.6) (Shrestha *et al.* 2019).

Çizelge 3.6 MİK değerlerini hesaplamak için absorpsiyon sonuçları

Sıra	Absorbans değeri	Sonuçlar
1	ODI≤ODC	Biyofilm oluşturamıyor
2	ODI>ODC	Güçlü biyofilm ürünü
3	2ODC≥ODI>ODC	Biyofilmler için ara ürün

ODI=İzolatların Optik Yoğunluğu, ODC=Kontrolün Optik Yoğunluğu

3.6.9 *Rosmarinus officinalis*'in toplanması ve hazırlanması

Biberiye bitkisi, El-Bağdadi şehri Anbar Valiliği'nin batısında bulunan açık alanlardan toplanmıştır. Bitkini yaprakları (çalışma için gerekli olan kısım) oda sıcaklığında bulunan temiz saksılara yerleştirilmiştir ve açık bir yerde kuruyana kadar sürekli karıştırılmıştır. Daha sonra numuneler ince bir toz elde etmek için değirmen kullanılarak öğütülerek plastik kaplara yerleştirilmiş ve kullanılana kadar buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.6.10 *Rosmarinus officinalis*'in alkol ekstraktı

Biberiye bitkisinin yapraklarının alkollü ekstraktı hazırlanmıştır. Buna göre, biberiye bitkisinin kuru madde tozunun 50 gramı, Soxhlet Ekstraktörü vasıtasıyla alınır. Ardından % 95'lik bir konsantrasyonda 500 mL etanol ilave edilir ve ekstraksiyon işlemi 6 saat boyunca (60-50°C) bir sıcaklıkta devam eder. Elde edilen çözelti konsantre edildi. 37°C'lik bir sıcaklıkta vakumlu döner buharlaştırıcıdan geçirilir ve daha sonra ekstrakt kuruyana kadar 37°C'deki kurutucuya yerleştirilir

3.6.11 Alkol ekstraktlarının sterilizasyonu

2g alkollü ekstrakt, damıtılmış su ile seyreltilmiş 10 cm^3 Dimetil Sülfoksit DMSO içinde çözüldü, daha sonra karışım pastörizasyon yöntemi ile 62°C sıcaklıkta 10 dakika sterilize edilir. Ardından, sonraki seyreltmelerin hazırlanmasında kullanılan Standart alkollü ekstrakt konsantrasyonu elde edilir (Shareef 1998).

3.6.12 Kontaminasyonunun incelenmesi

Buzdolabında muhafaza edilen ve bir besin ortamı üzerine ekilen 0,1 mL doğal ekstrakt alınarak incelendi ve 24 saat boyunca 37°C'de inkübatörde inkübe edildi. Ardından doğal ekstraktların kontaminasyonu incelendi (Al-Rubaiee 2000).

3.6.13 Doğal ve endüstriyel malzemelerin bakterilere karşı inhibitör aktivitesinin difüzyon yöntemi ile ölçülmesi

Biberiye yaprağının alkollü ekstraktı için 2 g kuru ekstrakt ağırlığı ile bir stok solüsyon hazırlandı ve 10 mL (DMSO) organik solvent Dimetil sülfoksit distile su ile seyreltildi ve böylece bir baz konsantrasyonu elde edildi. Farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100, 150, 200 mg/mL) biberiye özü hazırlandı. Bu yöntem, iki plakanın her birine ve Muller Hinton Agar'ın merkezinde birer tane olmak üzere beş delik oluşturmak için bir mantar matkap kullanmayı içerir. Her bir konsantrasyon 100 µL/delik olacak şekilde eşit şekilde yayılmış ve daha sonra ekstraktan eser miktar kalmadığından emin olmak için bir saat buzdolabında bekletilmiştir. Bunu, 0,1 µL dilüsyon bakteri solüsyonu (1,5 x 106 (CFU/mL) uygulaması takip etmiştir. Seçilen *Escherichia coli* izolatları besiyerine konularak 37°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra inhibitör bölgesinin çapı mm olarak ölçülerek sonuçlar okundu. Pozitif kontrol olarak belirlenen örneklere DMSO yerleştirilir (Ouibrahim *et al.* 2013).

3.6.14 Biberiye ekstraktının mikro titrasyon kabı yöntemiyle *E. coli*'nin biyofilm oluşumuna etkisi

Bu yöntem, biyofilm oluşumunu test etmek için Al-Taee *et al.* (2018) tarafından aşağıdaki şekilde açıklanmıştır:

- Bakteriyel süspansiyon hazırlandı ve standart bir bulanıklık sabit tüpü (0,5) ile karşılaştırıldı, ardından bakteriyel süspansiyon sıvı kalp ve beyin infüzyon ortamında aşılandı ve 37°C'de 24 saat kuluçkalandı. Biberiye ekstraktının MİK değeri altındaki

konsantrasyonları içeren kültür ortamından tüpler hazırlandı ve bakteriyal süspansiyonu ile 24 saat 37°C'de inoküle edildi ve tüpler inkübe edildi.

- Her bir izolat için kalibrasyon kabının dikey sıralarının çukurlarına üç tekerrürlü 200 µL kültür ilave edildi ve kontrol muamelesi olarak kabul edildi ve kültür kültüründen 200 µL eklendi. Minimum inhibitör konsantrasyonunda biberiye ekstraktı içeren kültür ortamında yetiştirilen bakteri kültüründen eklenen kaplar 37°C sıcaklıkta 24 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon süresinden sonra, tüm çukurlar, yapışmayan bakteri hücrelerinden kurtulmak için fizyolojik salin ile yıkandı, ardından yapışık bakteri hücrelerini stabilize etmek için test çukurlarının her bir çukuruna %99 konsantrasyonda 200 µL metanol ilave edildi.
- Alkol dökülerek kurumaya bırakılan tabak %1 kristal viyole boya ile 5 dakika boyandı ve ardından üç kez yıkanarak boya uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- Yapışık ve lekeli bakteri hücrelerinin absorpsiyon spektrumu (OD), izolatların biyofilm üretimindeki etkinliğini belirlemek için 630 nm dalga boyuna sahip otomatik bir ELISA okuyucusu aracılığıyla ölçüldü ve bunu biberiye ekstraktı ile muamele edilmiş bakteri hücreleri ile karşılaştırarak, verilen denklemi uygulayarak bakteriyel adezyon inhibisyonunun yüzdesi Denklem (3.2)'deki gibi belirlendi (Gudiña *et al.* 2010).

$$\textbf{Membran inhibisyonunun biyojenitesi (\%100) yüzdesi} = 1 - \left(\frac{\textbf{Tedavinin optik yoğunluğu (OD)}}{\textbf{Kontrol edilecek optik yoğunluk (OD)}}\right) \times 100\% \qquad (3.2)$$

3.6.15 Bakteri izolatlarının genetik içeriğinin incelenmesi

3.6.15.1 Genomik DNA'nın ekstraksiyonu ve saflaştırılması

DNA ekstraksiyonu, Geneaid bakteriyel DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit bileşenleri Çizelge 3.7'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.7 Genomik DNA ekstraksiyon kitinin bileşenleri

Bileşenler	**Hacim**
Gram+ Tampon 1	30 mL
GT Tamponu	30 mL
GB arabelleği	40 mL
W1 Tamponu	45 mL
Yıkama Tamponu 2	25 mL
Proteinaz K3	2x11 mg
DDH_2O	(1,1 mL)
Etanol	(100 mL)
Lizozim	4 mg/mL
Elüsyon Tamponu	30 mL
GD Sütunları	100
Toplama Tüpleri	2 mL

Örnek hazırlama

- *Escherichia coli* izolatları, MacConkey's besiyerinde üreyen tek bir koloni kültür özesi kullanılarak alınarak 3 mL beyin kalp suyu içeren test tüpüne eklenerek büyütüldü, ardından tüpler 37°C'de 18 saat inkübe edildi.
- 1,5 mL'lik bir Eppendorf tüpüne beyin kalbinin ortasında büyüyen *E. coli* izolatlarının her bir süspansiyonundan 1 mL eklendi.
- Askıya alınan hücreler, biriken hücreler 1,5 mL'lik bir Eppendorf tüpünün altında tutulurken üst sulu tabaka çıkarıldıktan sonra 14,000 rpm'de 2 dakika santrifüjleme yoluyla kültür ortamında toplandı.
- Süzüntü santrifüjlenip bertaraf edildikten sonra çökeltiyi alıp 180 µL GT tamponu eklendi. Daha sonra karışım vorteks cihazında veya pipetle çalkalandı. Ardından, Proteinaz K eklendi ve karışım, inkübasyon süresi boyunca her 3 dakikada bir karıştırılarak, 15 dk süreyle 60°C'lik bir su banyosuna yerleştirildi.

Lizis

Escherichia coli izolatlarına 200 µL GB tamponu eklendi ve vorteks cihazı ile 10 saniye karıştırıldı. Karışım, 70°C sıcaklıkta bir su banyosunda 10 dk süreyle inkübe edildi. Aynı

zamanda yıkama tamponu solüsyonu 70°C sıcaklıktaki su banyosu içerisine son adım No. (c) oluncaya kadar yerleştirildi.

DNA bağlanması

Her numuneye ayrı ayrı (%96-100) konsantrasyonda 200 µL etanol solüsyonu ilave edildi ve DNA iplikçikleri görünene kadar yukarıdan aşağıya doğru hızla karıştırıldı. GD kolonu 14,000-16,000 rpm aralığında iki dakika santrifüjlendi. Santrifüjlemeden sonra GD kolonu atıldı ve yenisi yerleştirildi.

Yıkama

Filtre tüplerini içeren parametre GD kolonuna 400 µL W1 tamponu ekleyip 14,000-16,000 devir/dk aralığında 45 saniye santrifüj ettikten sonra GD kolonu içindeki filtreyi çıkarıp tekrar alıyoruz. Hazırlanan Yıkama Tamponundan 600 µL (100 mL %100 etanol ekleyerek) ekledikten sonra ardından 45 saniye santrifüj edip süzüntüden kurtulup filtreleri tutuyoruz. Son santrifüj işlemi tamamen kuru olan GD kolonu içerisinde 3 dakika boyunca herhangi bir ilave yapılmadan gerçekleştirildikten sonra filtreyi muhafaza edip çıkartıyoruz ve filtreyi steril ve temiz bir eppendorf içerisine yerleştiriyoruz.

Elüsyon

Filtre merkezine (filtre ortamı) 100 µL Elüsyon Tamponu eklenir ve 5 dakika bekletildikten sonra 14,000-16,000 devir/dakika aralığında 30 saniye santrifüj işlemi yapılır ve sonrasında elüsyondan kurtulur. Saf DNA'yı filtreler ve tutar. DNA, kullanılana kadar -20°C'ye kadar düşük sıcaklıklarda tutulur.

3.6.15.2 DNA karakterizasyonu

DNA karakterizasyon süreci aşağıdaki aşamaları içermektedir.

1) DNA konsantrasyonu ölçümü

DNA'nın saflığını ve konsantrasyonu Sambrook *et al.* (1989) tarafından belirtilen yönteme göre yapılmıştır. Bu nedenle nanodrop cihazı kullanılmıştır. DNA örneğinden 2 mikrolitre alınarak nano cihazın merceğine yerleştirdi. Numunenin absorbansı UV ışığı ile ölçüldü. Nanodrop cihazı 260 nm ve 280 nm dalga boyuna sahiptir, ardından orijinal numunedeki DNA konsantrasyonları tahmin edilmiştir.

2) DNA saflık ölçüm cihazları

DNA saflık derecesi, 260 nm dalga boyunda ölçülen optik yoğunluğun 280 nm dalga boyunda ölçülen optik yoğunluğa bölünmesiyle ölçüldü.

3.6.15.3 DNA agaroz jel elektroforezi

- Elektroforez işleminde kullanılan solüsyonlar Reilly *et al.* (2017)'de belirtilenlere göre ve aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:
- X10 TBE tamponu (Tris-Borat-EDTA tamponu) üretici firma talimatlarına göre stok solüsyon olarak hazırlanır ve kullanılacağı zaman distile su DW X1oranında seyreltilir.
- 100 mg etidyum bromür boya tozu 10 mL distile su ile içinde çözüldü ve karışım, 40 µL/L damıtılmış su ilave edilerek kullanılıncaya kadar 4°C'de opak bir şişe içinde tutuldu.
- X10 Yükleme tamponu üretici Pioneer tarafından tedarik edildi.
- 2 g agaroz 100 mL TBE tamponu içinde çözülmesiyle% 2 agaroz jeli hazırlandı.

DNA elektroforezi, agaroz jel üzerinde aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir;

- Jel tepsisini elektroforez cihazı için hazırlanır ve agarozun sızmasını önlemek için kalıbın bir kenarından 1 cm uzağa lastik bant yerleştirilir.

- Ekstrakte edilen DNA örneklerini tespit etmek için %2 konsantrasyonda agaroz jeli hazırlandı. Yukarıdaki konsantrasyonları elde etmek için, 100 mL 1X TBE tamponuna 2 g agaroz ilave edildi (10 mL 10X tbe'nin 90 mL damıtılmış su DW ile karıştırılmasıyla hazırlandı). Çözünme işlemi, karışımın bir Mikrodalga cihazına yerleştirilmesiyle kaynama noktasında gerçekleştirildi ve daha sonra 50°C'lik bir sıcaklığa soğumaya bırakıldı, ardından 1 mikrolitre hacimli etidyum bromür boyası ilave edildi.
- Jöle kalıba yavaş ve dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşmaması için dökülür (varsa pipet ile alınır). Jöle oda sıcaklığında 45-30 dakika katılaşmaya bırakılır.
- Tarak sertleşmiş agarozdan dikkatlice kaldırılır, lastik bant sessizce kaldırılır ve kalıp bir 1X TBE içeren elektrikli röle havuzuna yerleştirilir. Jeli, jel yüzeyinden 3-5 mm yüksekliğe kadar tamponun içine daldırılır.

Agaroz jel üzerinde elektroforez işlemi aşağıdakileri şekildedir;

- İncelenen ve taşınacak her 8 µL DNA örneği 2 µL bromofenol mavisi boya çözeltisi (yükleme tamponu) ile iyice karıştırılır.
- Her numunenin karışımını büyük bir özenle taşınır ve numunenin çukurların yüzeylerinden çıkmamasına dikkat ederek jelin çukurlarına yüklenir.
- Güç kaynağını açılır ve 90 dakika boyunca 45 volta, ardından 90 dakika boyunca 60 volta veya bazen mavi boya jelin bitimine ulaşana kadar röle işlemi yapılır.
- Elektrik rölesi süresi bittikten sonra jelin kaldırılır.
- Jel karanlık bir odada 300 nm dalga boyunda bir UV transillüminatörüne maruz bırakarak incelenir ve bir UV ışık cihazı kullanarak jelin görüntülerini demet konumunu standart 100 bp DNA Ladder ile karşılaştırarak DNA fragmanlarının moleküler boyutunu tahmin edilir. DNA'nın moleküler ağırlıkları, bu moleküllerin jelde moleküler ağırlıklarıyla ters orantılı olarak kat ettikleri mesafeye dayanılarak ve markerler olarak bilinen moleküler ağırlıklara sahip DNA parçaları kullanılarak belirlendi.

3.6.16 DNA polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği

A) PCR reaksiyonlarında kullanılan çözeltiler

- **Primerler**

Bu çalışma için özel olarak tasarlanmış, FLU genini hedef alan spesifik primerler kullanılarak BİONER firmasından liyofilize toz olarak hazırlanmış ve firmanın önerileri doğrultusunda distile ve steril su hacminde tekrar çözülerek stok solüsyon elde edilmiştir. Her adım için 100 P mol/µL konsantrasyonla hazırlanır ve ardından bu saklama solüsyonu -20°C sıcaklıkta tutulur (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8 Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler

Gen	Sekans dizisi 5 →3 ´	Hedef gen boyutu (bp)
FLU	F: ATGGCGGAACACTGGTAAAC	181
	R: TGCACAATCTGACGACCATT	
recAE	F: GGCCGTATCGTCGAAATCTA	158
	R: ATATCGACGCCCAGTTTACG	

- **PCR ön karışımı**

Bu karışım Koreli şirket Pioneer tarafından hazırlanan karışımın üretici firma talimatlarına uygun olarak hazırlanmıştır.

- **Volumetrik işaretleyici**

Biyolabs tarafından sağlanan DNA marker boyutu (100-1500) baz çiftleri, polimeraz zincir reaksiyonundan (PCR) sonra ortaya çıkabilecek DNA segmentlerinin boyutunun bir göstergesi olarak kullanıldı. DNA örnekleri, 80 dakikalık bir süre boyunca 100 voltluk bir voltaj üzerinden geçirilerek yürütüldü, ardından PCR ürününü içeren jel, 260 nm dalga boyuna sahip bir UV-transilüminatör ve bir jel görüntüleme cihazına sahip görüntüler

kullanılarak incelendi. Ardından bilinen molekül ağırlıkları 100-1500 baz çifti olan hacim indeksine ait kirişlerin konumları ile karşılaştırıldı ve ağırlıklarını ölçmek için kullanıldı.

