ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANBAR VİLAYETİNDE İDRAR YOLU ENFEKSİYONU VE DOĞURGANLIK PROBLEMİ OLAN ERKEKLERDEN İZOLE EDİLEN *E. COLI'NİN* VİRÜLANS FAKTÖR GENLERİNİN KARAKTERİZASYONU

Mohammed Nasri Hasan AL-BAYATI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mohammed Nasri Hasan AL-BAYATI tarafından hazırlanan **"Anbar Vilayetinde İdrar Yolu Enfeksiyonu ve Doğurganlık Problemi Olan Erkeklerden İzole Edilen *E. coli*'nin Virülans Faktör Genlerinin Karakterizasyonu"** adlı tez çalışması 25/05/2023 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. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR

Eş Danışman : Prof. Dr. Samir Mishrif Khalaf Hamad AL-DULAIMI

Jüri Üyeleri :

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Damla AMUTKAN MUTLU
Biyoloji Anabilim Dalı
Gazi 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 "**Anbar Vilayetinde İdrar Yolu Enfeksiyonu ve Doğurganlık Problemi Olan Erkeklerden İzole Edilen *E. coli*'nin Virülans Faktör Genlerinin Karakterizasyonu**" 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 (25/05/2023).

Mohammed Nasri Hasan AL-BAYATI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANBAR VİLAYETİNDE İDRAR YOLU ENFEKSİYONU VE DOĞURGANLIK PROBLEMİ OLAN ERKEKLERDEN İZOLE EDİLEN *E. COLI'NİN* VİRÜLANS FAKTÖR GENLERİNİN KARAKTERİZASYONU

Mohammed Nasri Hasan AL-BAYATI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR
Eş Danışman: Prof. Dr. Samir Mishrif Khalaf Hamad AL-DULAIMI

Bu çalışmada, dünya genelinde yaygın bir morbidite kaynağı olan idrar yolu enfeksiyonu (İYE) incelenmiştir. İYE'ye genellikle üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC) bakterileri neden olmaktadır. Çalışmada erkek hastalardan elde edilen 120 numune kullanılmıştır. *E. coli* bakterisini, doğurganlık sorunları olan İYE hastalarından izole etmek için Vitek II teknolojisi, geleneksel biyokimyasal ve kültür testleri kullanılmıştır. PCR yöntemiyle virülans faktörlerini (*fimH, aer, afa ve HlyA*) kodlayan genler tanımlanmıştır. Verilerin analizinde SPSS programı kullanılmıştır. Sonuçlar, 120 numunedeki bakteri üremesinin %25'ini (30 izolat) *Escherichia coli'nin* oluşturduğunu, diğer bakterilerin ise %75'ini (90 izolat) oluşturduğunu göstermiştir. Vitek II sisteminin *E. coli* antibiyotik direnci analizine göre izolatların %90'ı (27 izolat) Amoksisilin-Klavulanik Asit, Ampisilin ve Sefotaksim'e dirençliyken, %83,3'ü (25 izolat) Amoksisilin ve Temosilin'e direnç göstermiştir. Ayrıca izolatların %73,3'ünde (22 izolat) Aztreonam, %66,6'sında (20 izolat) İmipenem ve Meropenem/Vaborbaktam, %60'ında (18 izolat) Sefoksitin ve %76,6'sında (23 izolat) Ampisilin/Sulbaktam, Piperasilin ve Piperasilin/Sulbaktam'a dirençli olduğu görülmüştür. *E. coli* izolatlarının önemli ölçüde biyofilm oluşturma yeteneği olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların %43,3'ü güçlü biyofilm, %40'ı orta derecede biyofilm ve %16,6'sı zayıf biyofilm oluşturmuştur. Sonuçlar sperm konsantrasyonunda, toplam hareketlilikte ve sperm hacminde önemli bir azalma olduğunu göstermektedir. PCR tekniği kullanılarak, sık görülen virülans genlerinin *fimH* için 17 (%56,6), *aer* ve *afa* için 15 (%50), *HlyA* için ise 12 (%40) olduğu tespit edilmiştir.

2023, 62 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *E. coli*, NCBI, PCR, Primer spesifik, İkame

ABSTRACT

Master of Science Thesis

CHARECTERIZATION OF THE VIRULENCE FACTORS GENES OF *E. COLI* ISOLATED FROM MEN SUFFERING FROM URINARY TRACT INFECTION AND FERTILITY PROBLEMS IN ANBAR PROVINCE

Mohammed Nasri Hasan AL-BAYATI

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR
Co-Advisor: Prof. Dr. Samir Mishrif Khalaf Hamad AL-DULAIMI

In this study, urinary tract infection (UTI), a common source of morbidity worldwide, was analyzed. UTIs are usually caused by uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) bacteria. A total of 120 samples from male patients were used in the study. Vitek II technology, conventional biochemical and culture tests were used to isolate *E. coli* bacteria from UTI patients with fertility problems. Genes encoding virulence factors (*fimH*, *aer*, *afa* and *HlyA*) were identified by PCR. SPSS software was used to analyze the data. The results showed that *Escherichia coli* accounted for 25% (30 isolates) of the bacterial growth in 120 samples, while other bacteria accounted for 75% (90 isolates). According to the *E. coli* antibiotic resistance analysis of the Vitek II system, 90% of the isolates (27 isolates) were resistant to Amoxicillin-Clavulanic Acid, Ampicillin and Cefotaxime, while 83.3% (25 isolates) were resistant to Amoxicillin and Temocillin. Furthermore, 73.3% (22 isolates) were resistant to Aztreonam, 66.6% (20 isolates) to Imipenem and Meropenem/Vaborbactam, 60% (18 isolates) to Cefoxitin and 76.6% (23 isolates) to Ampicillin/Sulbactam, Piperacillin and Piperacillin/Sulbactam. *E. coli* isolates were found to have significant biofilm forming ability. Of these isolates, 43.3% formed strong biofilm, 40% formed moderate biofilm and 16.6% formed weak biofilm. The results revealed a significant decrease in sperm concentration, total motility and sperm volume. Using PCR technique, the most common virulence genes were found to be 17 (56.6%) for *fimH*, 15 (50%) for *aer* and *afa*, and 12 (40%) for *HlyA*.

2023, 62 pages

Keywords: *E. coli*, NCBI, PCR, Primer specific, Substitution

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR'a sabrı, yol göstericiliği ve bilimsel desteği için en içten teşekkürlerimi sunarım. Eş danışmanım Prof. Dr. Samir Mishrif Khalaf Hamad AL-DULAIMI'ye destekleri için teşekkür ederim. Son olarak bu tezi tamamlamamda her zaman yanımda olan anneme, kardeşlerime ve eşime teşekkürlerimi sunarım.

Mohammed Nasri Hasan AL-BAYATI
Çankırı, Mayıs 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 İYE Patogenezi **3**
2.2 Üropatojenik *Escherichia Coli* (UPEC) **3**
2.3 Antibiyotikler ve UPEC'ler **7**
3. MATERYAL VE METOT **10**
3.1 Aletler, Ekipmanlar, Biyolojik Malzemeler ve Kimyasallar **10**
3.2 Hastalar ve Örnek Toplama **11**
3.3 *E. coli*'nin Teşhisi **11**
3.4 Antibiyotik Duyarlılık Testi **11**
3.5 Biyokimyasal Tanımlama **11**
3.5.1 Oksidaz testi **11**
3.5.2 Katalaz testi **12**
3.5.3 IMVIC testleri **12**
3.6 Biyofilm Oluşumunun Tespiti **13**
3.6.1 Biyofilm büyütme **13**
3.6.2 Biyofilm boyama **14**
3.6.3 Biyofilmin ölçülmesi **14**
3.7 Moleküler Biyoloji Çalışmaları: **14**
3.7.1 DNA ekstraksiyonu **15**
3.7.2 DNA konsantrasyonu ve saflığının tahmini **16**
3.7.3 DNA kalitesini analiz etmek için jel elektroforezi **16**

3.7.4 Primerlerin hazırlanması 16
3.7.5 Genlerin tespiti 17
3.8 İstatiksel Analiz 18
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 19
4.1 Kültür Sonuçları 19
4.2 Fenotipik ve Mikroskobik Karakterizasyon 19
4.3 Biyokimyasal Tanımlama 20
4.4 *Escherichia coli* Antibiyotik Duyarlılığının Vitek II Sistemi İle Tespiti 21
4.5 Biyofilm Oluşumu 23
4.6 Sperm Konsantrasyonu, Toplam Hareketlilik ve Sperm Hacmi 24
4.7 Genlerin Amplifikasyonu 25
4.8.1 *FimH* gene 31
4.8.2 *Aer* gene 32
4.8.3 *Afa* gene 33
4.8.4 *HlyA* gene 34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 36
5.1 Sonuç 36
5.2 Öneriler 36
KAYNAKLAR 37
EKLER 47
ÖZGEÇMİŞ 62

SİMGELER DİZİNİ

min	Dakika
°C	Derece
gm	Gram
L	Litre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
nm	Nanometre
%	Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

Afa	*Afa* yapıştırıcıları
ddH_2O	Çift damıtılmış su
TCP	Doku Kültürü Plakası
c-di-GMP	Döngüsel di-GMP
ExPEC	Ekstraintestinal patojenik *E. coli*
EMB	Eozin metilen mavisi
E. coli	*Escherichia coli*
CD14	Farklılaşma kümesi 14
CD46	Farklılaşma kümesi 46
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su
GTPase	Guanosin trifosfataz
QIRs	Hareketsiz hücre içi rezervuarlar
HlyA	Hemolizin
IBCs	Hücre içi bakteri toplulukları
IL-8	Interlökin 8
İYE	İdrar yolu enfeksiyonları
UTI	İdrar yolu enfeksiyonu
IL-6	İnterlökin 6
CLSI	Klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü
LPS	Lipopolisakarit
MEGA	Moleküler evrimsel genetik analizi
OD	Optik yoğunluk
PAMPs	Patojenle ilişkili moleküler modeller
pmol	Pikomol
PCR	Polimeraz zincirleme reaksiyonu
CNF1	Sitotoksik nekrotizan faktör 1
fimH	Tip 1 fimbrin D-mannoza özgü adezyon
T1F	Tip-1 saçaklı
TLR4	Toll benzeri reseptör 4
TLR5	Toll benzeri reseptör 5
TSB	Triptikaz soya suyu
TAE	Tris-asetat-EDTA
UPEC	UroPatojenik *Escherichia coli*

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Renal epitel hücrelerine (sağda) ve idrar kesesi hücrelerine (solda) üropatojenik *E. coli* yapışması (De Gaetano *et al.* 2023) 5
Şekil 4.1 UPEC'de ilgili kültür örneklerinin yaygınlığı 19
Şekil 4.2 EMB, MacConkey agar ve kanlı agarda üreyen *E. coli* kolonileri 20
Şekil 4.3 (A): *E. coli*'nin negatif vp testi; (B) negatif sitrat testi (yeşil renk görünümü) (C) pozitif metil kırmızısı testi (kırmızı renk görünümü) (D); pozitif Indol testi (kırmızı halka renginin görünümü) 21
Şekil 4.4 *E. coli* klinik izolatlarının antibiyotik duyarlılık modelleri antibiyotikler 22
Şekil 4.5 *E. coli* tarafından biyofilm oluşumunun yüzdesi 23
Şekil 4.6 E. coli için 96 kuyucuklu mikrotiter plaka yöntemiyle gerçekleştirilen biyofilm oluşumu deneylerinin sonuçları 24
Şekil 4.7 Ortalama sperm konsantrasyonu, toplam motilite ve sperm hacim seviyeleri 25
Şekil 4.8 *E. coli*'nin virülans genlerinin dağılımı 26
Şekil 4.9 *fimH* geni için agaroz jel elektroforezi 26
Şekil 4.10 *Aer* geni için agaroz jel elektroforezi 27
Şekil 4.11 *Afa* geni için agaroz jel elektroforezi 27
Şekil 4.12 *HlyA* geni için agaroz jel elektroforezi 28
Şekil 4.13 *FimH* geninin Filogenetik ağaç analizi *Escherichia coli* 32
Şekil 4.14 *Aer* geninin Filogenetik ağaç analizi *Escherichia coli* 33
Şekil 4.15 *Afa* geninin Filogenetik ağaç analizi *Escherichia coli* 34
Şekil 4.16 *HlyA* geninin Filogenetik ağaç analizi *Escherichia coli* 35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Çeşitli yaygın UPEC virülans faktörleri ve ana rolleri 6
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan araç ve gereçler 10
Çizelge 3.2 Biyolojik ve kimyasal malzemeler 10
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan besiyerleri 10
Çizelge 3.4 TCP yöntemine göre bakteri yapışması ve biyofilm oluşumunun sınıflandırılması (Iyamba *et al.* 2022) 15
Çizelge 3.5 Kit içeriği 15
Çizelge 3.6 Bu çalışmada kullanan primer dizileri 17
Çizelge 3.7 Genlerin reaksiyon bileşenleri 17
Çizelge 3.8 *HlyA* ve *afa* genlerinin tespiti için PCR programı 18
Çizelge 3.9 *fimH* geninin tespiti için PCR programı 18
Çizelge 3.10 *Aer* geninin tespiti için PCR programı 18
Çizelge 4.1 *E.coli* karakterizasyonu için biyokimyasal testler 21
Çizelge 4.2 *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılığı 22
Çizelge 4.3 Sperm konsantrasyonu, toplam hareketlilik ve sperm hacim seviyeleri 24
Çizelge 4.4 Genlerin polimorfizm tipini temsil eder 29

1. GİRİŞ

İdrar yolu enfeksiyonları (İYE) klinik pratikte en sık görülen hastalıklardandır. Dünya çapında her yıl yaklaşık 150 milyon insan İYE'ye yakalanmaktadır (Öztürk and Murt 2020). Enfeksiyonların çocuklarda, kadınlarda, yaşlılarda, şeker hastalarında, üroliti olanlarda ve idrar sondası kullananlarda ortaya çıkma olasılığı daha yüksektir (Daniel *et al.* 2023).

İYE'ler basit ve karmaşık olmak üzere iki klinik kategoriye ayrılmaktadır. Anatomik veya nörolojik idrar yolu anormalliklerinden etkilenmeyen sağlıklı hastalarda komplike olmayan İYE'ler (sistit ve piyelonefrit) bir endişe kaynağıdır. Üriner obstrüksiyon, idrar retansiyonu, immünsüpresyon ve böbrek yetmezliğinin tümü komplike İYE'ler ve idrar yolunu veya konağın savunmasını zayıflatan durumlarla ilişkilidir (Antinori and Pezzani 2018). Akut, kronik ve tekrarlayan enfeksiyonlar ile semptomlu veya semptomsuz bakteriüri, İYE'lerin neden olabileceği bozukluklar arasındadır (Behzadi *et al.* 2019).

Önceki araştırmalara göre *Escherichia coli* kişinin bağırsaklarında birikerek İYE'ye neden olabilir. Kanıtlar, *E. coli* kolonizasyonu ve üriner sisteme çıkışı sırasında flagellum aracılı motilitenin gerekli olduğunu göstermektedir (Garretto *et al.* 2020). Üropatojenik *E. coli* (UPEC)'nin aynı genomların ve semptomların yokluğunda ayırt edilememeleri nedeniyle bağırsaklara ek olarak üriner sistemi kolonize edebileceği bilinmektedir (Nielsen *et al.* 2017). Bu da bağırsaktan gelen *E. coli* suşlarının idrar yolunu kolonize ederek İYE'lere yol açabileceğine dair yaygın olarak kabul edilen bir teoridir (Thänert *et al.* 2019).

İnsan idrar mikrobiyotası (urobiyom) olarak bilinen mesanede yaşayan yeni tanımlanmış mikroorganizma grupları (bakteri, arkea, protistler, mantar ve virüsler) mevcut İYE paradigması tarafından dikkate alınmaz, sonuç olarak geleneksel terapötik tedavi yaklaşımları, 'idrar sterildir' dogmasına dayandırılmaya devam etmektedir. Geleneksel idrar kültürü yöntemiyle kültürü negatif olarak değerlendirilen kateterize (mesane) idrarda sırasıyla yüksek verimli DNA dizileme ve gelişmiş idrar kültürü teknikleri, bakteriyel DNA'yı ve canlı bakterileri ortaya çıkarmaktadır (Coorevits *et al.*

2017). *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Gardnerella*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus* alt üriner sistem (AÜSS) semptomları yaşamayan kadınların ürobiyomlarında sıklıkla bulunur (Brubaker and Wolfe 2017).

Geçmişte üriner sistemde *E. coli* varlığının enfeksiyon ve semptomlara yol açacağına inanılmaktaydı ancak ürobiyom ve *E. coli*'nin asemptomatik bireylerden izolasyonu bu inançla çelişmektedir (Price *et al.* 2020). Ayrıca, mesanenin doğal mikrobiyotasının gastrointestinal sisteminkinden farklı olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak bir İYE'ye her zaman üropatojen tarafından üriner sistemin invazyonu neden olmayabilir, idrar da neden olabilir.

Bu çalışmada doğurganlık problemi olan olan erkek İYE hastaları için *E. coli* risk faktörlerini belirleme amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 İYE Patogenezi

Çevredeki vajina ve perineden gelen bakteriler idrar yoluna girdiklerinde İYE'ye neden olmaktadır. Üretral açıklık, üriner sistemi enfeksiyona duyarlı hale getiren tipik olarak yüksek düzeyde bakteri popülasyonuna sahip olan bölgelerdir (Klein and Hultgren 2020).

Sıklıkla İYE'ye neden olan mikroorganizmalar vajinal veya enterik flora sakinleridir. Sağlıklı kadın ve kız çocuklarında İYE enfeksiyonlarının neredeyse %80'ine *E. coli* neden olmaktadır (Harshitha and Sreenath 2022).

2.2 Üropatojenik *Escherichia Coli* (UPEC)

Tipik insan bağırsak florasının önemli bir parçası olan *E. coli*, yenidoğanların doğumdan sonraki saatleri içinde kolonize olmaktadır. Bazı *E. coli* izolatları ekstra bağırsak hastalıklarına da neden olabildiğinden ExPEC olarak da bilinmektedir (AlSalim and Hassen 2023).

Biyolojik Patojenite Adalarının (PAI) varlığının ve adezinler, toksinler, yüzey polisakkaritleri, flagella ve demir alımı gibi virülans faktörlerinin üretiminin bir sonucu olarak dört temel UPEC filoloji grubu (A, B1, B2 ve D) tanımlanmıştır (Karczewska *et al.* 2023). Bu virülans nedenlerinin çoğu, UPEC'in İYE'den kaynaklanması için genellikle gereklidir (O'Boyle *et al.* 2023).

İYE'lerde UPEC patofizyolojisi şunları içermektedir:

(a) Per üretral ve vajinal bölgelerden kolonizasyon ile üretradan UPEC kolonizasyonu.

(b) Mesane lümenine girerek idrarda planktonik hücrelere dönüşmesi.

(c) Yüzeye yapışma ve mesane membran koruması ile birleşme.

(d) Biyofilm oluşumu.

(e) Saldırı ve mesane oluşturan hücre replikasyonu. Hareketsiz hücre içi rezervuarlar (QIR'ler) ürotelyumun altındaki hücre içi bakteri topluluklarında (IBC'ler) gelişir ve yaşar.

(f) Daha büyük bir bakteriyemi ve septisemi olasılığı, konakçının dokulara zarar vermesi ve böbrek kolonizasyonu ile ilişkilidir (Pokharel *et al.* 2023).

İYE'nin çok yönlü patogenezinde yer alan çok sayıda bakteri unsuru vardır. Virülansla ilgili olabilecek 131 UPEC'e özgü gen keşfedilmiştir (Subashchandrabose and Mobley 2017). *E. coli,* ipliklere benzeyen yapılar olan flagella sayesinde hareket edebilir, TLR5'e bağlandığı keşfedilmiştir (Al-Hemedawi 2020).