B) DNA polimeraz zincir reaksiyonu tekniği kullanılarak virülans faktörü geninin araştırılması

PCR reaksiyonları steril koşullar altında gerçekleştirildi ve adımlar aşağıdaki şekilde gerçekleştirldi;

Bakteri izolatlarından ekstrakte edilen DNA örnekleri için reaksiyon bileşenleri 1,5 mL'lik steril bir eppendorf tüpünde karıştırılarak DNA içermeyen ana reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaktanların hacimleri, Denklem (3.3) kullanılarak nihai konsantrasyonlarını elde etmek için hesaplandı:

$$C1*V1=C2*V2 \quad (3.3)$$

Eklenen suyun hacmi Denklem (3.4) ile hesaplandı;

$$\text{Su hacmi}=\text{Toplam reaksiyon hacmi}-\text{Toplam diğer reaksiyon bileşenleri} \quad (3.4)$$

Materyaller mikropipet kullanılarak eppendorf tüpünde iyice karıştırıldı ve daha sonra reaksiyonun temel bileşenlerinin karışmasını önlemek için karıştırma işlemleri sırasında tüplerin buz içine yerleştirilmesi ve karışık malzemelerin bozulmasına yol açan reaksiyonların oluşması veya reaktanların denatürasyonunun meydana gelmesi nedeniyle 3-5 saniye bir mikrofüj santrifüjüne yerleştirildi.

Ana reaksiyon solüsyonu 0,2 mL kapasiteli ve her bir tüp için 23 µL hacimli ependorf tüplerine dağıtıldı, ardından her bir tüpe her örnek için 2 µL DNA ilave edilerek her örneğin son hacmi 25 µL olarak tamamlanır (Çizelge 3.9). Ardından gösterildiği gibi ve reaksiyonun gerçekleşmesi için termopolimer cihazına dikkatlice yerleştirilir (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.9 FLU geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bileşenleri

Bileşenler	Hacim (µL)	Son odak
Serbest nükleaz suyu	4,5	
İleri primer	1,5	10 pmol/µL
Ters primer	1,5	10 pmol/µL
DNA şablonu	5	25–50 ng
Ana karışım	12,5	
Son hacim	25	

Çizelge 3.10 FLU geni PCR reaksiyon karışımı için özel termopolimer cihazının programı

Ana Adımlar	Döngü Sayısı	Zaman	Sıcaklık (ºC)
İlk denatürasyon	1	5 dk	94
Denatürasyon	35	30 sn	94
Tavlama		1 dk	52
Primer uzatma		1 dk	72
Son uzatma	1	5 dk	72

Reaksiyon süresi sona erdikten sonra tüpler polimeraz aparatından çıkarılır ve 10 µL replikasyonlu DNA örneği alınır. Karışımı hazırlanan agaroz jelin çukurlarına (100-1500) baz çiftlerini yüklemek için belirlenmiş bir delik ile (%2) konsantrasyonda yüklenir ve ardından numuneler elektroforez ile 1,5 saat boyunca yürütülür. Daha sonra jel, istenen geni boyamak için bir saat boyunca etidyum boyasının içine yerleştirilir ve ardından jel, bir jel görüntüleme cihazı ile fotoğraflanır.

3.6.17 Gen ifadesi

3.6.17.1 Genel RNA ekstraksiyonu ve kiti

Bu kit, bakteriyel RNA'yı ekstrakte etmek ve saflaştırmak için kullanıldı. Dongsheng Biotech firması tarafından sağlanan kit içerik açısından hücre duvarını parçalamak için kullanılan çeşitli çözeltilerden oluşmaktadır (Çizelge 3.11). RNA ekstraksiyon işlemi aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

- Hücreler, 12,000 rpm 2 dk boyunca santrifüjlenir ardından tortu çıkarılır ve bakteri çökeltisi kalır.
- Bakteri hücrelerine 1 mL TRİzol reaktifi verildikten sonra mikropipet kullanılarak hücreler çıkarılır ve daha sonra çözelti içine geri konulur. İşlem karışım iyice homojen hale gelene ve hücre analizi aşaması bitene kadar devam eder. Bazı hücrelerin çözünmesi diğerlerinden daha uzun sürer ve bu da homojenizatörün bulunmasını gerektirir.
- Karışım, protein kompleksini tamamen ayrıştırmak için 15-30°C'de beş dakika süreyle inkübe edilir.
- Karışım 12,000 rpm hızında 4°C'de 5 dakika santrifüjlenir.
- Süzüntü 1,5 mL hacimli yeni bir eppendorf tüpe aktarılır ve bu adımda protein, yağ ve polisakkarit atılır.
- 1 mL TRİzol başına 200 µL kloroform eklenir ve 15 saniye iyice çalkalanır.
- Karışımı oda sıcaklığında üç dakika inkübe edilir.
- Karışım 12,000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüjlenir.
- Santrifüjlemeden sonra üç şeffaf beyaz tabaka, bir orta tabaka ve bir sarı tabakadan oluşan bir karışım oluşur. RNA şeffaf tabakada bulunur.
- Şeffaf tabaka, hacminin yarısı kadar mutlak etanol alkol (1,5 mL) eklenmiş bir eppendorf tüpe aktarılır. Hacimler her zaman 600-700 µL arasındadır.
- Karışım, saflaştırma kolonuna gönderilmeden önce eppendorf tüpü 5 ile 7 kez döndürülerek karıştırılır. 12,000 rpm'de 30 saniye süreyle yapılan santrifüj işlemi boyunca kolon membranından dış tüpe geçen süzüntü dikkate alınmamıştır.
- 500 µL RPI eklenir, etanol ile çözülür ve 12,000 devirde 30 saniye santrifüjlendikten sonra süzüntü atılır.
- 500 µL etanolde çözünmüş Yıkama tamponu (RW) eklenir, oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilir, 12,000 rpm 30 saniye santrifüjlenir ve saflaştırma kolonundan akan süzüntüyü atıldıktan sonra bu adım tekrarlanır.
- Karışım kurutmak ve alkolden arındırmak amacıyla spin kolon için 12,000 devirde iki dakika santrifüjlenir.
- Saflaştırma kolonunu 1,5 mL'lik bir eppendorf tüpüne aktarılır. 30-100 µL DEPC solüsyonunu doğrudan membrana eklenir, oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir

ardından DNA ribozunu almak için 2 dakika 12,000 rpm'de santrifüjlenir. Tüp saf RNA içerir, DNA -20ºC'de saklanır.

Çizelge 3.11 Çalışmada kullanılan bakteriyel RNA ekstraksiyon kitinin bileşenleri

Test kiti	**Muayene kitinin bileşenleri**		**Üretici Firma**
Genel RNA ekstraksiyon kiti	**Hacim**	**Malzeme tipi**	Dongsheng Biotech
	60 mL	RL Çözeltisi	
	18 mL	Yıkama Tamponu RPI	
	12 mL	Yıkama Tamponu RW	
	10 mL	DEPC ile arıtılmış su	
	Her biri 50	RNaz içermeyen döndürme Kolonu	
	Her biri 50	RNaz içermeyen mikrosantrifüj	

3.6.17.2 RNA karakterizasyonu

RNA karakterizasyon süreci RNA konsantrasyonunun ve saflığının ölçülmesinden oluşur. RNA konsantrasyonu, Nano Drop kullanılarak belirlenir. Saflığı ise 260 nm dalga boyunda ölçülen optik yoğunluğun 280 nm dalga boyunda ölçülen optik yoğunluğa bölünmesiyle elde edilir.

3.6.17.3 mRNA şablonundan cDNA üretimi

WizScriptTM RT FDmix Kitinin yardımıyla RNA, cDNA'ya ters kopyalanır. cDNA oluşturmak için özel bir tüpte 5 µL RNA'nın 15 mL damıtılmış iyonik olmayan su ile karıştırılmasıyla üreticinin belirttiği şekilde gerçekleştirilir.

3.6.17.4 WizScript™ RT FDmix kitinin tanımlaması

RNA şablonundan ilk cDNA dizisinin üretim, entegre ve etkili bir sistemdir. cDNA'nın başarılı üretimi için gerekli tüm reaktifleri uygun miktarda toplar ve tek bir adımda tüpe yerleştirir. Bu durum, zamandan tasarruf ederek ve olası hataları azaltması bakımından önemlidir. RT FDmix (Hexamer) tüpü, bir ters transkriptaz enzimi, RNaz İnhibitörü,

$MgCl_2$, azotlu bazlar ve RNA şablonuna bağlanmak için rastgele bir primer içerir. Belirtilen WizScript™ RT FDmix Kitinin çalışma yöntemi;

- Tüm reaktifler ve RNA şablonunu buz üzerinde eritilir ve hafifçe çözülür.
- RT FDmix tüpleri PCR tüp tutucusuna yerleştirilir.
- Reaksiyon bileşenleri RT FDmix tüpüne eklenir (Çizelge 3.12).
- Tüpler termopolimerizasyon cihazına Çizelge 3.13'te belirtilen programa uygun olarak yerleştirilir.
- cDNA, -20ºC'de uzun süre korunan bir PCR reaksiyonu için şablon olarak kullanılır.

Çizelge 3.12 Toplam RNA'dan cDNA hazırlamak için kullanılan bileşenler ve reaksiyon hacmi

Bileşenler	**Reaksiyon hacmi (µL)**
RT FDmix	1 tüp
Toplam RNA	<5 µg
Nükleaz içermeyen H_2O	20 µL'ye kadar

Çizelge 3.13 Termopolimerizasyon programının adımları

Aşama	**1**	**2**	**3**	**4**
Sıcaklık	25ºC	42ºC	85ºC	4ºC
Zaman	10 dk	30 dk	5 dk	∞

3.6.17.5 qPCR kitinin tanımlaması

WizPure ™ qPCR Ana Kiti (SYBR), replikasyon için bir şablon olarak RNA'yı kullanan gerçek adımlı bir replikasyon zincir reaksiyonunda kullanım için uygun ve hassas bir çözümdür. Çalışma yöntemi aşağıda gösterilmiştir.

Adım 1: qPCR Master (SYBR) solüsyonunun hazırlanması

Kullanıma hazır bir qPCR Master solüsyonu (SYBR), primerler ve şablon hariç, tamamlayıcı cDNA'nın replikasyon ve tespit işlemi için gerekli bileşenlerden oluşur.

Karışım çözeltisi, reaksiyon için gerekli tüm bileşenleri içerir: yüksek saflıkta azotlu bazlar, $MgCl_2$, Taq DNA Polimeraz, SYBR yeşil boya.

Her bileşen için gerekli hacimler Çizelge 3.14'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.14 qRT-PCR bileşenleri

Bileşenler	**20 µL**	**Hacim**
qPCR Ana (SYBR)	10 µL	**1 X**
İleri primer (10 µM)	1 µL	**0,5 µM**
Ters primer (10 µM)	1 µL	**0,5 µM**
cDNA Tampleti	2 µL	**(100 ng/20 µL)**
Deiyonize distile su	6 µL	**N-A**

Adım 2: Gerekli hacimlerde qPCR Master solüsyonu (SYBR), şablon ve primerler reaksiyon tüplerine aktarılır ve santrifüj yapılır.

Adım 3: qRT-PCR programının uygulanması

Tüplerin içerikleri mikser yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra qRT-PCR cihazına yerleştirilir ve gen ekspresyon miktarının (FLU, recAE) araştırılması için çoğaltma adımları uygulanır. *Escherichia coli* için qRT-PCR cihazının programlanması Çizelge 3.15'te gösterişmiştir.

Çizelge 3.15 PCR-qRT reaksiyonu için program ve döngüler

Adım	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngüler**
Enzim aktivasyonu	95°C	5 dakika	Tutmak
Denatürasyon	95°C	30 saniye	35 Döngü
Tavlama	52, 53°C	30 saniye	
Eklenti	72°C	20 sn	

Adım 4: Livak denklemini kullanarak Ct değerini hesaplanması

Ayrışma eğrileri ile gösterilen ve floresansın maksimum olduğu noktaları belirten Döngü Eşiği (Ct) değerleri, aşağıdaki Denklem (3.5), Denklem (3.6), Denklem (3.7) ve Denklem (3.8) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\Delta\mathrm{Ct}(\text{işlenmiş örnek}) = \mathrm{CtGen} - \mathrm{Ct\ HK.} \quad (3.5)$$

$$\Delta\mathrm{Ct}(\text{kontrol}) = \mathrm{CtGen} - \mathrm{Ct\ H.K.} \quad (3.6)$$

$$\Delta\Delta\mathrm{Ct} = \Delta\mathrm{Ct}(\text{işlenmiş}) - \Delta\mathrm{Ct}(\text{kontrol}) \quad (3.7)$$

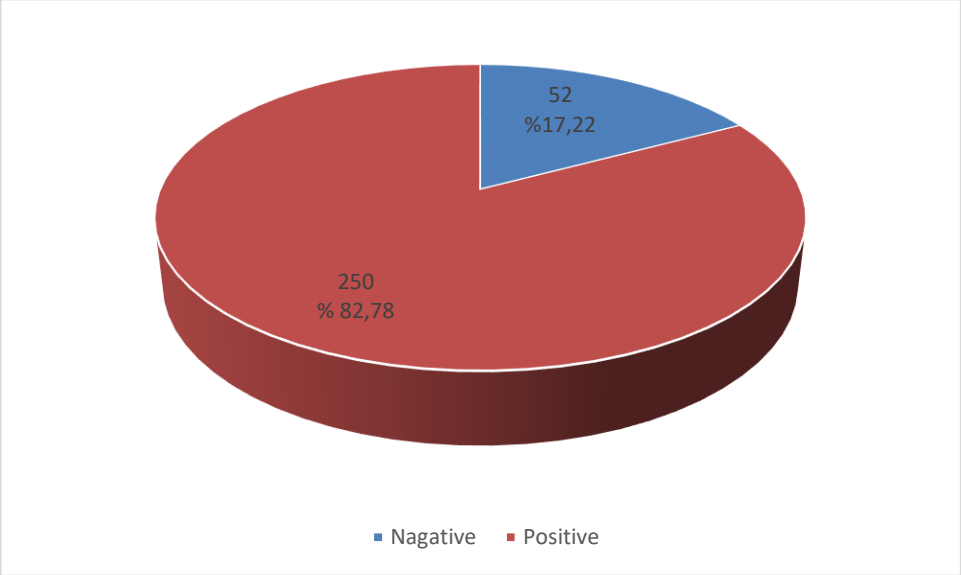
$$\mathrm{Follding} = 2^{\Delta\Delta\mathrm{Ct}} \quad (3.8)$$

- CtGen, hedef genin Ct değerini ifade eder
- Ct HK Tedavi edilen genin (House Keeping) Ct değerini ifade eder.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 İzolasyon ve Teşhis

20 Mart- 20 Haziran 2022 tarihleri arasında Ramadi Kadın ve Çocuk Eğitim Hastanesi ile Felluce Kadın ve Çocuk Hastanesine başvuran, çeşitli patolojik durumlara (yaralar, yanıklar, akıntı ve idrar) sahip kişilerden 302 klinik numune toplandı. Bu örneklerde *E. coli* bakterileri bakımından pozitif numune sayısı 250 (%82,78)'dir. MacConkey agarda pozitif numune sayısı Şekil 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1 Patolojik vakalardan izole edilen *E. coli* prevalansının yüzdesi

Tespit edilen yüksek pozitif kültür yüzdesi alınan numunelerin çoğunun, bu duruma neden olan bakterilerin duyarlılıklarını artıran birçok güçlü virülans faktörüne ek olarak uygun olmayan çevresel koşullar sebebiyle oluşan patolojik etmenlerden kaynaklanmaktadır. Bu etmenler arasında bakterilerin enfeksiyona neden olmasının ilk adımı olan tutunma yeteneğinin yanı sıra dokularda hasara ve ayrışmaya neden olan kapsüller ve toksinler üretmesi yer almaktadır (Raeispour and Ranjbar 2018).

Hastaların ve hastanelere gelenlerin çoğu, üriner sistem, sindirim sistemi, yaralar ve vücudun diğer bölgelerinde enfeksiyona yol açan bakterilerle enfeksiyona her zaman

daha duyarlıdır. Bakteriler tüm ortamlarda benzer oranlarda bulunabilirler, ancak bu çevresel koşulların enfeksiyon açısından farklılık gösterdiği açıktır. Bu durum bakterilerin enfeksiyona neden olmalarına yardımcı olan birçok virülans faktöre ek olarak direnme yeteneklerine sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Meydana gelen enfeksiyon ve bu hastalıkların etkisi basit ile çok şiddetli arasında değişmektedir ve insan hayatını tehdit etmektedir (Pena *et al.* 2014).