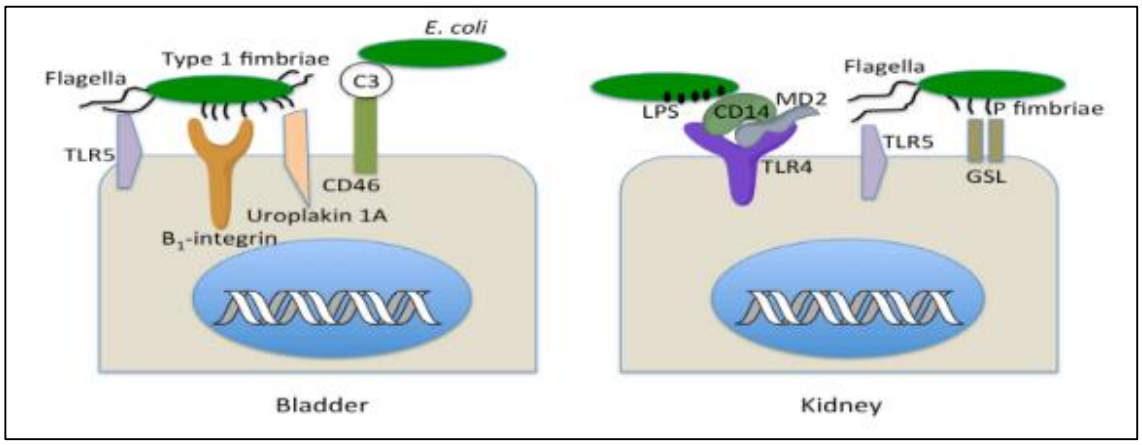
Enfeksiyonla sonuçlanan çeşitli eylemler zincirindeki ilk aşama, UPEC'in idrarla yıkanmasını önlemek için alması gereken adezyondur, tip-1 fimbria olarak bilinen adezyon faktörleri kapsamlı bir çalışmadan geçmiştir ve UPEC için gereklidir (Yao *et al.* 2022). Uçlarında, çokluk hücresi aracılığıyla etkileşimden sorumlu olan bir *FimH* proteini bulunur (Tamadonfar *et al.* 2023).

En önemlisi mesane şemsiye hücrelerini kaplayan üroplakin IA olan bir dizi üroepitelyal hücre yapısına bağlanır. Aynı zamanda integrine bağlanır, bu da hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine ve bakteriyel içselleştirmeye neden olur (Prajapati 2018, Coureuil *et al.* 2019).

P fimbria gibi diğer fimbrialaların böbrek epitel hücreleri üzerindeki glikosfingolipidlere bağlanması ve böbrek enfeksiyonu ile ilişkili olması merak uyandırıcıdır, üst üriner sistemin kolonizasyonu virülans faktörleri arasında faz değişimi olarak bilinen yakından kontrollü bir etkileşimi gerektirir (El-Baz *et al.* 2022).

Bakteriler böbreklere doğru yükseldiğinde, kamçı aktive olur, P fimbrialaı böbrek epitel hücrelerine yapıştığında ve T1F böbrek tübülü için gerekli olan inter-bakteriyel

için sorumlu olduğunda, P ve T1F arasındaki karmaşık etkileşimler tübüler tıkanmaya neden olur. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi tip P fimbriaların böbrek epitel hücrelerine yapışmasını önlemek için devre dışı bırakılır (De Gaetano *et al.* 2023).



Şekil 2.1 Renal epitel hücrelerine (sağda) ve idrar kesesi hücrelerine (solda) üropatojenik *E. coli* yapışması (De Gaetano *et al.* 2023)

Mikroplar TLR5, T1F'nin üroplakin 1A veya 1-integrin'e bağlanması yoluyla yüzeysel mesane hücresi ile de etkileşime girebilen kamçıları sayesinde hareket eder, daha fazla yapışma sağlar ve hücreye içselleşmeyi teşvik eder (Narawad 2020). Bir enfeksiyon meydana geldiğinde kompleman salınır, TLR4 ve TLR5 onun bakterilere doğru bağlanmasına yardımcı olur, ardından CD46 aracılığıyla mesane ile iletişimi geliştirir, bu da bakteri istilasını daha da artırır (Prajapati 2018).

Bakteriler yapıştıktan sonra yeni ortamda hayatta kalmak için yöntemlere ihtiyaç duyarlar. İdrar yolunun düşük demirli bir ortam olduğu ve demirin UPEC'in hayatta kalması için gerekli bir besin olduğu düşünüldüğünde demiri toplamak için çeşitli yolları vardır. Demiri yakalayan genler UPEC'lerin sitotoksik proteinler oluşturması ve konakçı dokuya girmesi için gerekli olan UPEC (Çizelge 2.1) genomunun büyük bir bölümünü oluşturur (Shea *et al.* 2022).

İdrar yolu enfeksiyonlarına neden olan *E. coli* tarafından yaygın şekilde eksprese edilen virülans ajanı olarak karakterize edilen alfahemolizin buna bir örnektir (Orole *et al.* 2022).

Alfa hemolizin, pro-enflamatuar sitokinler IL-6 ve IL-8'i aktive eden hücre içi kalsiyum salınımlarına neden olur ve mesanede, bakteriler böbrek epitel hücrelerine yapıştığında, akut piyelonefritin ilk aşamalarında üroepitelden sıyrılma ve mesane kanaması başlar (Dakheel and Saadoon 2022). Akut piyelonefritin ilk aşamalarında bakteriler böbrek epitel hücrelerine yapıştığında, alfa hemolizin, proinflamatuar sitokinler IL-6 ve IL-8'i aktive eden hücre içi kalsiyum salınımlarına neden olur. Mesanede üroepitelyumdan ayrılma ve mesane kanaması da bu süre içinde başlar (Dakheel and Saadoon 2022).

Sitotoksik nekrotizan faktör 1 (CNF1), hücre iskeleti yapısını değiştiren ek bir virülans bileşenidir. GTPaz aktive edici toksinlerin Rho ailesinin üyesi olan alfa-hemolizin ve CNF1 sıklıkla doğal olarak bağlantılıdır (Russell *et al.* 2018).

Üroepitelyal hücrelerde inflamatuar yanıta ve apoptoza neden olabilir; bununla birlikte, hayvan araştırmaları, in vivo fonksiyonla ilgili birkaç çalışma grubundan bu yana farklı sonuçlar vermiştir. Bakteriler kendilerini bağışıklık savunma mekanizmalarından korumak için biyofilmler de geliştirebilirler. Selüloz ve kıvrımlı fimbrialar, biyofilm oluşumu için temel yapı taşlarıdır (Akiyama *et al.* 2020).

Çizelge 2.1 Çeşitli yaygın UPEC virülans faktörleri ve ana rolleri

Flagella	**Ana fonksiyon**
Tip 1 fimbria	İdrar yollarında *E. coli'nin* yükselmesi
P fimbriae	Mesane epitel hücrelerine yapışma,
Dr fimbriae FIC fimbriae	Bakteriler arası yapışma
Sitotoksik Nekrotizan Faktör I	Böbrek epitel hücrelerine yapışma
Hemolizin	Hücre istilası
Salgılanan ototransporter toksin	Bilinmiyor
LPS	Konak hücrelerin adezyonu, invazyonu, apoptozisi
Curli fimbria	İstila, doku hasarı
Selüloz	Doku hasarı
Demir ve çinko kazanımı (birkaç)	Bağışıklık tepkisi aktivatörü
Kapsül	Adezyon, biyofilm oluşumu, invazyon

Ayrıca bakterilerin yüzeylerinde, konakçı hücrelerin tanıyabileceği ve uygun şekilde tepki verebileceği patojenle ilişkili moleküler dekorasyonlar (PAMP'ler) adı verilen özellikler bulunur (Tiku and Tan 2021).

Tipik olarak dış zarda bulunan bir gram-negatif PAMP olan lipopolisakarit (LPS), İYE gelişimindeki potansiyel rolü nedeniyle tartışılmaktadır. LPS'ye hızlı tepki veren miyeloid hücrelerin aksine, üroepitelyal hücreler yavaş tepki gösterir. Bu durumun bir faktörü, tüm idrar yollarının epitelinden alınan biyopsilerde gözlenen TLR4 ile kompleks hâlinde önemli bir LPS reseptörü olan membranla ilişkili CD14'ün eksikliğidir (Hertting 2011, Qin *et al.* 2022).

UPEC'den gelen virülans faktörleri bir bütün olarak ele alındığında çok sayıda ve karmaşıktır ve virülans faktörü genlerinin varlığı veya yokluğunun özel bir kombinasyonu, tekrarlayan İYE'lerin bir göstergesi olarak kullanılamaz; bununla birlikte, tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonlarına neden olan *E. coli*, ara sıra idrar yolu enfeksiyonlarına neden olan *E. coli*'ye göre daha fazla virülans faktörü genine sahip görünmektedir (Brons *et al.* 2020).

2.3 Antibiyotikler ve UPEC'ler

Semptomatik İYE'lerin tedavisi için antibiyotiklerin önerilmesiyle (Bartoletti *et al.* 2016) birlikte Avrupa Üroloji Derneği tarafından fosfomisin, trometamol, pivmesilin, nitrofurantoin ve trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ) önerilmiştir.

Florokinolonlar, uygun olumsuz yan etkileri nedeniyle birinci basamak antibiyotik olarak önerilmemektedir. Florokinolonlar böbreğe girebilir ve gastrointestinal sistem tarafından kolayca emilir, oral florokinolonlar yalnızca akut piyelonefrit ve karmaşık İYE'leri tedavi etmek için kullanılmalıdır (Ong 2020). Ancak, son zamanlarda daha hafif İYE'leri tedavi etmede florokinolonlar kullanılmaktadır (Cai *et al.* 2020).

Tekrarlayan İYE'lerde, her ay beş gün süreyle 'güçlendirici' antibiyotik verilmesi yoluyla profilaktik bir program sıklıkla uygulanmakta ancak tutarsız sonuçlar alınmaktadır (Bartoletti *et al.* 2016).

IBC’ler veya QIR’ler, UPEC’ler gibi farklı koşullar bir üriner sistemde varlığını sürdürür ve bunların canlı yüzeylerde biyofilm oluşturma kapasiteleri, antibiyotik tedavilerinden sonra bakterilerin yok edilmesini geciktirebilir (González *et al.* 2019).