Elde ettiğimiz sonuçlar, 162 izolatın (%53,64) Gram negatif bakteriler, 107 izolatın (%38,74) ise Gram pozitif bakteriler olduğunu göstermiştir. Bunlara ek olarak 23 izolatta (7,61) hiçbir bakteri üremesi tespit edilmemiştir (Çizelge 4.1). Shayma'a *et al.* (2011) tarafından yapılan çalışmada Gram pozitif bakteriler %62, Gram negatif bakteriler ise %73,5 olarak belirlenmiştir ve bu durum bizim çalışmamız ile uymluluk göstermemiştir. Enfeksiyon olaylarında Gram negatif bakteriler ilk sıralarda yer almaktadır. Özellikle hastane ortamında hastalığa neden olabilen bakterilerin yaygın bir şekilde yayılmasının sebebi, yemek yemenin yanı sıra bu türlerle kontamine olan hastalar arasındaki doğrudan temas ve dolaylı olarak hastanelerde kullanılan aletlerle açıklanmaktadır. Genellikle hastaneler bu hastalıkların bulaşma yolu olarak kabul edilir.

Çizelge 4.1 Gram pozitif ve Gram negatif izolatların yüzdesi

Tür	**İzolat sayısı**	**İzolat yüzdesi**
Gram negatif bakteriler	162	%53,64
Gram Pozitif Bakteriler	117	%38,74
Üreme olmayan	23	%7,61
Toplam	**302**	

4.2 *E. coli*'nin Bakteriyel Teşhisi

Tüm izolatlar MacConkey agar besiyeri ve eozin metillenmiş mavi besiyerinde büyütülmüştür. MacConkey besiyerinde üreyen tüm koloniler, laktoz için fermente edilmiş pembe yuvarlak koloniler ve eozin metillenmiş mavi besiyerinde üreyenler ise yeşil metalik bir parlaklık göstermiştir. Bu durum, *E. coli* bakterisinin, *Enterococcaceae* familyasına ait diğer bakteri türlerinden ayırt edici özelliklerindendir. Bu besiyerinde

bulunan eozin ve metil mavi boya bir araya geldikten sonra asidik ortamda çökelirler. Bakteriler, laktoz ve sukrozun fermantasyonundan organik asit üretirken (Singh and Prakash 2008), kanlı agar besiyerinde gelişen *E. coli* kolonileri kremsi bir köpük şeklinde ortaya çıkar.

Ayrıca bu bakteriler ışık mikroskobunda Gram boyama ile boyanarak küçük Gram-negatif basiller olarak görünür. Bunlara ek olarak biyokimyasal testlerin sonuçlarına göre katalaz ve indol enzimini ürettiği, oksidaz oluşturmadığı, metil kırmızısı için pozitif, hareketli ve Fox Proscauer testi için negatif olduğu tespit edilmiştir. Klasik ortamda ise, asit ve gaz ürettiği ve H_2 üretmediği ortaya çıkmıştır. Sitrat tüketiminde ise; bileşensiz, negatif, üreaz üretmeyen ve kinetik testi pozitif olarak belirlenmiştir.

Yukarıda belirtilen kültür, mikroskobik ve biyokimyasal testlerin sonuçları ile bu özelliklerin *E. coli* bakterisine ait olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca teşhisi doğrulamak amacıyla Vitek 2 sistemi kullanılmıştır. *E. coli*, izolat tipine göre Vitek 2 cihazında tanı oranı %96-99 arasındadır. Mikroskobik testler ile Vitek 2 cihazından elde edilen sonuçlara göre *E. coli* bakterisine ait 107 izolat tespit edilmiştir.

E. coli bakterilerinin biyokimyasal testlerin ile teşhisinde elde edilen sonuçlar Brown and Smith (2005)'in çalışmalarıyla benzerlik göstermiştir. Geleneksel yöntemlerle tanı sonuçları incelendiğinde ise kültürel ve biyokimyasal testler de dahil olmak üzere bu yöntemlerle tanının yavaş ve yorucu yöntemler olduğu, bunun nedeninin ise biyokimyasal testlerin uzun sürmesinden ve zahmetli olmasından kaynaklandığı görülmektedir. Çok sayıda ortam ve diferansiyel reaktif nedeniyle çalışma ve hazırlıkta geniş alan ve bu, laboratuvardaki çalışanın, teşhis için gereken numune sayısının çok olması ve bu numunelerin birçok kez kullanılması nedeniyle yorulmasına neden olur. Geleneksel yöntemler tecrübeye ek olarak yüksek doğruluk ve odaklanma gerektirmesinin yanı sıra steril koşulların olmaması nedeniyle kontaminasyona maruz kalabilmekte ve bazı durumlarda teşhis yapanın bu konudaki kişisel görüşüne bağlı olabilmektedir (Woodford *et al.* 2011).

E. coli bakterisinin izole edilmesi ve teşhis edilmesiyle elde edilen sonuçlar, bu bakteriyi idrar yolu enfeksiyonu vakalarından veya diğer patolojik durumlardan izole edebilen birçok araştırmacının sonuçlarıyla tutarlılık göstermiştir (Robino *et al.* 2014). Ayrıca bu bakteri, enfeksiyonu olmayan sağlıklı kişilerin idrarından, bakteriyemi ve ishal vakalarından da teşhis edilmiştir (Mao *et al.* 2012).

Bu bakterinin patolojik vakalardan izole edilip teşhis edilmesinin yanı sıra, banyo suları ve bulaşık yıkama sularından ayrıca tarımda kullanılan sulama sularından elde edildiği tespit edilmiştir (Tantawiwat *et al.* 2005) ve *E. coli* bakterilerinin izolasyon yüzdelerindeki ve bunların patolojik koşullardan veya çevreden izolasyonlarındaki bu farklılık, temel olarak farklı toplumlardaki sağlık bilgisinden kaynaklanmaktadır.

Patojenik *E. coli*'yi teşhis etmek için kullanılan geleneksel yöntemler yüksek teknik beceri gerektirir. Bununla birlikte, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) gibi kullanarak modern yöntemlerde bulunmaktadır (Sarowska *et al.* 2019). Bu PCR reaksiyonu, hızlı tespit ile karakterize olmasına rağmen, *E. coli* türlerinin kendilerini ayırt etmek için uzun zaman ve çok fazla malzeme gerektirmez ve bu test, yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçları ayırt etmek için çok önemlidir (Jang *et al.* 2017, Zarringhalam *et al.* 2016) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 *Escherichia coli* izolatlarının mikroskobik ve biyokimyasal inceleme sonuçları

Test türü	**Test sonucu**
Krem boya	- (%100)
Katalaz Reaktifi	+ (%100)
Oksidaz Enzim Testi	- (%100)
İndol Reaktifi	+ (%100)
Metil kırmızı testi	+ (%100)
Fox- Prescore puan testi	- (%100)
Sitrat tüketim testi	- (%100)
Hareket Testi	+ (%100)
Üre Üretim Testi	- (%100)
Hidrojen Sülfür Üretim Testi	- (%100)

4.2.1 Patolojik örneklerden *E. coli* bakterisini izolasyonu

Farklı patolojik durumları temsil eden 302 örnek farklı kültür ortamlarına (Kanlı agar, MacConkey agar ve EMB) ekilerek incelendi (Çizelge 4.3). Yetiştirme özelliklerine göre, incelenen bu patolojik vakaların izolatları, idrara çıkma örneklerinde %43,24, boşaltım örneklerinde %27,83 ve yara örneklerinde ise %26,82 oranında üreme göstermiştir. Ayrıca, en düşük yüzde %31,02 ile yanık örneklerinden elde edilmiştir. Bakteriyel enfeksiyonun yüzdesi, hastalıkların yayılması nedeniyledir ve hastanelerde salgın hastalıklar, bu bakteriyle enfeksiyon yüzdesine katkıda bulunan bir faktör olabilir (Ben-Ami *et al.* 2009). Bakterinin yaygınlık oranı için 1079 örnekten 1034'ünde ishali olan küçük çocuklardan izole edilen *E. coli* bakterilerinin çoğunluğunda tespit edilmiştir. İshal, dünya çapında çocuklar ve ölümler arasında önemli bir hastalık nedeni olarak kabul edilmektedir. Yılda 1,731 milyar enfeksiyon vakasına ve 711,800 kişinin ölümüne neden olmaktadır (Mosquito *et al.* 2012, Walker *et al.* 2013). *E. coli* bakterisinin az gelişmiş ülkelerde yaygın bir ishal nedeni olduğu ve her yaş grubunu özellikle beş yaşın altındaki çocuklar için sekizinci ölüm nedeni olduğu ve Meksika'da 5,5 milyondan fazla ishal vakasının çoğunlukla savunmasız ülkelerde olduğu tespit edilmiştir. Küçük çocuk grupları ve dolayısıyla ishal hastalığı ve yayılması sindirim sistemi hastalıklarıyla ilişkilendirilmiştir ve nedeni *E. coli* bakterisidir (Lim *et al.* 2020, Lu *et al.* 2014).

Çizelge 4.3 Farklı klinik vakalarda *E. coli* bakterilerinin dağılımı

Klinik vaka	***Örnek sayısı***	***Escherichia coli izolatları***	***Yüzde***
İdrar	*148*	*64*	*%43,24*
Dışkı	*97*	*27*	*%27,83*
Yara	*41*	*11*	*%26,82*
Yanık	*16*	*5*	%31,02

4.2.2 Antibiyotiklere duyarlılık ve direnç testleri

E. coli izolatlarının antibiyotiklere duyarlılığı, bu bakterinin çalışılan antibiyotiklere (12 antibiyotik) karşı duyarlılığını ve direncini belirlemek için difüzyonla disk yöntemiyle test edildi (CLSI 2021). 107 *E. coli* izolatının antibiyotiklere karşı gösterdiği tepkiler standart inhibisyon çaplarına göre duyarlı, orta duyarlıklı ve dirençli olarak

sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.4). Bakteriyel izolatların çoğu antibiyotiğe dirençliydi olarak tespit edilmiştir. Bunun nedeni antibiyotiklerin aşırı kullanımına ek olarak bu bakterilerin kullanılan antibiyotiklerin çoğuna karşı direnç mekanizmaları geliştirmiş olmalarından kaynaklanmaktadır (Blahna *et al.* 2006).

Çizelge 4.4 Farklı antibiyotiklerin *E. coli* bakterisine karşı etkisi

Bakteri adı	***E. coli***		
Toplam izolat sayısı	**107**		
	S	**I**	**R**
Siprofloksasin (CIP)	33,65	2,80	63,55
Amoksisilin/klavulanat (AMC)	79,44	0,93	19,63
Seftazidim (CAZ)	20,56	0	79,44
Tetrasiklin (TE)	17,76	0	82,24
Aztreonam (ATM)	12,15	1,87	85,98
İmipenem (IPM)	85,05	2,80	12,15
Kloramfenikol (C)	36,45	3,74	59,81
Sefoksitin (FOX)	26,17	1,87	71,96
Meropenem (MEM)	80,37	0	19,63
Nalidiksik asit (NA)	28,97	5,61	65,42
Sefepim (CPM)	80,37	2,80	16,82
Piperasilin (PI)	21,50	2,80	75,70

Sonuçlar incelendiğinde, 107 *E. coli* izolatının Tetrasikline %82,24 oranında dirençli olduğu belirlenmiştir, ancak elde ettiğimiz bu sonuçlar Abdelhamid and Abozahra (2017) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarıyla uyum göstermemiştir. Başka bir çalışmada *E. coli* bakterisinin tetrasikline direnci %46,3 olarak tespit edilmiştir (Hasan and Al-Harmoosh 2020). Meydana gelen bu farklılıkların bakterilerin akış pompalarına sahip olmaları, dış zar geçirgenliğini değiştirmeleri ve ilaçların emiliminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı zamanda, bu bakteriler seftazidime %79,44 direnç oranıyla yüksek direnç gösterirken, İran'da bu bakterinin bu antikora direnci %26 olarak tespit edilmiştir (Maleki *et al.* 2016).

Siprofloksasin antibiyotiklerine karşı direnç oranı %63,55 olarak belirlenmiştir ve elde edilen bu direncin bakterilerin biyofilm üretebilme yeteneğine sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ramírez-Castillo *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmalarda ise bu bakterinin Siprofloksasin karşı direnci %47,3 olarak tespit edilmiştir. Bu enfeksiyonlar için en iyi tedavi, *E. coli* bakterilerinin antibiyotik sınıfına direnç

geliştirmesinin sebebi olan idrar yolu enfeksiyonudur. Bu direnç büyük olasılıkla hedef bölgenin bir modifikasyonundan veya dış zarın geçirgenliğindeki bir değişikliğin yanı sıra bakterilerin genetik yapısını değiştiren ve bu antikora dirençle sonuçlanan mutasyonların ortaya çıkmasından kaynaklanır (Paltansing 2015, Zaman *et al.* 2017).

Bu bakteri izolatları %85,05 oranında İmipenem (IPM) antikoruna karşı yüksek hassasiyet gösterirken, bu antikora karşı direnç %12,15 olmuştur. Bu çalışmadan, bu bakterilerin bu antijene karşı direncinin azaldığı ve bu bakterinin bu antikora karşı direncinin başlangıcı olarak kabul edilebileceği anlaşılmaktadır. *Escherichia coli*'nin Sefepim (BGBM) antagonistine karşı duyarlılığı %80,37 olarak tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç Salman *et al.* (2013) tarafından tespit edilen %78 direnç ve İran'da Maleki *et al.* (2016) tarafından %26,1 oranındaki direnç oranıyla uyuşmamaktadır.

Nalidiksik asit (NA), bakteri izolatlarına karşı orta düzeyde direnç %65,42 gösterirken, *E. coli* izolatlarının yalnızca %28,97 bu antikora karşı duyarlılık göstermesi, bu izolatların gösterdiği direnç ile antikorun etkinliğini göstermektedir. Al-No'aemy, (2018) tarafından yapılan çalışmada *Escherichia coli*'nin Nalidiksik aside direncinin %88,6 olduğunu bulmuştur. Zaman *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada ise direnç %80 oranında belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar bakterinin izolatlarında mutasyon oluşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Amoksisilin/ klavulant antikoruna karşı %79,44 oranında duyarlı ve %19,62 oranında ise dirençli olarak belirlenmiştir. Bu durum, bir taraftan bu antikorun etkinliğini ve başlangıcını gösterirken diğer taraftan direncin ortaya çıkması, kendisine karakteristik direnç kazandıran plazmitlere sahip olduğunu gösterir ve bu durum, hastanelerde ve her zaman geniş bir antibiyotik yelpazesi alan kişilerde daha belirgin olabilir (Al-Obadi 2014). Elde ettiğimiz bu sonuç, Al-No'aemy (2018) tarafından yapılan çalışmada tespit edilen %52 direnç oranıyla uyumluluk göstermiştir.

Sefoksitinlere (FOX) karşı direnç %71,96 olurken, duyarlılık %26,17 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Salman *et al.* (2013) tarafından tespit edilen %7 direnç oranıyla

uyumluluk göstermezken, Karam *et al.* (2018) tarafından belirlenen %63,3 direnç oranıyla uyumludur.

Escherichia coli bakterisinin Aztreonam'a (ATM) karşı direnci ise %85,98 gibi yüksek bir düzeydedir. Bu sonuç Polse *et al.* (2016) tarafından bulunan %100 direnç oranıyla benzerlik göstermektedir. Elde edilen bu yüksek direnç oranının arkasındaki nedenin rastgele ve kontrolsüz antibiyotik kullanımı olduğu düşünülmektedir.