Bazı sefalosporinler, amikasin ve siprofloksasin gibi antibiyotiklerin uygun bir in vitro modelde ve insan idrarında bulunan konsantrasyonlarla karşılaştırıldığında, UPEC tarafından üretilen biyofilmi azaltmak için etkili olduğu bulunmuştur. Ancak diğer araştırmacılar UPEC IBC'lerinin birden fazla antibiyotik tedavisi sonrasında bile devam edebileceğini göstermiştir (González *et al.* 2017).

IBC’lerin dinamik rolünü, antibiyotik rejimlerini göz ardı etmek için önemli yankılarla bakteriyel kalıcılık olarak incelemek için, bir insan mesane çipi modeli geliştirilmiştir (Liu *et al.* 2016). Ayrıca, yeni antibiyotiklerin ve yeni antibiyotik kombinasyonlarının birbirleriyle nasıl etkileşime girdiği de araştırılmıştır (Huen *et al.* 2019). Son raporlara göre tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları yaşayan kadınlar, metenamin hippurat ile antibiyotik dışı koruyucu tedaviden fayda görebilir (Harding *et al.* 2022).

Komplike olmayan piyelonefrit ve komplike İYE’lerin her ikisi de yeni antibiyotik ilaç tazobaktam-ceftolozan kullanımından fayda sağlayabilir. Birçok uluslararası standarda göre idrar yolu enfeksiyonlarının önlenmesinde profilaktik antibiyotik kullanımı önemli bir uygulamadır. Ancak, antimikrobiyal direnci azaltmak amacıyla Avrupa yönergeleri, makul antibiyotik reçetelerini teşvik etmektedir (Arakawa *et al.* 2019).

UPEC suşları arasındaki çoklu ilaç direnci küresel olarak yayıldıkça antimikrobiyal tedavi daha da zorlaşmaktadır (Kot 2019). Florokinolon direnci, özellikle siprofloksasin gibi bu ilaçların İYE’li ayaktan hastalarda yaygın olarak kullanılmasının bir sonucudur. (Kot 2019). Birçok ülke, trimetoprim-sülfametoksazol direncinde bir artış belgelemiştir, bu genellikle basit İYE’lerin tedavisinde birincil antibiyotik olarak kullanılır (Hrbacek *et al.* 2020, Stapleton *et al.*2020).

Yakın tarihli bir çalışma, UspA bakteriyel stres proteini inhibitörlerinin yararlılığını doğrulamış ve bunların çoklu ilaca dirençli üropatojenik *E. coli*'yi tedavi etmek için alternatif terapiler olarak kullanılabileceğini öne sürmüştür (Bandyopadhyay and Mukherjee 2022).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Aletler, Ekipmanlar, Biyolojik Malzemeler ve Kimyasallar

Bu araştırma için kullanılan laboratuvar cihazları, araçları, biyolojik bileşenleri ve kimyasalları aşağıda listelenmiştir (Çizelge 3.1-3.3).

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan araç ve gereçler

Ekipman ve aletler	**Şirket/Ülke**
Santrifüj	(DLAB/Chain)
Hassas denge	(Sartorius/Almanya)
Elektroforezler	(Clarivate/İngiltere)
Dolap davlumbazı	(BioLAB/ Kore)
Su Distilatörü	(GFL/Almanya) (Eppendroff Almanya)
Mikropipetler (Farklı boyutlarda)	(Al Balsan/Türkiye)
Buzdolabı	(Jippo/Japonya) (Sigma-Aldrich (ABD)
Uçlar (Farklı boyutlarda)	(Vilber Lourmat Ste/Fransa)
1,5 ml Eppendorf tüpleri	(Fisher Scientific/ ABD)
UV geçirgenliği	(Zxinstrument Chain) (Biorad ABD)
Girdap	Şirket/Ülke
Termostatik İnkübatör	(DLAB/Chain)
Güç Kaynağı	Beslenme
Uygulamalı Biyosistemler ProFler PCR Sistemi	Fagositoza karşı direnç

Çizelge 3.2 Biyolojik ve kimyasal malzemeler

Biyolojik malzemeler ve kimyasallar	**Şirket/ ülke**
Kovac reaktifi	(Flaka chemika/İsviçre)
Pepton broth ortamı	Direk/İngiltere
Mutlak etanol (%99), Mathyl Rad Reaktifi	(HDH İngiltere)
Voges-Proskauer Agaroz ve Agaroz	[Carl Roth/Almanya)
Kırmızı güvenli boyama ruhu	
TAE tamponu 10 X	
FavorPrep Genomik DNA Ekstraksiyon Mini Kiti	(Kore)
Master Miz veya GoTaq Green Master Karışımı	(Promega (ABD)
Astar	(Macrogen/Kore)
Ladder 100 bp	(Canvas İspanya)

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan besiyerleri

Besiyeri ismi	**Şirket**
Kanlı agar	TMMEDIA / India
Macconkey agar	TMMEDIA / India
Eozin metilen mavisi agar (EMB)	TMMEDIA / India

3.2 Hastalar ve Örnek Toplama

Bu çalışmada, AL-Anbar Vilayeti'nde 120 adet idrar yolu enfeksiyonu geçiren erkekten alınan idrar ve sperm örnekleri ile fertilite bakteri kültürü, duyarlılık testleri ve ardından moleküler incelemeleri yapılmıştır.

3.3 *E. coli*'nin Teşhisi

E. coli izolatlarının laboratuvar tanımlaması kanlı agar, EMB agar, Macconkey agar, İndol, Metil kırmızısı, Voges-Proskauer ve Sitrat kullanım testleri dahil olmak üzere mikrobiyolojik ve biyokimyasal yöntemlerle gerçekleştirildi. İzolatların farklı antibiyotiklere duyarlılıkları (bioMérieux, Fransa) Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tavsiyelerine göre Vitek II sistemi ile belirlendi (Kahlmeter *et al.* 2019).

3.4 Antibiyotik Duyarlılık Testi

Üretici firmaya (bioMérieux, Fransa) göre bu teknoloji, bakterilerin kanlı agar plakalarına aşılanması ve ardından (37°C'de 24 saat) inkübe edilmesiyle kullanılmıştır. Söz konusu üremeden 1-3 koloninin (3 ml) normal salin içeren test tüplerine aktarılmasıyla bir bakteri süspansiyonu oluşturulmuş ve süspansiyonun bulanıklığı daha sonra (0,5) McFarland standardına göre düzeltilmiştir (Fritsche *et al.* 2011). Ek (1)'e bakınız.

3.5 Biyokimyasal Tanımlama

3.5.1 Oksidaz testi

Oksidaz enziminin oluşumunu göstermek için 24 saat boyunca nutrisyonel agar ara ürününde tomurcuklanan bir koloni, sterilize edilmiş edilmiş kağıda çubuklar

kullanılarak taşınmıştır. Daha sonra koloniye bir damla oksidaz reaktifi uygulandığında, boya 30 saniye ila bir dakika içinde mora dönüşmüştür (Hemraj *et al.* 2013).

3.5.2 Katalaz testi

Tahta çubuklar kullanılarak, 24 saat boyunca besleyici agar ortamında büyütülen bir koloni temiz, kuru bir cam lam üzerine taşındı ve burada bir damla %3'lük katalaz reaktifi uygulandı. Cam lamın dış yüzeyinde kabarcık oluşumu, katalaz enziminin üretildiğini kanıtlamaktadır (Hemraj *et al.* 2013).

3.5.3 IMVIC testleri

(I) Indol test

Bu testin yapılabilmesi için bakteri kolonileri peptonlu su ortamı kullanılarak test tüplerine konulmuştur. Test tüpleri daha sonra 24 saat 37ºC'de inkübe edildikten sonra 1-2 damla Kovacs reaktifi verildi. Medyanın yüzeyinde görünen kırmızı bir halka, başarılı bir test anlamına gelir (Hemraj *et al.* 2013).

(II) Metil kırmızısı testi

Bu, asitliği niteliksel düzeyde değerlendirir. Aşı olarak seçilen bakteri kolonileri ile 24 saat boyunca 37°C'de kültürlendikten sonra (MR-VP suyu) tüplerine metil kırmızısı reaktif maddesi (5 damla) eklendi. Pozitif kırmızı ton test sonucunu gösterirken sarı veya turuncu renk negatif sonucu gösterir. Yetiştirilmiş MR-VP sıvı besiyeri, beş pH seviyesi gerektiren tam glikoz fermantasyonu için doğrulandı (Hemraj *et al.* 2013).

(III) Voges –Proskauer testi

Bu inceleme, glikozu fermente edebilen ve asetoini oluşturabilen bakterilerin varlığını araştırmaktadır. MR-VP brot tüpleri, test edilen bakteri kültürü ile inoküle edildi ve

37°C'de 24 saat inkübe edildi, ardından bir absolut etanol içinde çözünmüş naftol olan 0,6 ml VP1 reaktifi eklenerek sonuç okundu ve 0,2 mL VP2 reaktifi (damıtılmış suda çözünmüş KOH; asetoin veya asetil Metil-Karbinol üreten glikozun kısmi analizi nedeniyle 15 dakika sonra kırmızı renk görünümü) eklendi (Hemraj *et al.* 2013).

(IV) Sitrat kullanım testi

Bu testin amacı, bakteriyel izolatların tek karbon ve enerji kaynağı olarak sitrat kullanıp kullanamayacaklarını ve nitrojen kaynağı olarak amonyum tuzlarını kullanıp kullanamayacaklarını belirlemekti. Koloni, bir petri kabına yerleştirildi ve daha sonra 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Bakteri üremesinin görülmesi ve besiyerinin renginin yeşilden maviye kayması deneyin başarılı olduğunu, besiyerinin renginin yeşil kalması olumsuz sonucu göstermektedir (Hemraj *et al.* 2013).

3.6 Biyofilm Oluşumunun Tespiti

Biyofilmin kantitatif tespiti, bazı modifikasyonlarla uyumlu olarak Doku Kültürü Plakası (TCP) yöntemiyle (mikrotitre plakası testi olarak da adlandırılır) belirlenmiştir (Fusco *et al.* 2017, O'Toole 2011, Tang *et al.* 2011). Bu metodoloji, biyofilm oluşumunu tespit etmek için altın standart test olduğu için seçilmiştir (Costa *et al.* 2018) ve protokol aşağıdaki gibidir:

3.6.1 Biyofilm büyütme

I. Agar plakalarından alınan üç-beş yeni kültürlenmiş izolat, %1 glikoz içeren 10 mL triptikaz soya suyu (TSB) içinde aşılandı ve 0.5 McFarland ölçeği ile karşılaştırıldı. Aşılanan sıvı besiyeri daha sonra inkübatörde 37°C'de 18 saat tutuldu.

II. Gece boyunca inkübe edilen bakteri süspansiyonu daha sonra 9900 µL TSB'ye 100 µL bakteri süspansiyonu eklenerek taze TSB ortamı ile 1:100 oranında seyreltildi.

III. Steril bir polistiren doku kültürü plakasının ayrı oyukları, seyreltilmiş hazırlanmış bakteri süspansiyonunun 200 µL'si ile doldurulduu. Ek olarak, sterilliği sağlamak ve

spesifik olmayan bağlanmayı belirlemek için negatif kontrol olarak sadece steril brot kullanıldı. Her izolat, üç kopya halinde aşılandı.

IV. Mikrotitre plakaları 24 saat 37°C'de inkübe edildi.

3.6.2 Biyofilm boyama

I. İnkübasyonun ardından, her kuyucuğun içeriğini çıkarmak için plakalara hafifçe vuruldu, çukurlar iki kez 200 µL fosfat tamponlu salin (PBS) (pH 7.2) ile durulandı.

II. Yapışkan 'sapsız' bakteriler bir inkübatörde 37°C'de 30 dakika süreyle bir plaka üzerinde tutularak, biyofilmler yaratıldı.

III. Kuyucuklar daha sonra 200 µL %1 kristal menekşe solüsyonu ile 45 dakika boyunca lekelendi. Kalan boyayı çıkarmak için steril damıtılmış su ile üçüncü bir yıkamanın ardından mikrolitre plakalar, oda sıcaklığında 45 dakika kurutuldu.

3.6.3 Biyofilmin ölçülmesi

I. Ekli biyofilm ile ilişkili boya, 200 µL etanol çözeltisi içinde çözüldü.

II. 15-20 dakikalık etanol ilavesinden sonra, boyanmış bakteriyel biyofilmlerin optik yoğunlukları (OD), bir mikro-ELISA okuyucu (630 nm'de) kullanılarak belirlendi. Hesaplanan OD değerlerine dayalı olarak, biyofilm üretimi güçlü, orta veya zayıf/olmayan olarak derecelendirildi (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 TCP yöntemine göre bakteri yapışması ve biyofilm oluşumunun sınıflandırılması (Iyamba *et al.* 2022)

Ortalama OD değerleri	**Bağlılık**	**Biyofilm oluşumu**
<0.120	Yok	Yok/Zayıf
0.120-0.240	Orta derecede	Orta düzeyde
>0.240	Güçlü	Yüksek

3.7 Moleküler Biyoloji Çalışmaları:

3.7.1 DNA ekstraksiyonu

Kit içeriği (Cat. No: FABGK 100) aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Kit içeriği

RBC Lizis Tamponu	135 mL
FATG Tamponu	30 mL
FABG Tamponu	40 mL
W1 Tampon	45 mL
Yıkama Tamponu (konsantre)	25 mL
Elüsyon Tamponu	30 mL
FABG Mini Sütun	100 pcs
Toplama Tüpü	200 pcs
Kullanıcı Kılavuzu	1

1. Numuneye 200µL FATG tamponu eklendi ve vortekslenerek karıştırıldı.
2. Numuneye 200µL FABG Buffer eklendi ve 5 saniye vortekslenerek iyice karıştırıldı.
3. Örneği parçalamak için 70 ºC'de 10 dakika inkübe edildi.
4. Numuneye 200µL etanol (%96~100) eklendi ve 10 saniye vortekslendi.
5. Bir FABG kolonu toplama tüpüne yerleştirildi. 14.000 rpm hızında 1 dakika santrifüj edildi.
6. FABG kolonuna 400µL W1 Buffer eklendi ve 14.000 rpm hızında 30 saniye santrifüjlendi.
7. FABG kolonuna 600µL yıkama tamponu eklendi ve 14.000 rpm hızında 30 saniye santrifüjlendi.
8. Kolonu kurutmak için 14.000 rpm hızında 3 dakika daha santrifüjlendi.
9. Kuru FABG kolonunu yeni bir 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
10. FABG kolonunun membran merkezine 100µL ön ısıtmalı elüsyon tamponu veya TE eklendi.
11. FAGB kolonunu bir inkübatörde 37 ºC'de 10 dakika inkübe edildi.
12. DNA'yı ayrıştırmak için 14.000 rpm tam hızda 1 dakika santrifüjlendi DNA fragmanını 4ºC veya -20ºC'de saklandı.

3.7.2 DNA konsantrasyonu ve saflığının tahmini

DNA konsantrasyonunu test etmek için Nano damla cihazı kullanıldı. Her DNA örneği bir mikrolitreye seyreltildi ve saflık, örneklerin 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbansı karşılaştırılarak belirlendi.

3.7.3 DNA kalitesini analiz etmek için jel elektroforezi

1. Agaroz solüsyonu yapmak için 1 gr agaroz 100 mL TAE (1x) içinde eritildi. Ardından agaroz, çözelti berraklaşana kadar sıcak bir blok içinde eritildi.
2. Agaroz çözeltisini 50°C ila 55°C arasında soğutuldu.
3. Döküm tepsisinin uçlarını kapatmak için iki kat bant kullanılmadan önce sıcak jele kırmızı boya (3µL) eklendi.
4. Taraklar jel döküm tepsisine yerleştirildi.
5. Erimiş agaroz solüsyonu döküm tepsisine döküldü.
6. Tarak dikkatlice dışarı çekildi, bant çıkarıldı ve agaroz ortam sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı. TAE (1x) tamponla dolduruldu elektroforez odası jel ile kaplandı.
7. DNA numuneleri (5µL), DNA yükleme tamponu (3µL) ile birleştirildi ve agaroz jel yuvalarına yüklendi.
8. Agaroz jel elektroforezi 60 dakika gerçekleştirildi. 70 V, 65 Amperde. DNA, bir UV-trans aydınlatıcı altında görüldü.

3.7.4 Primerlerin hazırlanması

Liyofilize halde gelen primerler steril ddH_20 içinde çözülerek final konsantrasyonu 100 pmol/ul olacak şekilde bir ana stok hazırlandı (Çizelge 3.6). Daha sonra, 10 pmol/ µL'lik ara stoklar hazırlandı ve -20°C'de saklandı.

Çizelge 3.6 Bu çalışmada kullanılan primer dizileri

Virülans faktör	Primer	Sekans	Primer sekans 5′- -3′	Ürün boyutu (bç)	Kay.
Tip 1 fimbria	*FimH*	F	GAGAAGAGGTTTGATTTAACTTATTG	559	Raeispour and Ranjbar 2018
		R	AGAGCCGCTGTAGAACTGAGG		
aerobakin	*Aer*	F	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602	
		R	AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG		
Afa adhezin	*Afa*	F	CGGCTTTTCTGCTGAACTGGCAGGC	672	Dadi *et al.* 2020
		R	CCGTCAGCCCCCACGGCAGACC		
Hemolizin	*HlyA*	F	AGATTCTTGGGCATGTATCCT	554	
		R	TTGCTTTGCAGACTGTAGTGT		

3.7.5 Genlerin tespiti

Mevcut çalışma, PCR kullanılarak tespit genlerini içermektedir. Reaksiyon karışımı çizelge 3.7'da listelenmiştir. Ayrıca *HlyA, afa, fimH* ve *Aer* genlerinin tespiti için PCR programı aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.8-3.10).

Çizelge 3.7 Genlerin reaksiyon bileşenleri

Bileşen	25µL (Final hacmi)
Master mix	12.5µL
İleri primer	10 pikomols/µl 1 µL)
Geri primer	10 pikomols/µl (1 µL)
DNA	1.5µL
Steril su	9µL

Çizelge 3.8 *HlyA* ve *afa* genlerinin tespiti için PCR programı

Faz	**Tm (°C)**	**Zaman**	**Döngü sayısı**
Başlangıç Denatürasyon	94°C	5 dk	1 döngü
Denatürasyon -2	94°C	2 dk	35 döngü
Bağlanma	65°C	30 sn	
Uzaman-1	72°C	1 dk	
Uzaman -2	72°C	5 dk	1 döngü

Çizelge 3.9 *fimH* geninin tespiti için PCR programı

Faz	**Tm (°C)**	**Zaman**	**Döngü sayısı**
Başlangıç Denatürasyon	94°C	5 dk	1 döngü
Denatürasyon -2	94°C	1 dk	

Bağlanma	60°C	1 dk	30 döngü
Uzaman-1	72°C	1 dk	
Uzaman -2	72°C	8 dk	1 döngü

Çizelge 3.10 *Aer* geninin tespiti için PCR programı

Faz	**Tm (°C)**	**Zaman**	**Döngü sayısı**
Başlangıç Denatürasyon	94°C	5 dk	1 döngü
Denatürasyon -2	94°C	1 dk	30 döngü
Bağlanma	62°C	1 dk	
Uzaman-1	72°C	1 dk	
Uzaman -2	72°C	8 dk	1 döngü

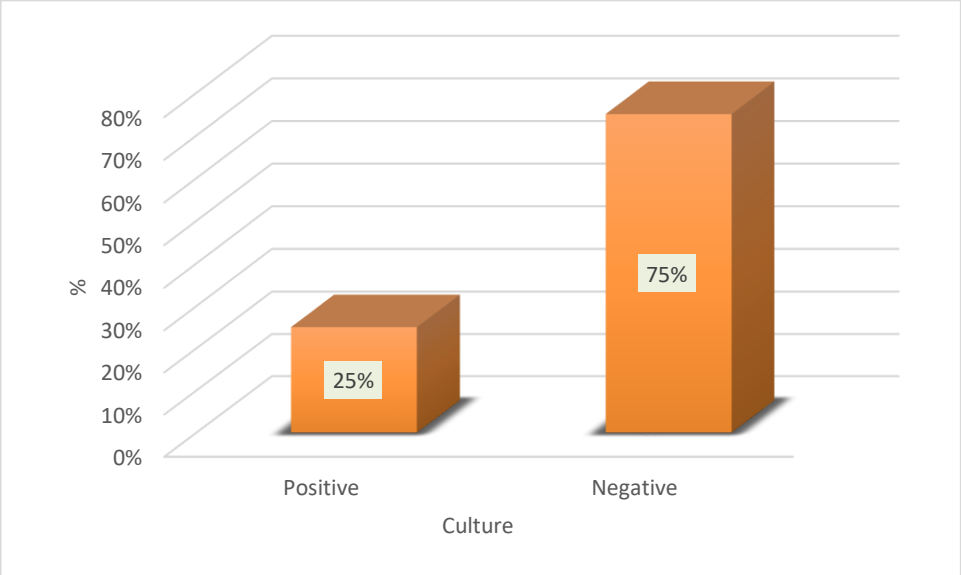
3.8 İstatiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS programı kullanılmıştır (Stehlik-Barry and Babinec 2017).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Kültür Sonuçları