Bu izolatlara karşı Meropenem (MEM) antikorunun duyarlılığı %80,37, direnci ise %19,63 olarak bulunmuştur. Bu düşük direncin ve yüksek duyarlılığın nedeninin GSBL enzimine karşı stabilitesinden ve bu antibiyotiğin bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmedeki etkinliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

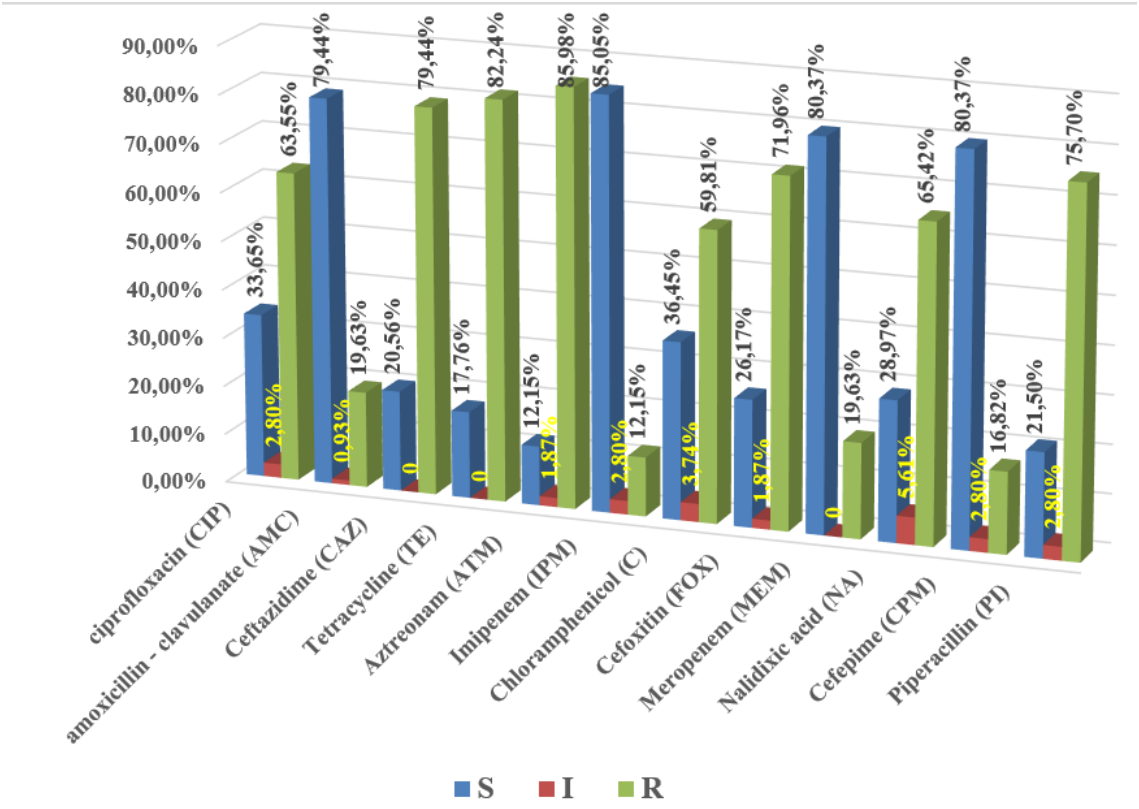
Ayrıca bu izolatların Piperasilin antikoruna (PI) karşı yüksek direnç gösterdiğini (%75,70) tespit edilmiştir. Bu da bakterilerin dirençlerini artıran direnç plazmitlerine sahip olmalarından kaynaklanabileceğini ve dolayısıyla bu direnç özelliğinin yüksek dirençli izolatlardan yüksek ve orta duyarlılığa sahip izolatlara aktarılması yoluyla yayılabileceğini göstermektedir (Adem 2019).

Elde edilen bilgiler doğrultusunda, *E. coli* bakterilerinin çeşitli antibiyotiklere karşı direncinin, bu bakterilerin sahip olduğu farklı direnç mekanizmalarının varlığından kaynaklanabileceğini ve bu nedenle bu mekanizmaların bize bu bakterilerin antibiyotiklere direnmesi için güç vereceğini ve bu mekanizmaların en önemlileri arasında olduğunu göstermektedir. Meydana gelen bu direnç oluşumu antimikrobiyal aktiviteleri ve dolayısıyla antibiyotik direncini etkileyen bir biyofilm üretimi olarak açıklanmaktadır (Karam *et al.* 2018).

Antibiyotik direncindeki farklılığın nedeni, farklı izolat kaynaklarının yanı sıra antibiyotik kullanımındaki farklılıktan da kaynaklanabilir, çünkü her ülkenin üretim açısından farklı antibiyotikleri bulunmaktadır ve yapılan çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırıldığında görülen farklılıklar çevre ve coğrafi yapıdan kaynaklanmaktadır.

Bölgelere ve alınan antibiyotik türlerinin farklılığına bağlı olarak, geniş spektrumlu antibiyotiklerin aşırı kullanımının yanı sıra özellikle üçüncü kuşak sefasporinler, antibiyotiklere karşı daha fazla direnç göstermektedir (Pandit *et al.* 2020).

Ayrıca *E. coli* bakterisinin bazı antibiyotiklerde bulunan B-laktamaz halkasının yıkımına yardımcı olan virülans faktörlerinden biri olan beta- laktamaz'a sahip olması ve böylece antibiyotik direncini ve *E. coli* bakterisinin virülansını artırması, halk sağlığına karşı (CDC 2019) ve antibiyotiğe dirençli *E. coli* bakterilerinin bu kolonizasyonu, antibiyotiğe dirençli izolatların bulaştığı toplumlar için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Bu bulaşma enfekte kaynaklı veya çevre ile yakından bağlantılı olabilir. Asıl bulaşma nedeni, insan dışkısı veya evcil hayvanlar olabilir (Rousham *et al.* 2018). Bu durum, bilinçsiz antibiyotik kullanımı nedeniyle gerçek bir sağlık tehdidi oluşturması açısından önemlidir (Laxminarayan *et al.* 2020) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 *E. coli*'nin antibiyotiklere karşı direnç ve duyarlılık yüzdeleri

4.3 *E. coli*'nin Çoklu Antibiyotik Direnci

Seçilen tüm (56) bakteri izolatında çoklu ilaç direnci (MDR), Pan-ilaç direnci (PDR) ve antibiyotiklere yaygın ilaç direnci (EDR) için %100'lük bir oran gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. Buna göre, bir izolat (E 27) incelenen tüm antibiyotiklere karşı direnç göstermiştir. Bunu sırasıyla E 17 izolatı 11 ve E 45 izolatı 9 antibiyotiğe karşı dirençle takip etmiştir. En düşük direnç ise E 16, E 23, E 25, E 28, E 37, E 46, E 48, E 50, E 52 oluşan toplam 9 izolatın sadece 1 antibiyotiğe karşı direnci oluşturmaktadır.

Çizelge 4.5 *E. coli* bakterisine karşı çoklu direnç

Dirençli antijen sayısı	İzolat sayısı	İzolatlar (56 izolatlar)
1	9	E 16, E 23, E 25, E 28, E 37, E 46, E 48, E 50, E 52
4	6	E 3, E 12, E 15, E 31, E 41, E 54
5	10	E 4, E 6, E 7, E 8, E 10, E 11, E 13, E 33, E 40, E 51
6	14	E 2, E 9, E 14, E 20, E 21, E 22, E 24, E 29, E 30, E 36, E 42, E 43, E 49, E 55
7	8	E 5, E 19, E 34, E 38, E 39, E 44, E 47, E 53
8	6	E 1, E 18, E 26, E 32, E 35, E 56
9	1	E 45
11	1	E 17
12	1	E 27

Sadece tek antibiyotiğe dirençli olan ve MDR olmayan sekiz izolat dışında, çalışmanın bulguları bakteriyel izolatların çoğunun MDR olduğunu gösterdi. Buna, hücreye yüksek düzeyde direnç sağlayan bir mutasyon veya plazmidin kazanılması neden olabilir, bu, geniş spektrumun yaygın ve uygunsuz kullanımına ek olarak, hücreye yüksek düzeyde direnç sağlayan plazmidin mutasyonu veya kazanılmasıyla da ortaya çıkabilir (Gawad *et al.* 2018).

Dünyadaki en önemli sağlık sorunlarından biri aşırı antibiyotik kullanımıdır (Polse *et al.* 2016). Çizelge 4.5'de gösterilen çoklu antibiyotik direnci gösteren bu izolatların, bu direnç için birden fazla mekanizmaya sahip olduklarının kanıtı olarak açıklanabilir.

Direncin ilk adımı olan antibiyotiğin hücreye girmesini engelleyerek ya da bunu yaparak ve diğer türlerde geniş spektrumlu B-laktamaz enzimlerinin üretimini engelleyerek hedef yeri değiştirebilir, böylece antibiyotik işini yapamaz. Diğer mekanizmalar ayrıca harici akış sistemlerine sahip olmasını da içerir. Tüm bu faktörler direnç nedeninde veya tek başına veya kombinasyon halinde tek tek birleştirilebilir, bunlar bakterilere yüksek antibiyotik direnci kazandırır.

4.4 Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmadan elde edilen *E. coli* izolatları, 96 delikli mikro kalibrasyon kapları yöntemi kullanılarak biyofilm oluşturma etkinliklerinde değişiklik göstermiştir. Bu nedenle bu şekilde biyofilm oluşturan izolatların yüzdesi, negatif kontrole kıyasla (%100) olurken, en yüksek biyofilm oluşturan izolat (0,633) değeri ile 4 sayısını taşıyan lokal izolattır (Çizelge 4.6). En az biyofilm üreten izolat ise yerel sayıyı 28'dir. Bu yöntemin, izolatların zarı oluşturma yeteneğinin belirlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir. Biyofilm, izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri hakkında nicel bilgi sağlayan optik soğurma ölçümlerine bağlıdır (Stepanović *et al.* 2000). İzolatlar, absorbans ölçümleri sonucuna göre biyofilm oluşumları; zayıf, orta, şiddetli, güçlü ve biyofilm oluşturmayan olarak 5 kategoriye ayrılmıştır. ELISA cihazı için, mikro titre plakalarındaki oluşumu yoluyla, biyofilm için güçlü bir şekilde (%50) üretkenken, bakteri sayısı (%55) ile orta veya ortalama sayıdadır (Şekil 4.3). Biyofilm oluşumuna ilişkin bu fenotipler hafif, zayıf, orta ve şiddetlidir ve 100 izolatın, 85'i orta, zayıf ve güçlü olmak üzere üç sınıf üzerinde kültürlenmiş biyofilm üreten izolatlardır.

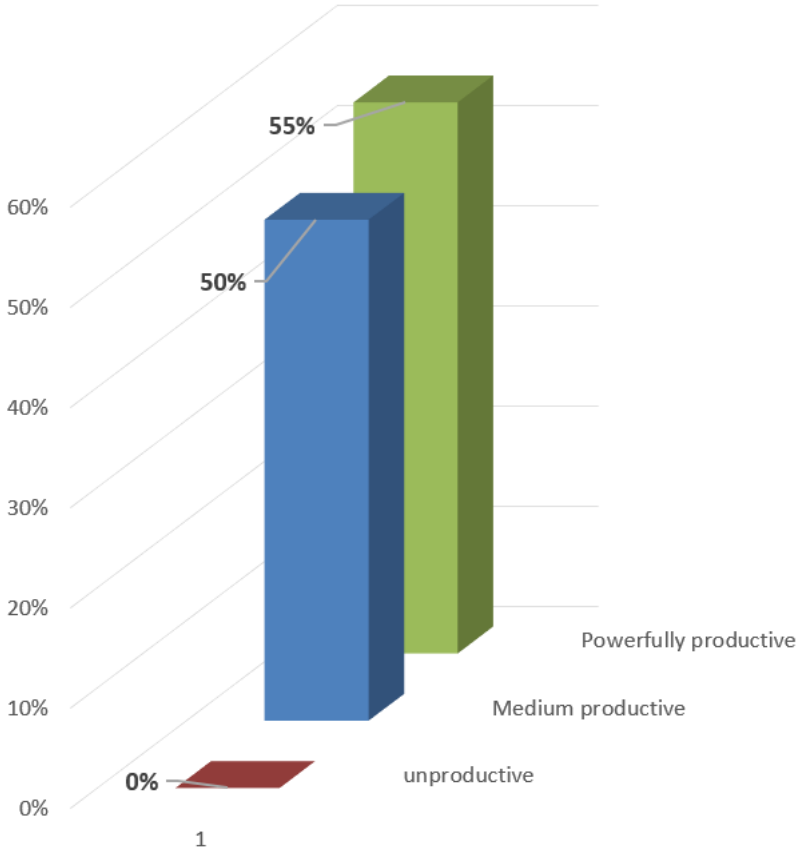
Çizelge 4.6 ELISA cihazında *Escherichia coli* bakterisinin biyofilm konsantrasyonunun ölçülmesi

Yoğunluk	Ort.	İzole Türü	İzolat	Yoğunluk	Ort.	İzole Türü	İzolat
M	0,462	Dışkı	E 29	S	0,618	İdrar	E 1
S	0,544	Dışkı	E 30	M	0,442	İdrar	E2
S	0,513	Dışkı	E 31	S	0,574	İdrar	E3
S	0,563	Dışkı	E 32	S	0,633	İdrar	E 4
M	0,489	Dışkı	E 33	M	0,479	İdrar	E 5
M	0,471	Dışkı	E 34	M	0,385	İdrar	E 6
S	0,546	Dışkı	E 35	S	0,579	İdrar	E 7
S	0,533	Dışkı	E 36	M	0,368	İdrar	E 8

Çizelge 4.6 ELISA cihazında *Escherichia coli* bakterisinin biyofilm konsantrasyonunun ölçülmesi (Devam)

Yoğunluk	Ort.	İzole Türü	İzolat	Yoğunluk	Ort.	İzole Türü	İzolat
M	0,445	Dışkı	E 37	M	0,450	İdrar	E 9
M	0,467	Dışkı	38	S	0,515	İdrar	E 10
M	0,373	Dışkı	E 39	M	0,485	İdrar	E 11
S	0,534	Dışkı	E 40	S	0,545	İdrar	E 12
M	0,433	Dışkı	41	M	0,483	İdrar	E 13
M	0,415	Yaralar	42	S	0,621	İdrar	E 14
M	0,464	Yaralar	E 43	M	0,437	İdrar	E 15
M	0,427	Yaralar	44	S	0,499	İdrar	E 16
S	0,556	Yaralar	45	S	0,623	İdrar	E 17
S	0,627	Yaralar	46	S	0,501	İdrar	E 18
M	0,453	Yaralar	47	S	0,624	İdrar	E 19
M	0,460	Yaralar	48	S	0,581	İdrar	E 20
S	0,539	Yaralar	E 49	S	0,566	İdrar	E 21
M	0,435	Yaralar	E 50	S	0,606	İdrar	E 22
M	0,471	Yaralar	51	S	0,599	İdrar	E 23
M	0,459	Yanıklar	52	S	0,600	İdrar	E 24
M	0,461	Yanıklar	E 53	S	0,580	İdrar	E 25
S	0,583	Yanıklar	54	M	0,478	Dışkı	E 26
S	0,571	Yanıklar	E 55	S	0,557	Dışkı	E 27
S	0,544	Yanıklar	E 56	M	0,351	Dışkı	E 28
	0,124	**Kontrol**					

Kesme değeri	<0,126
W (Zayıf)	0,126-249
M (Orta)	0,249-0,498
S (Güçlü)	>0,498



Şekil 4.3 *Escherichia coli* bakterisinin biyofilm oluşturma yeteneği

Zaman *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada incelenen izolatların %68'inin biyofilm ürettiği tespit edilmiştir. Bu bakteri, zayıf bağışıklık sistemi ve dolayısıyla antibiyotiklere direnci nedeniyle idrar yolu enfeksiyonlarının önemli bir nedeni olabilir (Karam *et al.* 2018). Tajbakhsh *et al.* (2016) biyofilm oluşturma yeteneğine sahip bakteri izolatlarının yüzdesinin %100 olduğunu, Poursina *et al.* (2018) ise biyofilm oluşturma yeteneğine sahip bakteri izolatlarının sırasıyla %78 ve %80 olarak tespit etmiştir. Biyofilmi oluşturan *E. coli* bakterilerinden iyileştikten sonra tekrar bu bakteri ile enfekte olma olasılıkları daha yüksektir çünkü *E. coli* bakterisinde biyofilm üretimi, bu bakterinin virülansında ona direnç kazandıran en önemli faktördür. Ayrıca sıvı ortam biyofilm oluşumunda önemli rol oynar, çünkü bu tür sıvı ortamlarda bulunduğunda ve uygun koşullar oluştuğunda biyofilmi üretmeye devam eder (Soto *et al.* 2014).

4.5 Antibiyotik Direnci ve Biyofilm Oluşumu Arasındaki İlişki

ELISA cihazı, yüksek biyofilm oluşturma kapasitesine sahip *E. coli* izolatlarını, biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki ilişkiyi belirlemek ve karşılaştırmak için kullanılmıştır.