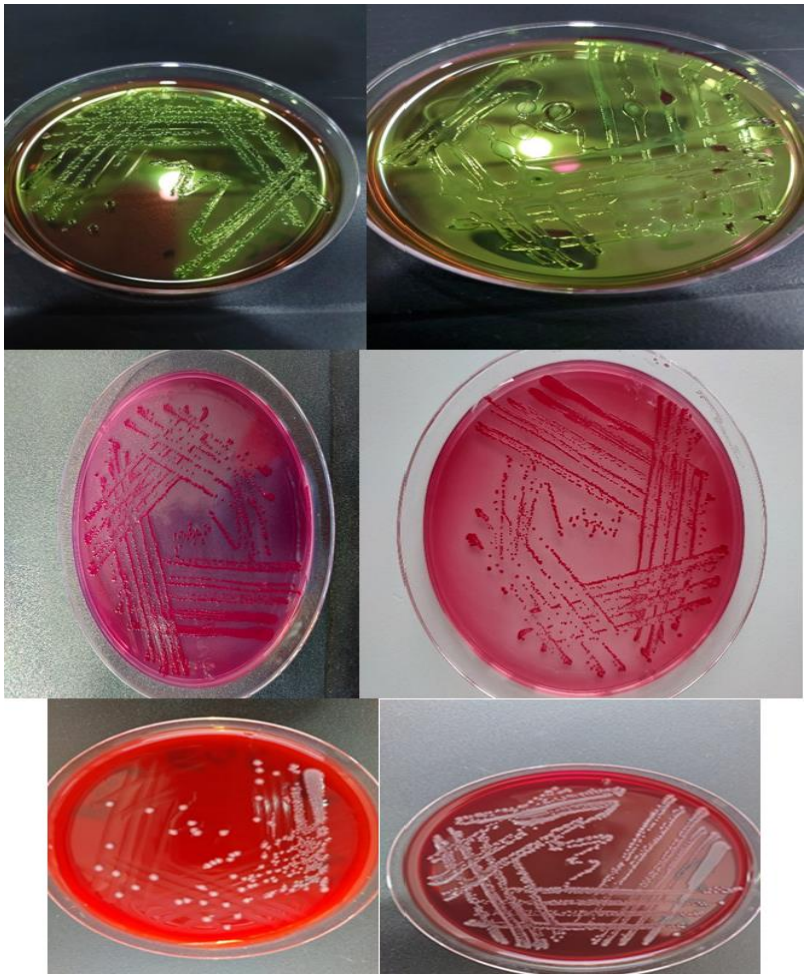
Anbar vilayetinde üriner sistem enfeksiyonu ve fertilite problemi olan erkeklerden toplam 120 örnek alınmıştır. 120 örnekten izole edilen bakteri sayısı ve üreme yüzdesine bakıldığında: 25'i (n=30) *E. coli* olup, bunu %75 (n=90) ile diğer bakteriler izlemiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 UPEC'de ilgili kültür örneklerinin yaygınlığı

4.2 Fenotipik ve Mikroskobik Karakterizasyon

E. coli'nin tanımlanması, EMB agar üzerinde alt kültüre alınan laktoz fermente eden *E. coli* izolatlarıyla gerçekleştirilmiştir. Pozitif koloniler, koyu bir merkeze sahip yeşil metalik parlaklık şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.2). Bu parlaklık, hızlı laktoz fermantasyonu sonucunda oluşur. Bakteri kolonileri, asit üretimiyle ortamın pH'ını düşürerek Eosin Metilen Mavisi boyasının emilimini teşvik eder ve bu da yeşil metalik parlaklık oluşumuna yol açar (Bachoon and Wendy 2008).



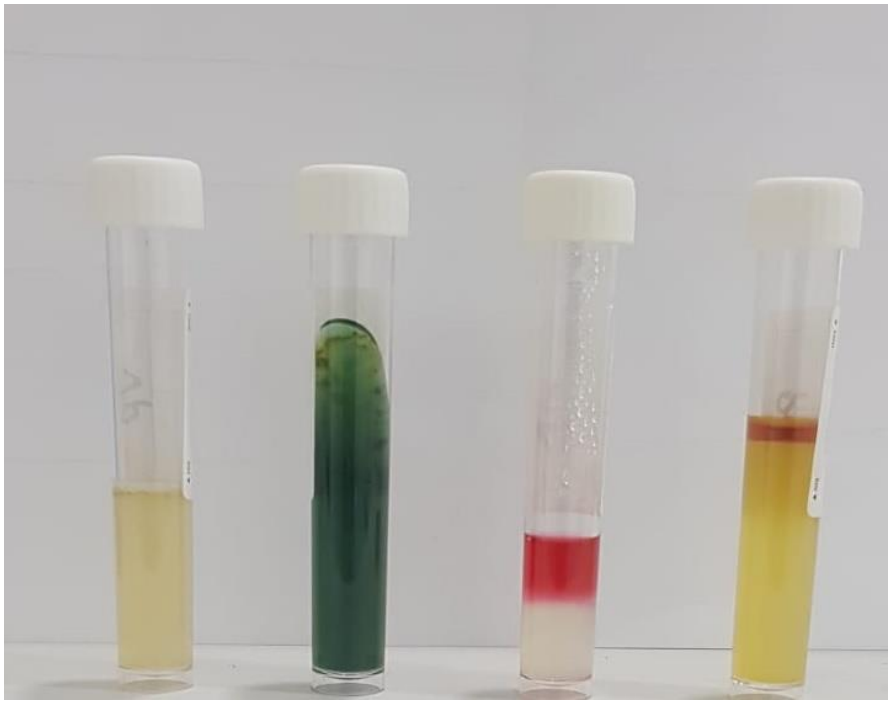
Şekil 4.2 EMB, MacConkey agar ve kanlı agarda üreyen *E. coli* kolonileri

4.3 Biyokimyasal Tanımlama

E. coli'yi karakterize etmek için çeşitli biyokimyasal testler yapılmıştır. biyokimyasal testlerin sonuçları Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3'te özetlenmiştir, ayrıca Vitek II sistemi ile ilgili veriler Ek 3'te verilmiştir. Biyokimyasal özelliklere göre *E. coli* izolatlarının tamamı (30) metil kırmızısı testine pozitiftir. Ayrıca tüm *E. coli* izolatları indol testine karşı pozitif olarak değerlendirildi. Bu, Kovacs reaktifi damlalarının eklenmesiyle peptonlu su medyanın yüzeyinde kırmızıdan pembeye bir halkanın oluşmasından kaynaklanır. Bu halka, bu bakterilerin triptofanı indole dönüştüren triptofanaz enzimini üretme yeteneğini ifade eder. Bu nedenle, *E. coli* kültürel özelliklerin ve biyokimyasal reaksiyonların tanımlayıcı özelliği olarak kabul edilir. Bu sonuçlar, Kavitha ve Devasena (2013)'nın çalışmasıyla da uyumludur.

Çizelge 4.1 *E. coli* karakterizasyonu için biyokimyasal testler

	Biyokimyasal testler					
	Katalaz	**Oksidaz**	**İndol**	**Metil kırmızı**	**Vp**	**Csitrat**
E. coli	+	-	+	+	-	-
(*) pozitif sonuç, (-) negatif sonuç. (VP) Voges -Proskauer testi.						



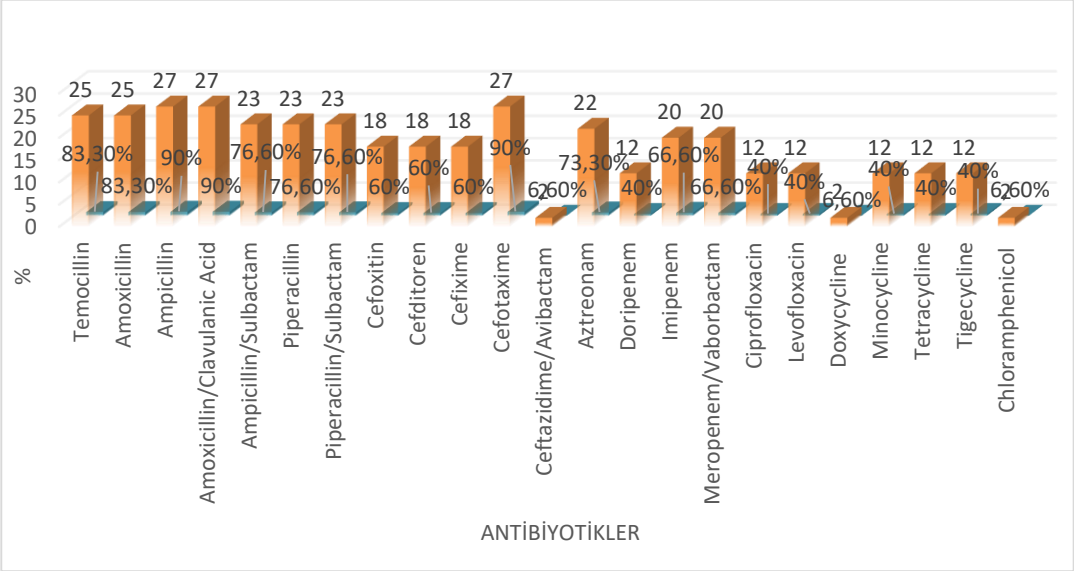
Şekil 4.3 (A): *E. coli*'nin negatif vp testi; (B) negatif sitrat testi (yeşil renk görünümü) (C) pozitif metil kırmızısı testi (kırmızı renk görünümü) (D); pozitif Indol testi (kırmızı halka renginin görünümü)

4.4 *Escherichia coli* Antibiyotik Duyarlılığının Vitek II Sistemi İle Tespiti

Klinik izolatlar, incelenen izolatların antibiyogramlarına göre, test edilen antibiyotiklerin çoğuna karşı değişen derecelerde direnç göstermiştir. İzolatların 27'sinde (%90) Amoksisilin-Klavulanik Asit, Ampisilin ve Sefotaksim, 25'inde (%83,3) Amoksisilin ve Temosilin, ayrıca 22'sinde (%73,3) Aztreonam, 20'sinde (%66,6) İmipenem ve Meropenem/Vaborbaktam, 18'inde (%60) Sefoksitin ve 23'ünde (%76,6) Ampisilin/Sulbaktam, Piperasilin ve Piperasilin/Sulbaktam bulunduğu tespit edilmiştir. Mevcut araştırma, *E. coli'nin* 18'inin (%60) Levofloksasin, Siprofloksasin, Minosiklin, Tetrasiklin, Doripenem ve Tigesiklin antibiyotiklerine karşı düşük düzeyde bir dirence sahip olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.4).

Çizelge 4.2 *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları

Antbiyotikler	Direnç (No. &%)	Orta duyarlı (No. &%)	Duyarlı (No. &%)
Temocillin	(83.3%)25	(0.00%)	(%16.6)5
Amoksisilin	(83.3%)25	(0.00%)	(%16.6)5
Ampisilin	(90%)27	(0.00%)	(10%)3
Amoksisilin/Klavulanik Asit	(90%)27	(0.00%)	(10%)3
Ampisilin/Sulbaktam	(76.6%)23	(0.00%)	(23.3%)7
Piperasilin	(76.6%)23	(0.00%)	(23.3%)7
Piperasilin/Sulbaktam	(76.6%)23	(0.00%)	(23.3%)7
Cefoxitin	(60%)18	(0.00%)	(40%)12
Cefditoren	(60%)18	(0.00%)	(40%)12
Cefixime	(60%)18	(0.00%)	(40%)12
Sefotaksim	(90%)27	(0.00%)	(10%)3
Seftazidim/Avibaktam	2(6.6%)	(26.6%)8	(% 6.66)20
Aztreonam	(73.3%)22	(0.00%)	(26.6%)8
Doripenem	(40%)12	(0.00%)	(60%)18
İmipenem	(% 6.66)20	(0.00%)	(% 3.33)10
Meropenem/Vaborbaktam	(% 6.66)20	(0.00%)	(% 3.33)10
Siprofloksasin	(40%)12	(0.00%)	(60%)18
Levofloksasin	(40%)12	(0.00%)	(60%)18
Doksisiklin	2(6.6%)	(26.6%)8	(% 6.66)20
Minosiklin	(40%)12	(0.00%)	(60%)18
Tetrasiklin	(40%)12	(0.00%)	(60%)18
Tigesiklin	(40%)12	(0.00%)	(60%)18
Kloramfenikol	2(6.6%)	(23.3%)7	(% 70)21



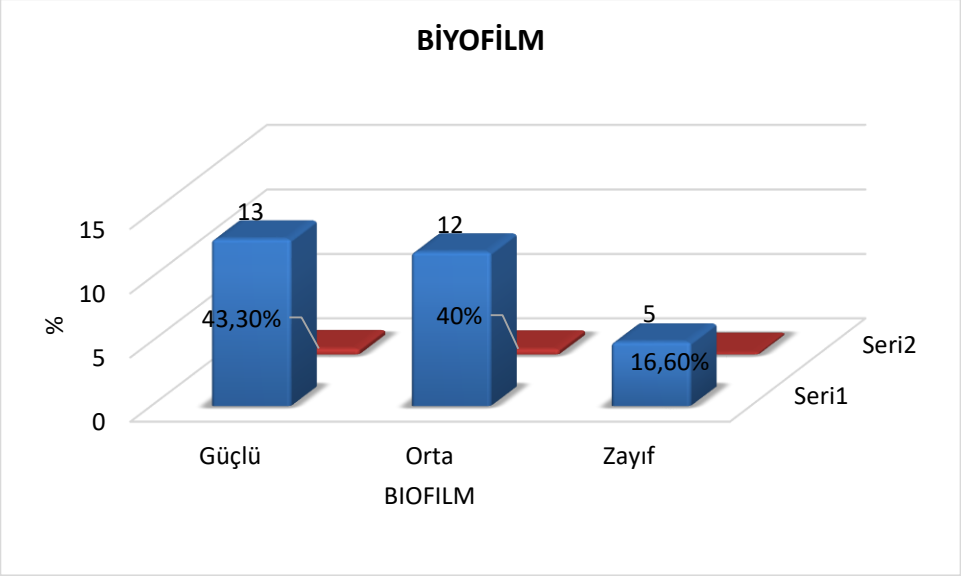
Şekil 4.4 *E. coli* klinik izolatlarının antibiyotik duyarlılık modelleri antibiyotikler

Al-Faham (2016)'nın bulgularına göre, *E. coli'nin* amoksisilin-klavulanik asit ve sefotaksime karşı direnci sırasıyla %92 ve %90,1'e ulaşmıştır. Bu bulgu, aztreonam ve

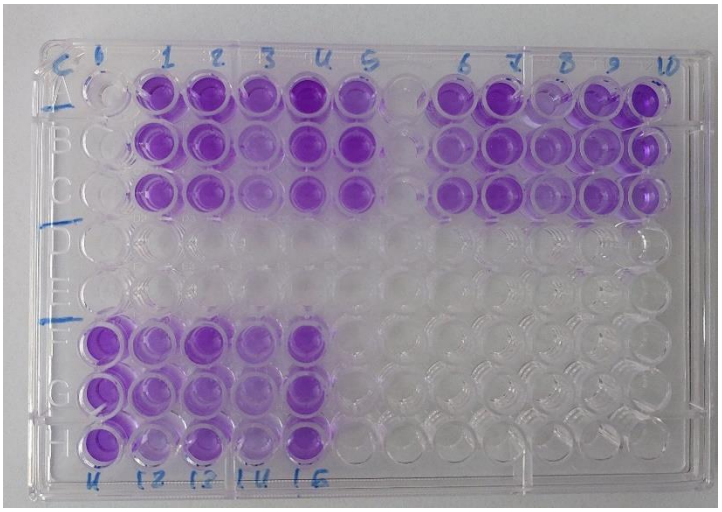
seftazidime karşı yüksek direnç oranı bulan diğer çalışmalarla da uyumlu bir şekildedir. Zykov *et al.* (2016) ve Sasirekha *et al.* (2010)'nın çalışmaları, *E. coli'nin* ampisiline dirençli olduğunu göstermiştir. Yine yapılan çalışmalarla %80, %84,4, %96,42, %100 ve %86,5 gibi benzer direnç oranları bildirilmiştir (Iranpour *et al.* 2015, Habibi and Khameneie 2016, Lee *et al.* 2016, Polse *et al.* 2016, Dadi 2018). İzolatların %82,1'i amoksisilin/klavulanata, %81,3'ü AMC'ye dirençli bulunmuştur (Iranpour *et al.* 2015, Dorsey *et al.* 2018). Impinem, gram negatif bakterilere kıyasla yüksek etkinlik göstermiştir (Tabasi *et al.* 2016, Alam *et al.* 2017).

4.5 Biyofilm Oluşumu

Sonuçlar, biyofilm üretimi için tüm *E. coli* izolatlarının 30'unun (%100) pozitif olduğunu göstermiştir. Doku Kültürü Plakası TCP yönteminin (TCPM) biyofilmleri tespit etmek için en iyi yöntem olduğuna düşünülmektedir. *E. coli*'de 30 izolattan 13'ü (%43,30) güçlü biyofilm oluşturucu ve 12'si (%40) orta düzeyde biyofilm oluşturucu ve 5'i (%16,60) zayıf olduğundan, yüksek biyofilm üretimi göstermiştir. Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.5 *E. coli* tarafından biyofilm oluşumunun yüzdesi



Şekil 4.6 *E. coli* için 96 kuyucuklu mikrotiter plaka yöntemiyle gerçekleştirilen biyofilm oluşumu deneylerinin sonuçları

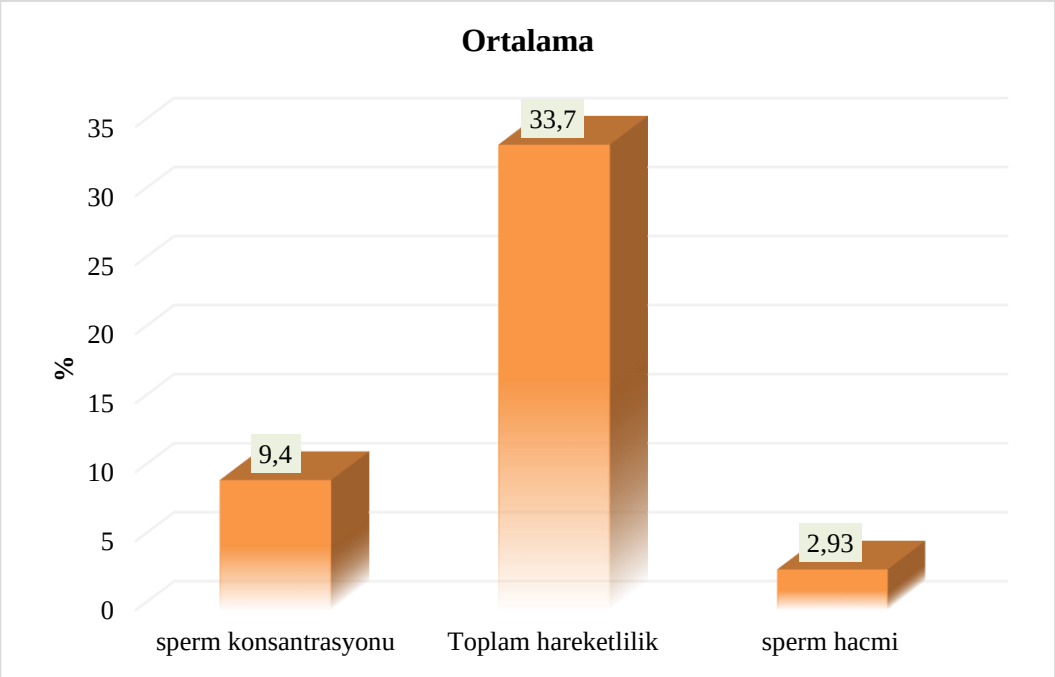
Biyofilm oluşumunun erken dönemlerinde, flagella üretimi baskılanır çünkü yapışık *E. coli* hücreleri yüzeye yapıştıkça sesil hale gelir. Planktonik durumdan sesil duruma geçiş, siklik-diguanilik asit (c-di-GMP) gibi birkaç küçük molekül tarafından kontrol edilir. Hareket halindeyken c-di-GMP konsantrasyonu düşüktür ancak biyofilm oluşumuyla birlikte artar. *E. coli*, büyük ölçüde tip 1 fimbriae ve curli fimbriae gibi yapışma organelleri sayesinde yüzeylere geri dönüşümsüz olarak bağlanır (Sharma *et al.* 2016).