E 27 sayılı izolat, bir ELISA cihazı spektral okumasında 0,557 konsantrasyonu ile %100 oranında 12 antibiyotiğe karşı biyofilm oluşturmaktadır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 *E. coli* bakterilerinin biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki

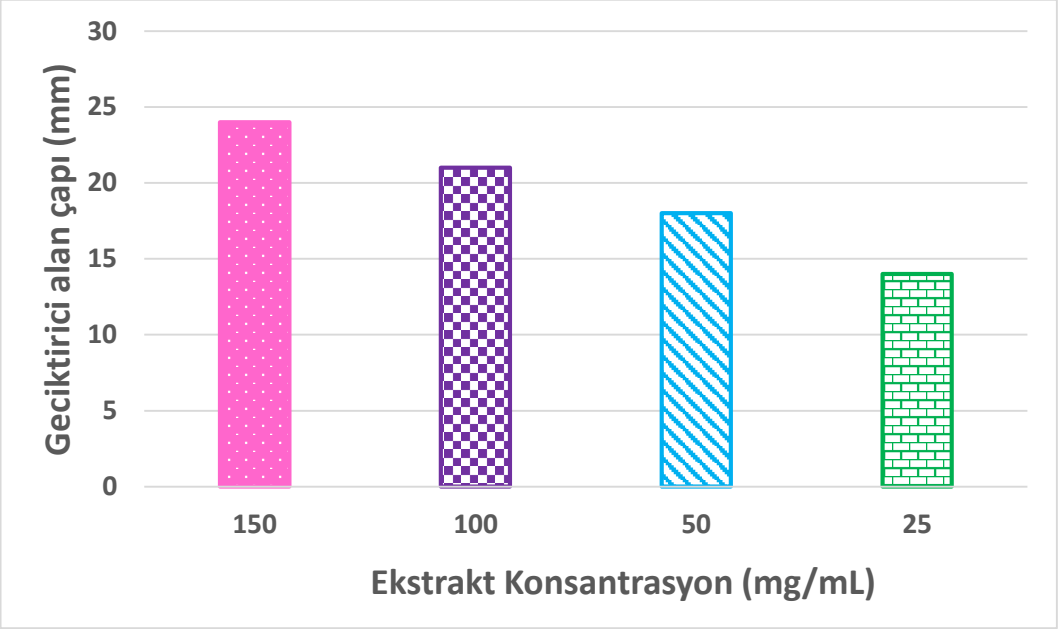
İzolat	OD okuma	Dirençli antijen sayısı	Yüzde (%)	İzolat	OD okuma	Dirençli antijen sayısı	Yüzde (%)
E 1	0,618	8	%66,66	E 29	0,462	6	%50
E 2	0,442	6	%50	E 30	0,544	6	%50
E 3	0,574	4	%33,33	E 31	0,513	4	%33,33
E 4	0,633	5	%41,66	E 32	0,563	8	%66,66
E 5	0,479	7	%53,33	E 33	0,489	5	%41,66
E 6	0,385	5	%41,66	E 34	0,471	7	%53,33
E 7	0,579	5	%41,66	E 35	0,546	8	%66,66
E 8	0,368	5	%41,66	E 36	0,533	6	%50
E 9	0,450	6	%50	E 37	0,445	1	%8,33
E 10	0,515	5	%41,66	E 38	0,467	7	%53,33
E 11	0,485	5	%41,66	E 39	0,373	7	%53,33
E 12	0,545	4	%33,33	E 40	0,534	5	%41,66
E 13	0,483	5	%41,66	E 41	0,433	4	%33,33
E 14	0,621	6	%50	E 42	0,415	6	%50
E 15	0,437	4	%33,33	E 43	0,464	6	%50
E 16	0,499	1	%8,33	E 44	0,427	7	%53,33
E 17	0,623	11	%91,66	E 45	0,556	9	%75
E 18	0,501	8	%66,66	E 46	0,627	1	%8,33
E 19	0,624	7	%53,33	E 47	0,453	7	%53,33
E 20	0,581	6	%50	E 48	0,460	1	%8,33
E 21	0,566	6	%50	E 49	0,539	6	%50
E 22	0,606	6	%50	E 50	0,435	6	%50
E 23	0,599	1	%8,33	E 51	0,471	5	%41,66
E 24	0,600	6	%50	E 52	0,459	1	%8,33
E 25	0,580	1	%8,33	E 53	0,461	7	%53,33
E 26	0,478	8	%66,66	E 54	0,583	4	%33,33
E 27	0,557	12	100%	E 55	0,571	6	%50
E 28	0,351	1	%8,33	E 56	0,544	8	%66,66

4.6 Biberiye Ekstraktının Biyofilm Oluşturan *E. coli* İzolatlarına Karşı İnhibe Edici Etkinliğinin Test Edilmesi

Biberiye bitkisinin doğal ekstraktının antagonistik aktivitesi, difüzyon yöntemi kullanılarak Mueller-Hinton ortamında yetiştirilen biyofilm oluşturan *E. coli* bakteri izolatları üzerinde test edildi.

4.6.1 Biberiye yaprağı alkollü ekstraktının *E. coli* izolatları üzerine etkisi

Biberiye özü, *E. coli* bakterilerinin büyümesini önlemede yüksek etkinlik göstermiştir. Alkollü özütün en yüksek engelleme çapı 150 mg/mL'lik bir konsantrasyonda bakteri yönünde 21 mm, en düşük engelleme çapı ise 25 mg/mL konsantrasyonda 9 mm olmuştur. *E. coli* bakterileri için, seyreltilmiş DMSO çözeltisi ise Şekil 4.4'te gösterildiği gibi bakterilere karşı herhangi bir etki göstermemiştir. İstatistiksel analiz, her iki bakteri türü için alkollü ekstrakt konsantrasyonlarına göre inhibisyon bölgelerinin çapları arasında önemli düzeyde farklılıklar olduğunu göstermiştir ($P \leq 0,05$).



Şekil 4.4 Biberiye yapraklarının alkollü ekstraktının *E. coli* bakteri izolatı üzerindeki etkisi

Çalışmanın sonuçları, biberiyenin alkollü ekstraktının bakteriler üzerinde bariz bir inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç Stojanović-Radić *et al.* (2010)'nın çalışmasıyla aynı fikirdedir, çünkü biberiyenin bakteri hücre zarını etkileyen gram lekesi için bakterileri olumlu ve olumsuz etkilediği, bazik özütün ise bakterileri olumlu ve olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Biberiye mitoz sürecini inhibe ederek bakteri hücresinin mitotik fazını etkiler. Shayma'a *et al.* (2011) tarafından yürütülen bir çalışmada rosmarinik asit ve Biberiyede bulunan karnosik asit mikrobiyal olarak en etkili bileşikler arasındadır. En etkili ekstraksiyonun alkollü ekstrakt olduğu belirlenmiş olup bu durum bu Abdul Latif (2009)'un çalışmalarıyla uyumludur. Çalışmamızın sonuçları Klančnik *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu olarak, biberiye ekstraktının Gram-pozitif ve negatif bakterilere, özellikle S. aureus bakterilerine karşı etkinliğini ve ekstraktın bakteriyel aktiviteyi inhibe etme kabiliyetini göstermiştir. Ekstraktın etkinliği Rosmarik asit ve büyük miktarlarda Mangena ve Monoterpen, α- pinen ve β- pinen nedeniyle oluşmaktadır (Mangena and Muyima 1999).

4.7 Biberiye ve Antibiyotik Ömrü için Minimum İnhibitör Konsantrasyonun (MIC) Belirlenmesi

Üç antibiyotiğin her biri arasındaki sinerjiye ek olarak biberiye, Siprofloksasin ve Seftazidimin her biri için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) belirlendi. Sonuçlar, biberiyeli bakterilerin minimum inhibe edici konsantrasyonunun herhangi bir antibiyotik tedavisi olmadan 200 µg olduğunu, minimum inhibe edici konsantrasyonun ise antibiyotik Siprofloksasin ile tedavi edildiğinde 16µg, Seftazidim antibiyotik ile tedavi edildiğinde 256 µg olduğunu gösterdi. Seftazidim antagonisti ile Biberiye ile sinerji oluşturduğunda minimum inhibitör konsantrasyonu 64 µg ve biberiye siprofloksasin antagonisti ile sinerji oluşturduğunda ise minimum inhibitör konsantrasyon 4 µg minimum inhibitör konsantrasyon olarak tespit edilmiştir.

Minimum inhibitör konsantrasyonun (MİK) belirlenmesi, *Escherichia coli* bakterileri için görünür bakteriyel büyümeyi engellemek için en düşük antibiyotik konsantrasyonunu

belirlemek açısından önemlidir. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK), 37°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra görünür (Çizelge 4.8) (CLSI 2021).

Çizelge 4.8 Biberiye ve antibiyotikler için minimum inhibitör konsantrasyonun (MİK)

MİK (µg/mL)			
Sıra	**Antibiyotik çeşidi**	***E. coli* 1**	***E. coli* 2**
1	Siprofloksasin	16	5
2	Seftazidim	256	128
3	Biberiye	200	200
4	Cipro+Rm	4	2
5	Seftazidim+Rm	64	32
6	Cipro+cefta+Rm	32	16

4.8 Biberiye Bitkisinin Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Sonuçlar, incelenen tüm bakteri izolatlarının, en iyi ve en doğru yöntem olan mikro kalibrasyon kapları yöntemini kullanarak değişen oranlarda bir biyofilm üretme kabiliyetine sahip olduğunu göstermiştir. Bu sayede en fazla sayıda biyofilm oluşturan izolat elde edilmiştir. Bu test bir 630 nm dalga boyunda absorpsiyon için sayısal bir değer veren, biyofilm oluşumunu tespit etmek için kantitatif analiz testi ile kalibrasyon kaplarının yüzeylerine yapışması sonucunda oluşan biyofilm miktarını belirlemek için ELISA cihazının kullanılmasıyla gerçekleşir (Metzler 2016). Sonuçlar biberiyenin biyofilmi inhibe etmede yüksek bir etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir. Biberiye kullanan Escherichia coli bakterilerinin biyofilm oluşumunun ortalama inhibisyon yüzdesi, E 37 sayısını taşıyan izolat için 91,77'ye ulaşırken, E 41 sayısını taşıyan bakteri izolatı için tedaviden sonra biyofilm oluşumunu inhibe etmenin en az etkisi %72,22 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Sonuçlar, bakteriyel izolatlar için biyofilm oluşumunun inhibe edici etkisinin değişimini göstermektedir, bunun nedeni, genetik yapıdaki farktan kaynaklanan fizyolojik duruma ek olarak izolasyonun yeri ve fenotipik değişikliklerin meydana gelebileceği hassas çevresel koşullardan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle tüm bunlar enzimatik aktivitenin etkinliğine yansır ve tüm bunlar, antioksidan etkide reaktif oksijenin reaksiyonuna cevap verme adaptasyonundan meydana gelir. Biyofilmlerin bileşenleri çevreye uyum sağlayabilir (Sies 2017), böylece bu bakterilerin fizyolojik adaptasyon stratejilerinin heterojen ortamlarda hayatta kalmasına izin verir

(Soldatova *et al.* 2017). Elde ettiğimiz sonuçlar, biberiyenin biyofilm ve ortadan kaldırılması için inhibe edici bir faktör olarak kabul edildiğini bulan Aryal and Muriana (2019)'un çalışmasında ortaya çıkan sonuçlar ile orta derecede uyumluluk göstermiştir.

Çizelge 4.9 Biberiye kullanılarak *Escherichia coli* bakterilerinin biyofilm oluşumunun inhibisyon yüzdeleri

İzolat	Tedavi olmadan	Biberiye özü ile tedavi	Biyofilm oluşumunun engellenmesi %	İzolat	Tedavi olmadan	Biberiye özü ile tedavi	Biyofilm oluşumunun engellenmesi %
E 1	0,612	0,126	82,92683	E 29	0,498	0,105	82,58706
E 2	0,523	0,068	88,49408	E 30	0,367	0,109	77,10084
E 3	0,412	0,146	73,83513	E 31	0,465	0,088	84,0868
E 4	0,388	0,123	75,92955	E 32	0,488	0,055	89,87109
E 5	0,454	0,084	84,38662	E 33	0,612	0,089	87,30385
E 6	0,608	0,097	86,24113	E 34	0,569	0,051	91,77419
E 7	0,421	0,140	75,04456	E 35	0,455	0,064	87,66859
E 8	0,488	0,069	87,61221	E 36	0,517	0,119	81,28931
E 9	0,511	0,093	84,60265	E 37	0,413	0,037	91,77778
E 10	0,399	0,109	78,54331	E 38	0,324	0,098	76,77725
E 11	0,456	0,101	81,86715	E 39	0,466	0,112	80,62284
E 12	0,534	0,107	83,30733	E 40	0,489	0,106	82,18487
E 13	0,425	0,091	82,36434	E 41	0,325	0,125	72,22222
E 14	0,457	0,120	79,20277	E 42	0,488	0,101	82,85229
E 15	0,476	0,127	78,93864	E 43	0,564	0,071	88,8189
E 16	0,478	0,105	81,98971	E 44	0,537	0,112	82,74268
E 17	0,398	0,129	75,52182	E 45	0,568	0,107	84,14815
E 18	0,489	0,095	83,73288	E 46	0,562	0,082	87,26708
E 19	0,498	0,147	77,2093	E 47	0,386	0,107	78,29615
E 20	0,642	0,129	83,26848	E 48	0,489	0,053	90,2214
E 21	0,559	0,111	83,43284	E 49	0,546	0,113	82,85281
E 22	0,433	0,081	84,24125	E 50	0,588	0,103	85,09407
E 23	0,489	0,098	83,30494	E 51	0,398	0,129	75,52182
E 24	0,317	0,109	74,41315	E 52	0,489	0,095	83,73288
E 25	0,613	0,097	86,33803	E 53	0,564	0,071	88,8189
E 26	0,587	0,121	82,9096	E 54	0,537	0,112	82,74268
E 27	0,546	0,135	80,17	E 55	0,568	0,107	84,14815
E 28	0,523	0,079	86,87708	E 56	0,642	0,129	83,26848

4.9 DNA Ekstraksiyonu

DNA, Geniod Firması tarafından üretilen ekstraksiyon kiti kullanılarak izolatlarından, toplam 107 *E. coli* izolatının 56'sından ekstrakte edilmiştir. Fenotipik özellikler,

antibiyotik direnci ve biyofilm oluşumu açısından, ekstrakte edilen DNA agaroz jel üzerine aktarıldıktan seçilen tüm izolatlarda bantların varlığını açıkça görülmüştür.

4.10 *E. coli* İzolatlarından Ekstrakte Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Saflığının Belirlenmesi

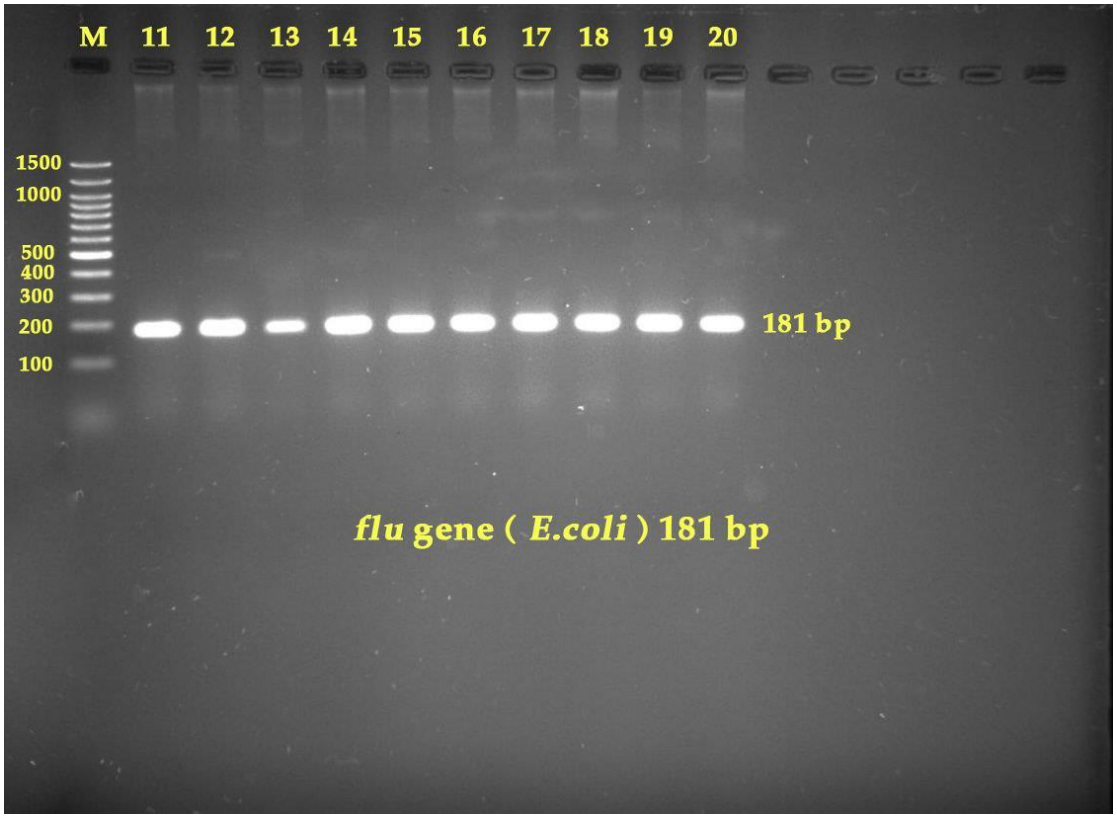
Nanodrop cihazın merceğine 2 mikrolitre yerleştirilerek kullanılarak DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı ölçüldü (Çizelge 4.10). Çizelge 4.10 incelendiğinde DNA'nın saflığı 18 ile 53 ng/mikrolitre konsantrasyonda 1,85 ile 1,98 arasında değişmektedir. Elde edilen bu sonuçlar (Al-Saedi 2013, Al-Surmiri 2013, Hassan *et al.* 2020) tarafından yapılan çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Çizelge 4.10 *E. coli* izolatlarının DNA konsantrasyonu ve saflığı

İzolat	Konsantrasyon µg/µL	Saflık	İzolat	Konsantrasyon µg/µL	Saflık
E 1	35	1,85	E 29	29	2,2
E 2	22	1,92	E 30	25	1,95
E 3	51	1,89	E 31	25	2,01
E 4	33	1,98	E 32	18	1,87
E 5	41	1,9	E 33	27	1,95
E 6	25	2,01	E 34	30	2,1
E 7	18	1,87	E 35	24	2
E 8	27	1,95	E 36	35	1,85
E 9	30	2,1	E 37	22	1,92
E 10	24	2	E 38	51	1,89
E 11	36	1,86	E 39	34	1,98
E 12	21	1,94	E 40	41	1,9
E 13	53	1,87	E 41	51	1,89
E 14	37	1,98	E 42	33	1,98
E 15	39	1,8	E 43	40	1,9
E 16	27	2,03	E 44	25	2,01
E 17	20	1,86	E 45	19	1,87
E 18	26	1,95	E 46	35	1,85
E 19	31	2,3	E 47	22	1,94
E 20	26	2,2	E 48	30	2,3
E 21	38	1,83	E 49	25	2
E 22	23	1,89	E 50	28	1,96
E 23	48	1,92	E 51	38	1,83
E 24	30	1,95	E 52	30	2,1
E 25	44	1,8	E 53	48	1,92
E 26	27	2	E 54	30	1,95
E 27	18	1,97	E 55	44	1,8
E 28	25	1,85	E 56	22	1,75

4.11 FLU Geninin Saptanması

Farklı patolojik koşullardan izole edilen *E. coli* bakterileri için bu genin varlığının araştırılması için özel bir plak kullanıldı ve PCR reaksiyonu gerçekleştirildikten sonra bu reaksiyonun ürünü agaroz jel üzerinde %2 konsantrasyonda DNA örneklerine aktarıldı. Daha sonra 100 bp büyüklüğünde ultraviyole ışık ile incelendi ve reaksiyon sonuçları, tüm bakteri izolatlarında influenza geninin varlığını gösterdi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 E 11-E 20 numaralı izolatların %2 agaroz jel üzerinde FLU geninin PCR elektroforezi

Yukarıda belirtilen bulgular sayesinde, *E. coli* bakterisinin izolatlarında genlerin bulunma özelliğinin, bu bakterinin çoğu suşunda baskın bir özellik olduğunu göstermektedir, yani bu bakteri, üzerinde çalışılan altı genin kodunu taşıyan genlere sahiptir. Bu özellik, çoğunlukla antibiyotiklere veya diğer çevresel faktörlere karşı dirence sahip olan genler için olabilir.

4.12 *E. coli* Bakterisinin RNA Ekstraksiyonu

E. coli'den RNA'nın ekstrakte edilmesi nanadrop cihazı ile gerçekleştirlmiştir. Ekstraksiyon bakterilerin biberiye ve antibiyotiklerle ayrı ayrı tedavi edilmesinden önce ve sonrasındaki iki izolatta gerçekleştirlmiştir. 125 ng/µL'lik konsantrasyonla tedaviden öncesi ve sonrası olan izolatlarda yüksek konsantrasyon ve saflıkta RNA elde edilmiştir, saflık dereceside 2,05 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 *Escherichia coli* izolatlarının RNA konsantrasyonunun ve saflığının ölçümü

Sıra	Antibiyotik çeşidi	Saflık	Konsantrasyon ng/µL
1	Siprofloksasin	2,05	125
		1,99	131
2	Seftazidim	2,1	133
		2,07	140
3	Biberiye	1,98	154
		2,1	142
4	Cipro+RM	2,09	110
		2,0	115
5	Cefta+RM	2,12	95,3
		1,97	102
6	Cipro+Cefta+RM	2,06	88,7
		2,05	111
7	Kontrol	2,11	144
		2,17	137

4.13 Biberiye ve Antibiyotik Tedavisi Sonrası ve Öncesi Gen Ekspresyon Miktarının qRT PCR Yöntemi Kullanılarak Ölçülmesi

Eşik limiti (CT), geni ifade eden temel prensip olduğu düşünüldüğünden, araştırılan *E. coli* bakterisi FLU genlerinin gen ekspresyonunu polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılarak ölçmek için kullanıldı. RNA'nın primerler kullanılarak tek bir tüpte cDNA'ya dönüştürüldüğü ve daha sonra gen ifadesi için kopyalandığı tek adımlı bir yöntem kullanılarak ölçülen gen ifadesi miktarını ifade eden eğri ile temsil edilen eşik sınırının ve floresansın maksimum seviyeye ulaştığı döngüdür. Muamele edilen materyallerin sonuçları ile bakterinin hizmet genlerinin gen ifadesinin sonuçları karşılaştırıldıktan sonra, gen ifadesinin değeri Levank denklemi kullanılarak çıkarılarak sonuçlar elde edilmiştir.

4.13.1 FLU geninin gen ekspresyonunun ölçümü

Kontrol ile karşılaştırıldığında, biberiye ve antibiyotik siprofloksasin ile tedavi edildiğinde gen ifadesinde bir artış görülürken, antibiyotik Ceftazidim için gen ifadesinde azalma görülmüştür. Kontrol ile karşılaştırıldığında ve biberiye ile siprofloksasin ve seftazidim arasındaki sinerji kullanıldığında, biberiyenin seftazidime gen ekspresyonu sonucu (0,06), biberiye ve siprofloksasin ile gen ekspresyonu (0,7)'dir. Biberiye ve anti-Ceftazidim ayrı ayrı kullanıldığında sonuçlar daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Minimum altında bir inhibitör konsantrasyonda (SubMIC) antibiyotiklerle karıştırıldığında FLU geninin gen ekspresyonu miktarını azaltma eğilimi göstermiştir.

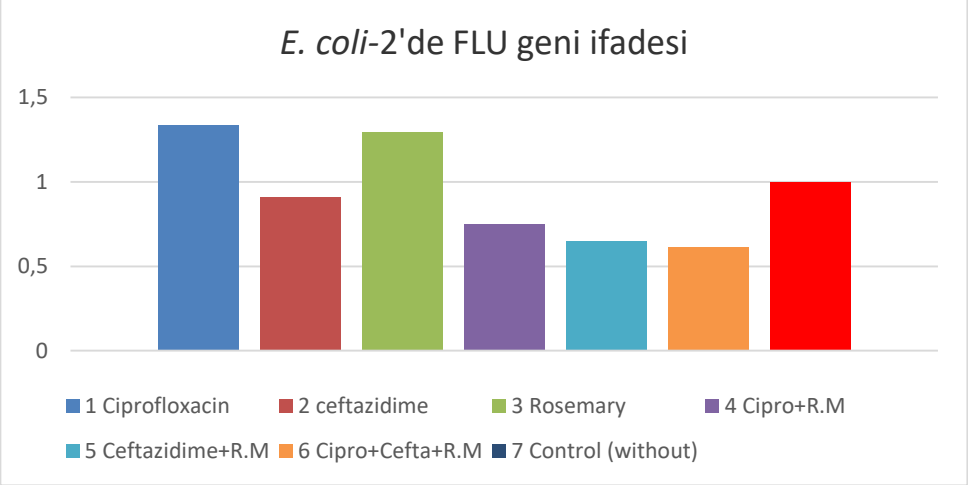
Otoagregatif bir protein olan Ag43'ün, biyofilm içinde planktonik büyüme sırasında herhangi bir noktada olduğundan çok daha yüksek bir seviyede ifade edilir. Bu durum üzerinde özellikle *E. coli*'nin biyofilm gelişiminde özel bir rolü vardır. Biyofilmimizi sabit bir faz kültürüyle karşılaştırdığımızda, anahtar dış zar proteinleri OmpC, OmpF ve OmpT'nin tümü, ekspresyonu değiştirilmiş diğer hücre yapısı genleri arasında önemli ölçüde eksprese edildi. Lipid A üretiminde yer alan bir protein olan IpxC'de ve karbon eksikliğine yanıt olarak üretilen bir dış zar lipoproteini olan SLP'de de orantılı bir artış görülmüştür. Yükseltilmiş SLP (Otto *et al.* 2001) ve OmpC (Prigent-Combaret *et al.* 1999) ekspresyonu öncelikle *E. coli*'nin abiyotik yüzeylere bağlanmasıyla bağlantılıdır.

Hücre-hücre agregasyonunu düzenleyen proteinlerin üretimi, UPEC'in biyofilmlerin gelişimini teşvik etmesinin bir yoludur (Ulett *et al.* 2007). Ag43'ü ifade eden polisakkarit kaplı hücre kümelerine sahip kapsül benzeri yapılar olan biyofilmlerin oluşturulmasının idrar kesesinde uzun süreli kalıcılıkla bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Eto *et al.* 2006). Ag43'ün yolcu alanındaki dizi farklılığının, gelişmiş biyofilm oluşturma yeteneklerine sahip birkaç patojeniteye uyarlanmış varyantın yaratılmasına yol açtığı düşünülmektedir. Sonuçlarımız, Ag43'ün UPEC hastalığının patogenezine katıldığını ve Ag43'ün patojenite için değiştirilmiş ve virülansla ilgili benzersiz rollere sahip varyasyonları olduğunu göstermektedir (Ulett *et al.* 2007).

Elde ettiğimiz sonuçlar, biberiye kullanmanın *E. coli*'nin seftazidime duyarlılığını önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Bunlara ek olarak biberiye, antibiyotiğin inhibe edici bölgesini büyük ölçüde genişletmiştir. Ayrıca biberiye, siprofloksasin inhibisyon bölgesi üzerindeki etkilerini büyük ölçüde artırdı. Raporlara göre, seftazidim veya siprofloksasin bakteri hücre duvarlarının sentezini inhibe eder (Pimchan *et al.* 2017, Kadry 2003). Bu nedenle, penisilin bağlayıcı proteinler (PBP'ler) Seftazidim ve siprofloksasin, sırasıyla peptidoglikan bileşenlerini ikame ederek ve transpeptidazlara bağlanarak bakteri hücre duvarlarının oluşumunu baskılar (Pimchan *et al.* 2017, Kadry 2003). Bu sonuçlara dayanarak, biberiyenin seftazidim ve siprofloksasinin *E. coli* büyümesi üzerindeki etkilerini arttırdığı görülmektedir (Çizelge 4.12) (Şekil 4.6).

Çizelge 4.12 FLU geninin gen ekspresyonunun qRT-PCR tekniği kullanılarak kantitatif ölçümü

Gen ifadesi 2 $^{-\Delta\Delta CT}$		
Sıra	**Antibiyotik türü**	***E. coli*-2 (FLU)**
1	Siprofloksasin	**1,337927555**
2	Seftazidim	**0,907519155**
3	Biberiye	**1,292352831**
4	Cipro+RM	**0,747424624**
5	Seftazidim+RM	**0,647671126**
6	Cipro+Cefta+RM	**0,611320139**
7	Kontrol	**1**



Şekil 4.6 FLU geninin gen ekspresyonunun qRT-PCR tekniği kullanılarak kantitatif ölçümü

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Toplanan idrar örneklerinde *E. coli* bakterisi daha yaygın olarak belirlenmiştir, bunu dışkı örnekleri takip etmiştir. Farklı örneklerden izole edilen bakteriler, biyofilm oluşturmaları nedeniyle antibiyotiklere direnç ile karakterize edilmiştir. Biberiye yapraklarının alkollü özü, biyofilm oluşumunu sınırlama etkisinin yanı sıra *E. coli* bakterisini inhibe etme ve öldürmede önemli bir role sahiptir. İncelenen tüm örneklerde yüksek gen ekspresyonu nedeniyle FLU geninin antibiyotik direncinde önemli bir rolü vardır. Biberiye yapraklarının alkollü özü, sinerjistik etki yoluyla antibiyotik direncini azaltmada etkili bir rol göstermiş, bu da FLU direnç geninin gen ekspresyonunun azaltılmasına olumsuz olarak yansımıştır.

Elde edilen tüm bu bilgiler doğrultusunda, geniş yayılımı, antibiyotiklere karşı yüksek direnci ve enfeksiyon bölgelerinin çeşitliliği nedeniyle *E. coli* bakterisinin varlığını tespit etmek için periyodik muayeneler yapmak, biberiye bitki özütünün diğer patolojik örneklerden izole edilen farklı direnç genleri üzerindeki sinerjistik rolünün incelenmesi, biberiye ekstraktının aerobik ve anaerobik gibi farklı direnç genlerine sahip diğer bakteri türleri üzerindeki etkisinin incelenmesi, gelecekte bir antibiyotik olarak benimseyebilmek için biberiye özütünün sitotoksisitesini ve genetiğinin incelenmesi, farklı patojenik bakterilere karşı en yüksek inhibisyon oranına ulaşmak için biberiye ekstraktının hazırlanmasında diğer solventlerin kullanımına odaklanması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abbasi, H. and Ranjbar, R. 2018. The prevalence of quinolone resistance genes of A, B, S in Escherichia coli strains isolated from three major hospitals in Tehran, Iran. Central European Journal of Urology, 71(1): 129.

Abd Majeed, M. 2011. Effect of oily and aqueous extract of rosemary Rosmarinus officinalis as a preservative in minced meat. Iraqi Veterinary Medical Journal, 35(2).

Abdelhamid, S. M. and Abozahra, R. R. 2017. Expression of the Fluoroquinolones efflux pump genes A and A in urinary isolates. Polish Journal of Microbiology, 66(1): 25-30.

Abdul Latif, M. 2009. A study of the effect of an alcoholic extract of rosemary leaves, Rosemarinus officinalis, on the growth of the fungus Aspergillus flavus and the secretion of aflatoxin B1. Damascus University Journal of Agricultural Sciences, 25(1): 121-134.

Adamus-Białek, W., Kubiak, A. and Czerwonka, G. 2015. Analysis of uropathogenic Escherichia coli biofilm formation under different growth conditions. Acta Biochimica Polonica, 62(4): 765–71.

Adem, H. 2019. Isolation, DNase-cross-coagulase test and antimicrobial resistance test on Staphylococcus along beef abattoir line in Addis Ababa Ethiopia. Ethiopian Veterinary Journal, 23(1): 90-110.

Akbari, A., Razmjoo, M. and Foroughi, A. 2021. Isolation and Identification of Escherichia albertii in Broiler Chickens From Kermanshah. International Journal of Enteric Pathogens, 9(1): 21-25.

Al Masoud, N., Muhamadali, H., Chisanga, M., AlRabiah, H., Lima, C. A. and Goodacre, R. 2021. Discrimination of bacteria using whole organism fingerprinting: the utility of modern physicochemical techniques for bacterial typing. Analyst, 146(3): 770-788.

Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A. and McArthur, A. G. 2020. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. Nucleic Acids Research, 48(1): 517-525.

Alnahdi, H. S. 2012. Effect of Rosmarinus officinalis extract on some cardiac enzymes of streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Health Sciences, 2(4): 33-37.

Al-No'aemy, H. A. D. 2018. Molecular diversity of Escherichia coli isolated from different local sources and its relationship to antibiotic resistance. MSc. Thesis, Diyala University, 97 page, Diyala.

Al-Obadi, T. H. Z. 2014. Molecular identification of Klebsiella pneumoniae using capsule genes. MSc. Thesis, Al-Nahrain University, 79 page, Baghdad.

Al-Rubaiee, Z. S. 2000. The effect of aqueous and alcoholic extracts of Citrullus colocynthis and Solanum nigrum on the growth of some bacteria isolated from infections. Current Zoology, 67(3): 263-270.

Al-Saedi, M. K. A. 2013. Molecular investigation of the rmp gene of Neisseria gonorrhoeae isolated locally from adult patients. MSc. Thesis, University of Baghdad, 112 page, Baghdad.

Al-Surmiri, T. A. K. 2013. Detection of ST and LT toxins genes of Escherichia coli isolated from urine and stool samples using the multiplex PCR technique. MSc. Thesis, University of Baghdad, 82 page, Baghdad.

Al-Taee, M. J. M., Turke Al-Ethawi, A. M. and Jabbar Al-Gafari, R. N. 2018. The effect of gold nanoparticles in growth and biofilm formation of methecillin resistant Staphylococcus aureus MRSA isolated from various clinical cases. The Scientific Journal Plant Archives, 18: 601-608.

Altinier, G., Sosa, S., Aquino, R. P., Mencherini, T., Loggia, R. D. and Tubaro, A. 2007. Characterization of topical antiinflammatory compounds in Rosmarinus officinalis L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(5): 1718-1723.

Ananias, M. and Yano, T. 2008. Serogroups and virulence genotypes of Escherichia coli isolated from patients with sepsis. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 41: 877-883.

Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J. and Hultgren, S. J. 2003. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. Science, 301(5629): 105-107.

Aryal, M. and Muriana, P. M. 2019. Efficacy of commercial sanitizers used in food processing facilities for inactivation of Listeria monocytogenes, E. coli O157: H7, and Salmonella biofilms. Foods, 8(12): 639.

Auda, I. G., Al-Kakei, S. N. H. and Hamed, S. L. 2013. Occurrence of CTX-MI type β-lactamases gene in certain gram negative bacteria. Iraqi Postgraduate Medical Journal, 12(2).

Baron, E. J. and Finegold, S. M. 1990. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. CV Mosby Company, 181(4).

Bekal, S., Brousseau, R., Masson, L., Prefontaine, G., Fairbrother, J. and Harel, J. 2003. Rapid identification of Escherichia coli pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. Journal of Clinical Microbiology, 41(5): 2113-2125.

Bélanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E. and Dozois, C. M. 2011. Escherichia coli from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic E. coli. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 62(1): 1-10.

Beloin, C., Roux, A. and Ghigo, J. M. 2008. Escherichia coli biofilms. Bacterial biofilms, 249-289.

Ben-Ami, R., Rodríguez-Baño, J., Arslan, H., Pitout, J. D., Quentin, C., Calbo, E. S. and Carmeli, Y. 2009. A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. Clinical Infectious Diseases, 49(5): 682-690.

Bertelloni, F., Cilia, G., Bogi, S., Ebani, V. V., Turini, L., Nuvoloni, R. and Turchi, B. 2020. Pathotypes and antimicrobial susceptibility of Escherichia coli isolated from wild boar (Sus scrofa) in Tuscany. Animals, 10(4): 744.

Beutin, L., Marchés, O., Bettelheim, K. A., Gleier, K., Zimmermann, S., Schmidt, H. and Oswald, E. 2003. HEp-2 cell adherence, actin aggregation, and intimin types of attaching and effacing Escherichia coli strains isolated from healthy infants in Germany and Australia. Infection and Immunity, 71(7): 3995-4002.

Bilcu, M., Grumezescu, A. M., Oprea, A. E., Popescu, R. C., Mogoșanu, G. D., Hristu, R. and Chifiriuc, M. C. 2014. Efficiency of vanilla, patchouli and ylang ylang essential oils stabilized by iron oxide@ C14 nanostructures against bacterial adherence and biofilms formed by Staphylococcus aureus and Klebsiella pneumoniae clinical strains. Molecules, 19(11): 17943-17956.

Biswas, I. and Rather, P. N. 2019. Acinetobacter baumannii. Springer, 1-15.

Blahna, M. T., Zalewski, C. A., Reuer, J., Kahlmeter, G., Foxman, B. and Marrs, C. F. 2006. The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim–sulfamethoxazole resistance among uropathogenic Escherichia coli in Europe and Canada. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57(4): 666-672.

Blattner, F. R., Plunkett III, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M. and Shao, Y. 1997. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. Science, 277(5331): 1453-1462.

Bok, E., Mazurek, J., Myc, A., Stosik, M., Wojciech, M. and Baldy-Chudzik, K. 2018. Comparison of commensal escherichia coli isolates from adults and young children in Lubuskie province, Poland: Virulence potential, phylogeny and antimicrobial resistance. International Journal of Environmental Research and Public Health, 15(4): 617.

Bown, D. 2002. The royal horticultural society new Encyclopedia of herbs & their uses. Royal Horticultural Society, 448 page, London.

Breurec, S., Guessennd, N., Timinouni, M., Le, T. T. H., Cao, V., Ngandjio, A., ... & Brisse, S. 2013. Klebsiella pneumoniae resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. Clinical Microbiology and Infection, 19(4): 349-355.

Brown, A. E. and Smith, H. R. 2005. Microbiological Applications. McGraw-Hill Companies, 35: 217-224.

Casadevall, A. and Pirofski, L. A. 2009. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework. Journal of Water and Health, 7(1): S-18.

Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S. and Hopkins, S. 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. The Lancet Infectious Diseases, 19(1): 56-66.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2019. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, 2019.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2021. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. CLSI Document M100-S20.

Cox, G. M., Mukherjee, J., Cole, G. T., Casadevall, A. and Perfect, J. R. 2000. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. Infection and Immunity, 68(2): 443-448.

Cross, A. S. 2008. What is a virulence factor?. Critical Care, 12: 1-2.

Croxen, M. A. and Finlay, B. B. 2010. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. Nature Reviews Microbiology, 8(1): 26-38.

Cruickshank, R., Duguid, J. P., Marmion, B. P. and Swain, R. H. 1975. Tests for identification of bacteria. Medical Microbiology, 2: 170-189.

Cummins, M. L., Reid, C. J. and Djordjevic, S. P. 2022. F plasmid lineages in Escherichia coli ST95: implications for host range, antibiotic resistance, and zoonoses. Msystems, 7(1): e01212-21.

Da Silva Bomfim, N., Nakassugi, L. P., Oliveira, J. F. P., Kohiyama, C. Y., Mossini, S. A. G., Grespan, R. and Machinski Jr, M. 2015. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by Rosmarinus officinalis L. essential oil in Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg. Food Chemistry, 166: 330-336.

Da Silva, A. and Teschke, O. 2003. Effects of the antimicrobial peptide PGLa on live Escherichia coli. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1643(1): 95-103.

Danese, P. N., Pratt, L. A. and Kolter, R. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of Escherichia coli K-12 biofilm architecture. Journal of Bacteriology, 182(12): 3593-3596.

Davis, N. F. and Flood, H. D. 2011. The pathogenesis of urinary tract infections. In Clinical management of complicated urinary tract infection. InTech, 953-978.

De Boer, M., Heuer, C., Hussein, H. and McDougall, S. 2015. Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobials against Escherichia coli and Trueperella pyogenes of bovine uterine origin. Journal of Dairy Science, 98(7): 4427-4438.

De Kraker, M. E., Stewardson, A. J. and Harbarth, S. 2016. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?. PLoS Medicine, 13(11): e1002184.

Dixit, S. M., Gordon, D. M., Wu, X. Y., Chapman, T., Kailasapathy, K. and Chin, J. J. C. 2004. Diversity analysis of commensal porcine Escherichia coli–associations between genotypes and habitat in the porcine gastrointestinal tract. Microbiology, 150(6): 1735-1740.

Dobetsberger, C. and Buchbauer, G. 2011. Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. Flavour and Fragrance Journal, 26(5): 300-316.

ECDC, Antimicrobial Resistance and Healthcare-Associated Infections Programme, C. 2009. Antibiotic resistance in Europe: the challenges ahead. Eurosurveillance, 14(45).

Emody, L., Kerenyi, M. and Nagy, G. 2003. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli. International Journal of Antimicrobial Agents, 22: 29-33.

Erjavec, M. S. 2019. Introductory Chapter: The Versatile Escherichia coli. The Universe of Escherichia, 3.

Eto, D. S., Sundsbak, J. L. and Mulvey, M. A. 2006. Actin-gated intracellular growth and resurgence of uropathogenic Escherichia coli. Cellular Microbiology, 8(4): 704-717.

Farshad, S. and Emamghorashi, F. 2009. The prevalence of virulence genes of E. coli strains isolated from children with urinary tract infection. Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation, 20(4): 613-617.

Farshad, S., Ranjbar, R., Japoni, A., Hosseini, M., Anvarinejad, M. and Mohammadzadegan, R. 2012. Microbial susceptibility, virulence factors, and plasmid profiles of uropathogenic Escherichia coli strains isolated from children in Jahrom, Iran. Archives of Iranian Medicine, 15(5).

Ferdous, M. 2017. Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) from Humans in the Netherlands: Novel diagnostic approach, molecular characterization and phylogenetic background. Msc. Thesis, University of Groningen, 98 page, Groningen.

Fernandes, R. C. D. S. C., Flores, V. M. Q., de Macedo, Z. S. and Medina-Acosta, E. 2003. Coproantibodies to the enteropathogenic Escherichia coli vaccine candidates BfpA and EspB in breastfed and artificially fed children. Vaccine, 21(15): 1725-1731.

Ferrer, R., Martin-Loeches, I., Phillips, G., Osborn, T. M., Townsend, S., Dellinger, R. P., and Levy, M. M. 2014. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guidelinebased performance improvement program. Critical Care Medicine, 42(8): 1749-1755.

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

Forbes, B. A., Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. 2016. Study guide for Bailey and Scott's diagnostic microbiology-e-book. Elsevier Health Sciences, 200 page, Amsterdam.

Fotadar, U., Zaveloff, P. and Terracio, L. 2005. Growth of Escherichia coli at elevated temperatures. Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms, 45(5): 403-404.

Gadallah, M. A. A. 1994. The combined effects of acidification stress and kinetin on chlorophyll content, dry matter accumulation and transpiration coefficient in Sorghum bicolor plants. Biologia Plantarum, 36(1): 149-153.

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

GenStat Committee. 2003. GenStat® Release 7.1. VSN International, 2003.

Gharajalar, S. N. and Sofiani, V. H. 2017. Patterns of efflux pump genes among tetracycline resistance uropathogenic Escherichia coli isolates obtained from human urinary infections. Jundishapur Journal of Microbiology, 10(2).

Gilmore, M. S. and Ferretti, J. J. 2003. The thin line between gut commensal and pathogen. Science, 299(5615): 1999-2002.

Gudiña, E. J., Rocha, V., Teixeira, J. A. and Rodrigues, L. R. 2010. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from Lactobacillus paracasei ssp. paracasei A20. Letters in Applied Microbiology, 50(4): 419-424.

Guo, J. 2018. Correlation of fermentation redox potential and induction of recombinant E. coli expression system. MSc. Thesis, University of Saskatchewan, 58 page, Saskatoon.

Hailemariam, S. 2016. Extraction and characterization of essential oil from Rosemary Leaves. Msc. Thesis, Addis Ababa University, 93 page, Addis Ababa.

Hanafi, E. M., Abdel-Khader, M. M., Kassem, S. S. and Danial, E. N. 2010. Aroma-therapy for Endometritis induced by Candida albicans. International Journal of Academic Research, 2(5).

Hasan, T. H. and Al-Harmoosh, R. A. 2020. Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria. Systematic Reviews in Pharmacy, 11(6): 817-823.

Hasman, H., Schembri, M. A. and Klemm, P. 2000. Antigen 43 and type 1 fimbriae determine colony morphology of Escherichia coli K-12. Journal of Bacteriology, 182(4): 1089-1095.

Hassan, R., Tantawy, M., Gouda, N. A., Elzayat, M. G., Gabra, S., Nabih, A. and Sayed, A. A. 2020. Genotypic characterization of multiple drug resistant Escherichia coli isolates from a pediatric cancer hospital in Egypt. Scientific Reports, 10(1): 4165.

Hemraj, V., Diksha, S. and Avneet, G. 2013. A review on commonly used biochemical test for bacteria. Innovare Journal of Life Sciences, 1(1): 1-7.

Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. and Ala'Aldeen, D. 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68(4): 692-744.

Heras, B., Totsika, M., Peters, K. M., Paxman, J. J., Gee, C. L., Jarrott, R. J. and Schembri, M. A. 2014. The antigen 43 structure reveals a molecular Velcro-like mechanism of autotransporter-mediated bacterial clumping. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(1): 457-462.

Herrero, M., Arráez-Román, D., Segura, A., Kenndler, E., Gius, B., Raggi, M. A. and Cifuentes, A. 2005. Pressurized liquid extraction–capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts. Journal of Chromatography, 1084(2): 54-62.

Hofer, U. 2019. The cost of antimicrobial resistance. Nature Reviews Microbiology, 17(1): 3-3.

Hussain, T., Jamal, M., Nighat, F. and Andleeb, S. 2014. Broad spectrum antibiotics and resistance in non-target bacteria: An example from tetracycline. Journal of Pure and Applied Microbiology, 8: 2667-2671.

Iseppi, R., Sabia, C., de Niederhäusern, S., Pellati, F., Benvenuti, S., Tardugno, R. and Messi, P. 2019. Antibacterial activity of Rosmarinus officinalis L. and Thymus vulgaris L. essential oils and their combination against food-borne pathogens and spoilage bacteria in ready-to-eat vegetables. Natural Product Research, 33(24): 3568-3572.

Izdebski, R., Baraniak, A., Fiett, J., Adler, A., Kazma, M., Salomon, J. and Gniadkowski, M. 2013. Clonal structure, extended-spectrum β-lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of Escherichia coli populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57(1): 309-316.

Jabbar, A. D. 2013. Phenotypic and Genotypic Detection of Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBL) among Escherichia coli Isolated from Symptomatic Female's Genital Tract Infection. Journal of Wassit for Science & Medicine, 6(1): 59-67.

Jafari-Sales, A. and Pashazadeh, M. 2020. Study of chemical composition and antimicrobial properties of Rosemary (Rosmarinus officinalis) essential oil on Staphylococcus aureus and Escherichia coli in vitro. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 3(1): 62-69.

Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T. and Ishii, S. 2017. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. Journal of Applied Microbiology, 123(3): 570-581.

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

Justice, S. S. and Hunstad, D. A. 2012. UPEC hemolysin: more than just for making holes. Cell Host & Microbe, 11(1): 4-5.

Justice, S. S., Hung, C., Theriot, J. A., Fletcher, D. A., Anderson, G. G., Footer, M. J. and Hultgren, S. J. 2004. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic Escherichia coli in urinary tract pathogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(5): 1333-1338.

Kadry, A. A. 2003. Lack of efflux mechanism in a clinical isolate of Pseudomonas aeruginosa highly resistant to β-lactams and imipenem. Folia Microbiologica, 48: 529-533.

Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. 2004. Pathogenic escherichia coli. Nature Reviews Microbiology, 2(2): 123-140.

Karam, M. R. A., Habibi, M. and Bouzari, S. 2018. Relationships between virulence factors and antimicrobial resistance among Escherichia coli isolated from urinary tract infections and commensal isolates in Tehran, Iran. Osong Public Health and Research Perspectives, 9(5): 217.

Kaur, P., Chakraborti, A. and Asea, A. 2010. Enteroaggregative Escherichia coli: an emerging enteric food borne pathogen. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2010.

Klančnik, A., Guzej, B., Kolar, M. H., Abramovič, H. and Možina, S. S. 2009. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. Journal of Food Protection, 72(8): 1744-1752.

Langstraat, J., Bohse, M. and Clegg, S. 2001. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of Klebsiella pneumoniae, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. Infection and Immunity, 69(9): 5805-5812.

Laxminarayan, R., Van Boeckel, T., Frost, I., Kariuki, S., Khan, E. A., Limmathurotsakul, D. and Zhu, Y. G. 2020. The Lancet Infectious Diseases Commission on antimicrobial resistance: 6 years later. The Lancet Infectious Diseases, 20(4): e51-e60.

Lim, M. A., Kim, J. Y., Acharya, D., Bajgain, B. B., Park, J. H., Yoo, S. J. and Lee, K. 2020. A diarrhoeagenic Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) infection outbreak that occurred among elementary school children in Gyeongsangbuk-Do province of South Korea was associated with consumption of water-contaminated food items. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(9): 3149.

Lindsley, M. D., Snyder, J. W., Atlas, R. M. and Larocco, M. T. 2015. Reagents, stains, and media: Mycology. Manual of Clinical Microbiology, 1955-1964.

Lorenz, B., Wichmann, C., Stöckel, S., Rösch, P. and Popp, J. 2017. Cultivation-free Raman spectroscopic investigations of bacteria. Trends in microbiology, 25(5): 413-424.

Lu, X., Nie, S., Xia, C., Huang, L., He, Y., Wu, R. and Zhang, L. 2014. A rapid two-step algorithm detects and identifies clinical macrolide and beta-lactam antibiotic

resistance in clinical bacterial isolates. Journal of Microbiological Methods, 102: 26-31.

Lyhs, U., Ikonen, I., Pohjanvirta, T., Raninen, K., Perko-Mäkelä, P. and Pelkonen, S. 2012. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli in poultry meat products on the Finnish retail market. Acta Veterinaria Scandinavica, 54: 1-6.

MacFaddin, J. F. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams & Wilkins, 1(2): 1-9.

Madigan, M. T., Jung, D. O., Woese, C. R. and Achenbach, L. A. 2000. Rhodoferax antarcticus sp. nov., a moderately psychrophilic purple nonsulfur bacterium isolated from an Antarctic microbial mat. Archives of Microbiology, 173: 269-277.

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G. and Monnet, D. L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinical Microbiology and Infection, 18(3): 268-281.

Mahon, C. R., Mt, M. S. and Lehman, D. C. 2022. Textbook of diagnostic microbiology-e-book. Elsevier Health Sciences, 1088 page, Amsterdam.

Maleki, D., Jahromy, S. H., Karizi, S. Z. and Eslami, P. 2016. The prevalence of acrA and acrB genes among multiple-drug resistant uropathogenic Escherichia coli isolated from patients with UTI in Milad Hospital, Tehran. Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection, 4(1): 39785-39785.

Mangena, T. and Muyima, N. Y. O. 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of Artemisia afra, Pteronia incana and Rosmarinus officinalis on selected bacteria and yeast strains. Letters in Applied Microbiology, 28(4): 291-296.

Mao, B. H., Chang, Y. F., Scaria, J., Chang, C. C., Chou, L. W., Tien, N. and Teng, C. H. 2012. Identification of Escherichia coli genes associated with urinary tract infections. Journal of Clinical Microbiology, 50(2): 449-456.

Marciano, D. C., Karkouti, O. Y. and Palzkill, T. 2007. A fitness cost associated with the antibiotic resistance enzyme SME-1 β-lactamase. Genetics, 176(4): 2381-2392.

Marrelli, M., Conforti, F., Formisano, C., Rigano, D., Arnold, N. A., Menichini, F. and Senatore, F. 2016. Composition, antibacterial, antioxidant and antiproliferative

activities of essential oils from three Origanum species growing wild in Lebanon and Greece. Natural Product Research, 30(6): 735-739.

Marrs, C. F., Zhang, L., Tallman, P., Manning, S. D., Somsel, P., Raz, P. and Foxman, B. 2002. Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral Escherichia coli. Journal of Medical Microbiology, 51(2): 138-142.

Martinson, J. N. and Walk, S. T. 2020. Escherichia coli residency in the gut of healthy human adults. EcoSal Plus, 9(1).

McCartney, A. L., Wenzhi, W. and Tannock, G. W. 1996. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. Applied and Environmental Microbiology, 62(12): 4608-4613.

Meena, M., Swapnil, P., Zehra, A., Aamir, M., Dubey, M. K., Patel, C. B. and Upadhyay, R. S. 2019. Virulence factors and their associated genes in microbes. In New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Elsevier, 181-208.

Méndez-Ortiz, M. M., Hyodo, M., Hayakawa, Y. and Membrillo-Hernández, J. 2006. Genome-wide transcriptional profile of Escherichia coli in response to high levels of the second messenger 3′, 5′-cyclic diguanylic acid. Journal of Biological Chemistry, 281(12): 8090-8099.

Metzler, A. 2016. Developing a crystal violet assay to quantify biofilm production capabilities of Staphylococcus aureus. MSc. Thesis, The Ohio State University, 75 page, Ohio.

Mith, H., Dure, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G. and Clinquart, A. 2014. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. Food Science & Nutrition, 2(4): 403-416.

Mohammed, H. B., Gomroki, F., Malla, S. and Kumar, R. S. 2014. Amplification of ndvB gene and biofilm formation studies in Escherichia coli. European Journal of Experimental Biology, 4(6): 65-70.

Mosquito, S., Ruiz, J., Pons, M. J., Durand, D., Barletta, F. and Ochoa, T. J. 2012. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in diarrhoeagenic Escherichia coli

isolated from children. International Journal of Antimicrobial Agents, 40(6): 544-548.

Murata, K., Noguchi, K., Kondo, M., Onishi, M., Watanabe, N., Okamura, K. and Matsuda, H. 2013. Promotion of hair growth by Rosmarinus officinalis leaf extract. Phytotherapy Research, 27(2): 212-217.

Naewkanya, P. and Petiraksakul, A. 2021. Inactivation of Escherichia coli by several types of gas bubbles. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. IOP Publishing, 1163(1): 12-20.

Nagamatsu, K., Hannan, T. J., Guest, R. L., Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Binkley, J. and Hultgren, S. J. 2015. Dysregulation of Escherichia coli α-hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(8): 871-880.

Nataro, J. P. and Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic escherichia coli. Clinical Microbiology Reviews, 11(1): 142-201.

Nji, E., Kazibwe, J., Hambridge, T., Joko, C. A., Larbi, A. A., Damptey, L. A. O. and Lien, L. T. Q. 2021. High prevalence of antibiotic resistance in commensal Escherichia coli from healthy human sources in community settings. Scientific Reports, 11(1): 3372.

Nkansa-Gyamfi, N. A., Kazibwe, J., Traore, D. A. and Nji, E. 2019. Prevalence of multidrug-, extensive drug-, and pandrug-resistant commensal Escherichia coli isolated from healthy humans in community settings in low-and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. Global Health Action, 12(1): 1815272.

Oliveira, V. D. C., Souza, M. T., Zanotto, E. D., Watanabe, E. and Coraça-Huber, D. 2020. Biofilm formation and expression of virulence genes of microorganisms grown in contact with a new bioactive glass. Pathogens, 9(11): 927.

Osundiya, O. O., Oladele, R. O. and Oduyebo, O. O. 2013. Multiple antibiotic resistance (MAR) indices of Pseudomonas and Klebsiella species isolates in Lagos University Teaching Hospital. African Journal of Clinical and Experimental Microbiology, 14(3): 164-168.

Otto, K., Norbeck, J., Larsson, T., Karlsson, K. A. and Hermansson, M. 2001. Adhesion of type 1-fimbriated Escherichia coli to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins. Journal of Bacteriology, 183(8): 2445-2453.

Ouibrahim, A., Tlili-Ait-kaki, Y., Bennadja, S., Amrouni, S., Djahoudi, A. G. and Djebar, M. R. 2013. Evaluation of antibacterial activity of Laurus nobilis L., Rosmarinus officinalis L. and Ocimum basilicum L. from Northeast of Algeria. African Journal of Microbiology Research, 7(42): 4968-4973.

Packey, C. D. and Sartor, R. B. 2009. Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases. Current Opinion in Infectious Diseases, 22(3): 292-301.

Pahlow, S., Weber, K., Popp, J., Bayden, R. W., Kochan, K., Rüther, A. and Bhargava, R. 2018. Application of vibrational spectroscopy and imaging to point-of-care medicine: A review. Applied Spectroscopy, 72(101): 52-84.

Paltansing, S. 2015. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae: characterization and detection. PhD. Thesis, Leiden University, 152 page, Leiden.

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

Paramythiotou, E. and Routsi, C. 2016. Association between infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria and mortality in critically ill patients. World Journal of Critical Care Medicine, 5(2): 111.

Paratropia Blume, D. C. 2017. Plants used in bonsai (inalphabetical order). The Bonsai Book: A reference for Bonsai Plants & Aesthetics, 297.

Peacock, S. J., Parkhill, J. and Brown, N. M. 2018. Changing the paradigm for hospital outbreak detection by leading with genomic surveillance of nosocomial pathogens. Microbiology, 164(10): 1213.

Pearson, J. S., Giogha, C., Wong Fok Lung, T. and Hartland, E. L. 2016. The genetics of enteropathogenic Escherichia coli virulence. Annual Review of Genetics, 50: 493-513.

Peek, S. F., Mcguirk, S. M., Sweeney, R. W. and Cummings, K. J. 2018. Infectious diseases of the gastrointestinal tract. Rebhun's Diseases of Dairy Cattle, 249.

Pena, I., Picazo, J. J., Rodríguez-Avial, C. and Rodríguez-Avial, I. 2014. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing Klebsiella pneumoniae ST11 isolates. International Journal of Antimicrobial Agents, 43(5): 460-464.

Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R. and Núñez, G. 2017. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. Immunological Reviews, 279(1): 70-89.

Pimchan, T., Maensiri, D. and Eumkeb, G. 2017. Synergy and mechanism of action of α-mangostin and ceftazidime against ceftazidime-resistant Acinetobacter baumannii. Letters in Applied Microbiology, 65(4): 285-291.

Polse, R. F., Yousif, S. Y. and Assafi, M. S. 2016. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of uropathogenic E. coli among people in Zakho, Iraq. International Journal of Research in Medical Sciences, 4(4): 1219-1223.

Poursina, F., Sepehrpour, S. and Mobasherizadeh, S. 2018. Biofilm formation in nonmultidrug-resistant Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection in Isfahan, Iran. Advanced Biomedical Research, 7.

Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. and Lejeune, P. 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in Escherichia coli. Journal of Bacteriology, 181(19): 5993-6002.

Programme, H. A. I. 2010. Antimicrobial resistance 2010: Global attention on carbapenemase-producing bacteria. Antimicrobial Resistance, 2.

Purohit, M. R., Chandran, S., Shah, H., Diwan, V., Tamhankar, A. J. and Stålsby Lundborg, C. 2017. Antibiotic resistance in an Indian rural community: a 'One-Health'observational study on commensal coliform from humans, animals, and water. International Journal of Environmental Research and Public Health, 14(4): 386.

Raeispour, M. and Ranjbar, R. 2018. Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic Escherichia coli strains. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 7(1): 1-9.

Ramírez-Castillo, F. Y., Moreno-Flores, A. C., Avelar-González, F. J., Márquez-Díaz, F., Harel, J. and Guerrero-Barrera, A. L. 2018. An evaluation of multidrug-resistant Escherichia coli isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico:

cross-sectional study. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 17(1): 1-13.

Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M. and Swerdlow, D. L. 2005. Epidemiology of Escherichia coli O157: H7 outbreaks, United States, 1982–2002. Emerging Infectious Diseases, 11(4):603-609.

Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Ćebović, T., Vukmirović, S. and Mikov, M. 2014. Antioxidant activity of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) essential oil and its hepatoprotective potential. BMC Complementary and Alternative Medicine, 14(1): 1-9.

Reilly, M. J., Dunn, C. J., Meigs, G. W., Spies, T. A., Kennedy, R. E., Bailey, J. D. and Briggs, K. 2017. Contemporary patterns of fire extent and severity in forests of the Pacific Northwest, USA (1985–2010). Ecosphere, 8(3): e01695.

Robino, L., García-Fulgueiras, V., Araujo, L., Algorta, G., Pírez, M. C. and Vignoli, R. 2014. Urinary tract infection in Uruguayan children: Aetiology, antimicrobial resistance and uropathogenic Escherichia coli virulotyping. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2(4): 293-298.

Roche, A. J., McFadden, J. P. and Owen, P. 2001. Antigen 43, the major phase-variable protein of the Escherichia coli outer membrane, can exist as a family of proteins encoded by multiple alleles. Microbiology, 147(1): 161-169.

Rousham, E., Unicomb, L., Wood, P., Smith, M., Asaduzzaman, M. and Islam, M. A. 2018. Spatial and temporal variation in the community prevalence of antibiotic resistance in Bangladesh: an integrated surveillance study protocol. BMJ Open, 8(4): e023158.

Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A. and Fernández-López, J. 2012. Chemical characterization and antibacterial activity of Thymus moroderi and Thymus piperella essential oils, two Thymus endemic species from southeast of Spain. Food Control, 27(2): 294-299.

Salman, V., Bailey, J. V. and Teske, A. 2013. Phylogenetic and morphologic complexity of giant sulphur bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek, 104: 169-186.

Sambrook, J., Fritch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Strategies for studying gene regulation. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 16(16).

Samore, M. H., Tonnerre, C., Hannah, E. L., Stoddard, G. J., Borotkanics, R. J., Haddadin, B. and Harbarth, S. 2011. Impact of outpatient antibiotic use on carriage of ampicillin-resistant Escherichia coli. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55(3): 1135-1141.

Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F. J. and Reglero, G. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. Journal of Food Protection, 68(4): 790-795.

Sapers, G. M., Miller, R. L., Annous, B. A. and Burke, A. M. 2002. Improved antimicrobial wash treatments for decontamination of apples. Journal of food science, 67(5): 1886-1891.

Sapers, G. M., Miller, R. L., Jantschke, M. and Mattrazzo, A. M. 2000. Factors limiting the efficacy of hydrogen peroxide washes for decontamination of apples containing Escherichia coli. Journal of Food Science, 65(3): 529-532.

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.

Scaletsky, I. C. A. 2019. Enteropathogenic Escherichia coli. In The Universe of Escherichia coli. IntechOpen, 51.

Shareef, A. Y. 1998. The molecular effect of some plant extract on the growth and metabolism of some gram positive and gram negative bacteria (Doctoral dissertation, PhD. Thesis, University of Mosul, 109 page, Mosul.

Sharma, A. K., Dhasmana, N., Dubey, N., Kumar, N., Gangwal, A., Gupta, M. and Singh, Y. 2017. Bacterial virulence factors: secreted for survival. Indian Journal of Microbiology, 57: 1-10.

Shayma'a, J. A., Khaleel, I. R., Ranin, K. A. A. and Marwa, M. A. K. 2011. Study of the antimicrobial activity of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) callus extract and selected types of antibiotics against some bacterial species. Al-TAaqani, 24: 128-138.

Shrestha, R., Khanal, S., Poudel, P., Khadayat, K., Ghaju, S., Bhandari, A. and Marasini, B. P. 2019. Extended spectrum β-lactamase producing uropathogenic Escherichia

coli and the correlation of biofilm with antibiotics resistance in Nepal. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 18: 1-6.

Sies, H. 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. Redox Biology, 11: 613-619.

Silaban, H. 2021. The effect of various concentrations of ethanol extract of the leaves of Paederia foetida L. on the growth of Escherichia coli bacteria. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 11(6): 61-67.

Singh, P. and Prakash, A. 2008. Isolation of Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes from milk products sold under market conditions at Agra region. Acta Agriculturae Slovenica, 92(1): 83-88.

Singh, T., Das, S., Ramachandran, V. G., Wani, S., Shah, D., Maroof, K. A. and Sharma, A. 2017. Distribution of integrons and phylogenetic groups among enteropathogenic Escherichia coli isolates from children< 5 years of age in Delhi, India. Frontiers in Microbiology, 8: 561.

Soldatova, A. V., Tao, L., Romano, C. A., Stich, T. A., Casey, W. H., Britt, R. D. and Spiro, T. G. 2017. Mn (II) oxidation by the multicopper oxidase complex Mnx: a binuclear activation mechanism. Journal of the American Chemical Society, 139(33): 11369-11380.

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(11): 1355.

Soto, S. M. 2014. Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. Advances in Biology, 2014.

Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B. and Švabić-Vlahović, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods, 40(2): 175-179.

Stojanović-Radić, Z., Nešić, M., Čomić, L. and Radulović, N. 2010. Antimicrobial activity and cytotoxicity of commercial rosemary essential oil (Rosmarinus officinalis L.). Biologica Nyssana, 1(1): 83-88.

Taghadosi, R., Shakibaie, M. R. and Masoumi, S. 2015. Biochemical detection of N-Acyl homoserine lactone from biofilm-forming uropathogenic Escherichia coli isolated

from urinary tract infection samples. Reports of Biochemistry & Molecular Biology, 3(2): 56.

Tajbakhsh, E., Ahmadi, P., Abedpour-Dehkordi, E., Arbab-Soleimani, N. and Khamesipour, F. 2016. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic E. coli isolated from clinical samples in Iran. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 5(1): 1-8.

Tantawiwat, S., Tansuphasiri, U., Wongwit, W., Wongchotigul, V. and Kitayaporn, D. 2005. Development of multiplex PCR for the detection of total coliform bacteria for Escherichia coli and Clostridium perfringens in drinking water. Journal of Mahidol University, 36(1): 1-8.

Tapader, R., Basu, S. and Pal, A. 2019. Secreted proteases: A new insight in the pathogenesis of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. International Journal of Medical Microbiology, 309(4): 159-168.

Tenaillon, O., Barrick, J. E., Ribeck, N., Deatherage, D. E., Blanchard, J. L., Dasgupta, A. and Lenski, R. E. 2016. Tempo and mode of genome evolution in a 50,000-generation experiment. Nature, 536(7615): 165-170.

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

Tuttle, A. R., Trahan, N. D. and Son, M. S. 2021. Growth and maintenance of Escherichia coli laboratory strains. Current Protocols, 1(1): e20.

Ulett, G. C., Valle, J., Beloin, C., Sherlock, O., Ghigo, J. M. and Schembri, M. A. 2007. Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic Escherichia coli reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. Infection and Immunity, 75(7): 3233-3244.

Walker, C. L. F., Rudan, I., Liu, L., Nair, H., Theodoratou, E., Bhutta, Z. A. and Black, R. E. 2013. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. The Lancet, 381(9875): 1405-1416.

Waters, N. R., Abram, F., Brennan, F., Holmes, A. and Pritchard, L. 2020. Easy phylotyping of Escherichia coli via the EzClermont web app and command-line tool. Access Microbiology, 2(9).

Watnick, P. I. and Kolter, R. 1999. Steps in the development of a Vibrio cholerae El Tor biofilm. Molecular Microbiology, 34(3): 586-595.

Webb, C. T., Heinz, E. and Lithgow, T. 2012. Evolution of the β-barrel assembly machinery. Trends in Microbiology, 20(12): 612-620.

Weinstein, M. P. and Lewis, J. S. 2020. The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: background, organization, functions, and processes. Journal of Clinical Microbiology, 58(3): e01864-19.

WHO, World Health Organization. 2008. Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. World Health Organization, 74.

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

Woodford, N., Turton, J. F. and Livermore, D. M. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiology Reviews, 35(5), 736-755.

Woodward, J. M., Connaughton, I. D., Fahy, V. A., Lymbery, A. J. and Hampson, D. J. 1993. Clonal analysis of Escherichia coli of serogroups O9, O20, and O101 isolated from Australian pigs with neonatal diarrhea. Journal of Clinical Microbiology, 31(5): 1185-1188.

Wu, H. J., Wang, A. H. and Jennings, M. P. 2008. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. Current Opinion in Chemical Biology, 12(1): 93-101.

Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T. and Hossain, N. 2017. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. Cureus, 9(6).

Zarringhalam, M., Goudarzi, H., Nahaei, M. R., Bandehpour, M. and Shahbazi, G. 2016. Detection of Escherichia coli pathotypes from the cases of Diarrhea. Biosciences Biotechnology Research Asia, 13(1): 247-255.

Zhao, Y. W., Wang, H. X., Jia, G. C. and Li, Z. 2018. Application of aptamer-based biosensor for rapid detection of pathogenic Escherichia coli. Sensors, 18(8): 2518.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Hadeel Mohammed Fadhil FADHIL

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020-Halen
Lisans	Tikrit Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2011-2015