4.6 Sperm Konsantrasyonu, Toplam Hareketlilik ve Sperm Hacmi

Sonuçlar sperm konsantrasyonu, toplam motilite ve sperm hacminde önemli düşüş gösterdi (Çizelge 4.3, Şekil 4.7).

Çizelge 4.3 Sperm konsantrasyonu, toplam hareketlilik ve sperm hacim seviyeleri

Gruplar	**Ortlama± S.S**		
	Sperm kon. $\times 10^6$/mL >16	**Toplam hareketlilik 1 saat sonra (%hareketli)**	**Sperm hacmi (mL)**
Çalışma Grubu	9.4±3.8	33.70±6.18	2.93±1.06

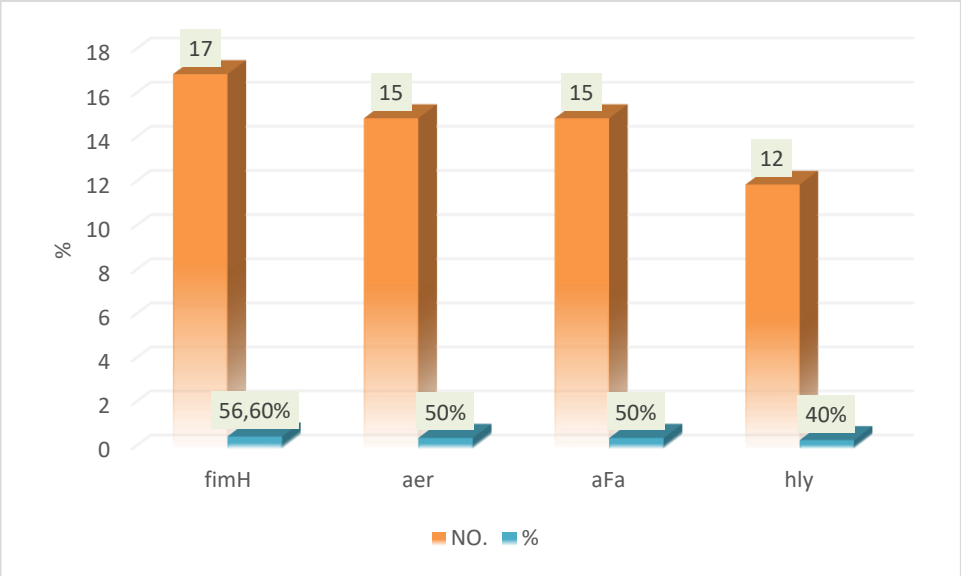


Şekil 4.7 Ortalama sperm konsantrasyonu, toplam motilite ve sperm hacim seviyeleri

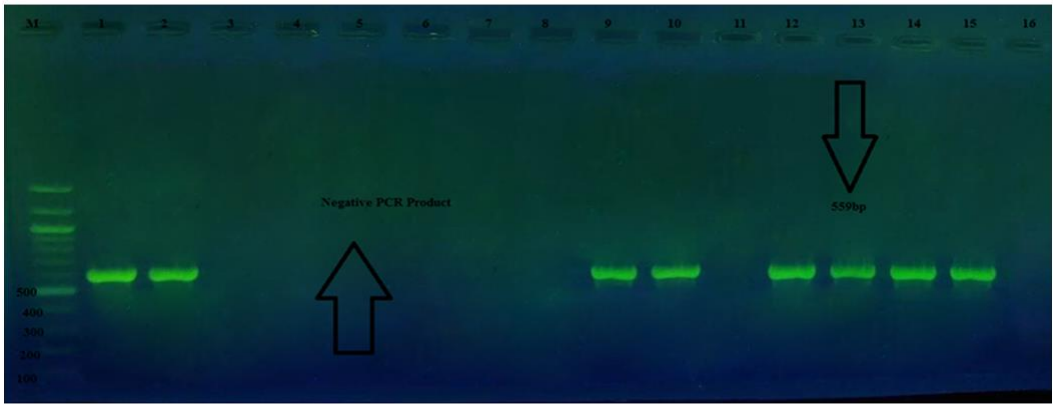
4.7 Genlerin Amplifikasyonu

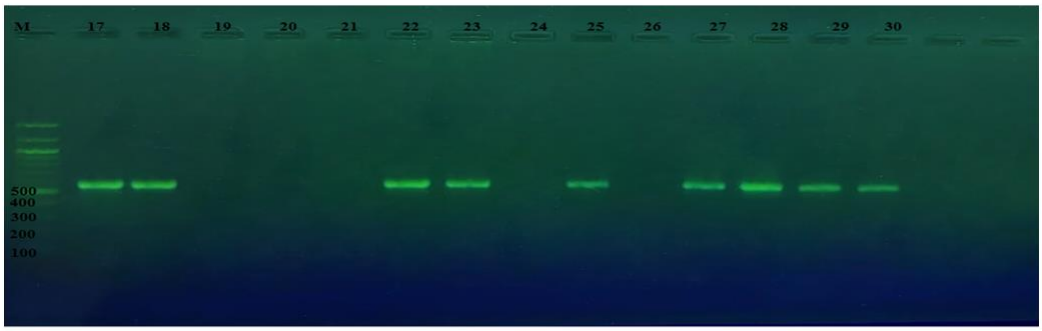
Toplam 30 izolatın DNA'sı izole edildi ve örneklerin saflığını (1,8 ila 2 arasında değişmektedir) ve konsantrasyonlarını (50 ila 360 mg/µL arasında değişmektedir) doğrulamak için Nanodrop kullanılmıştır. DNA'nın saflığı, ekstraksiyon sürecinin iyi bir göstergesidir ve süreci engelleyebilecek katışık maddelerin bulunmadığını kanıtlar (Albadri 2021).

Sonuçlar, PCR tekniği ile virülans genlerinin *fimH* için 17 (%56,6) *aer* ve *afa* için 15 (%50) ve *HlyA* için 12 (%40) yaygınlığını göstermiştir (Şekil 4.8). PCR ürünü şekillerde gösterilmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 and Şekil 4.12).

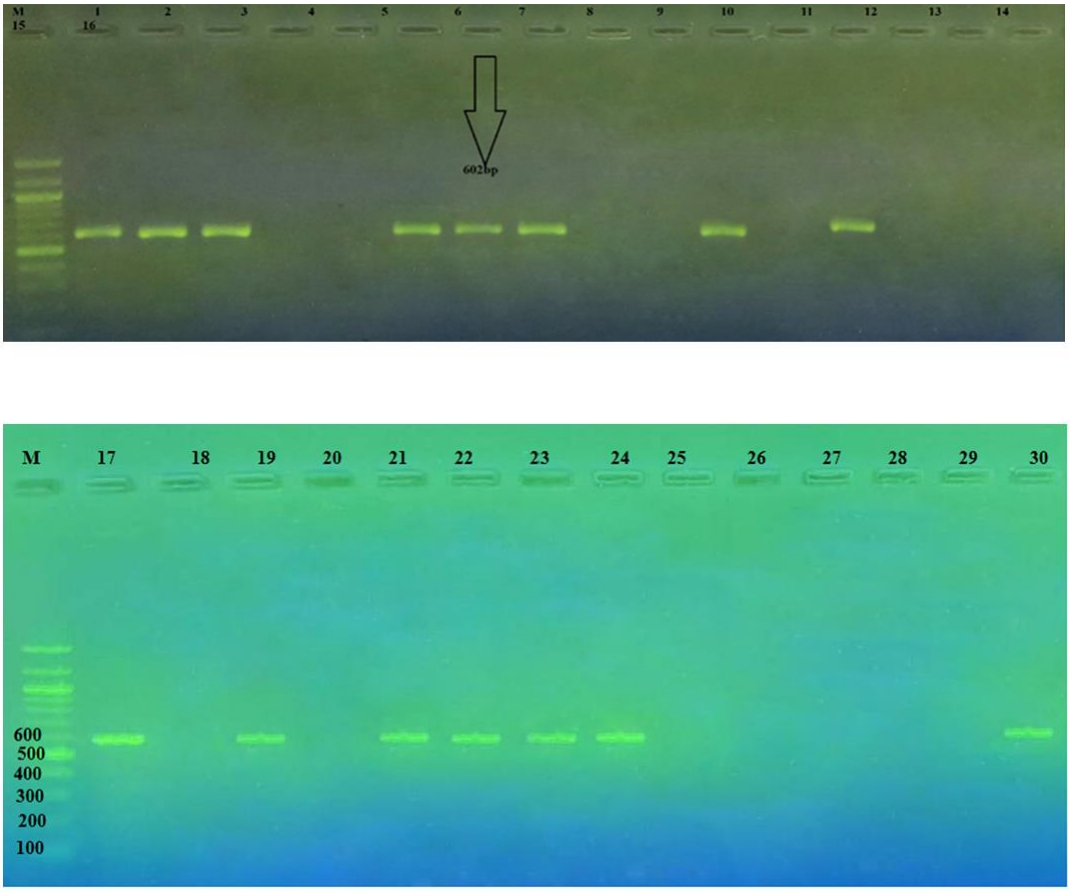


Şekil 4.8 *E. coli*'nin virülans genlerinin dağılımı

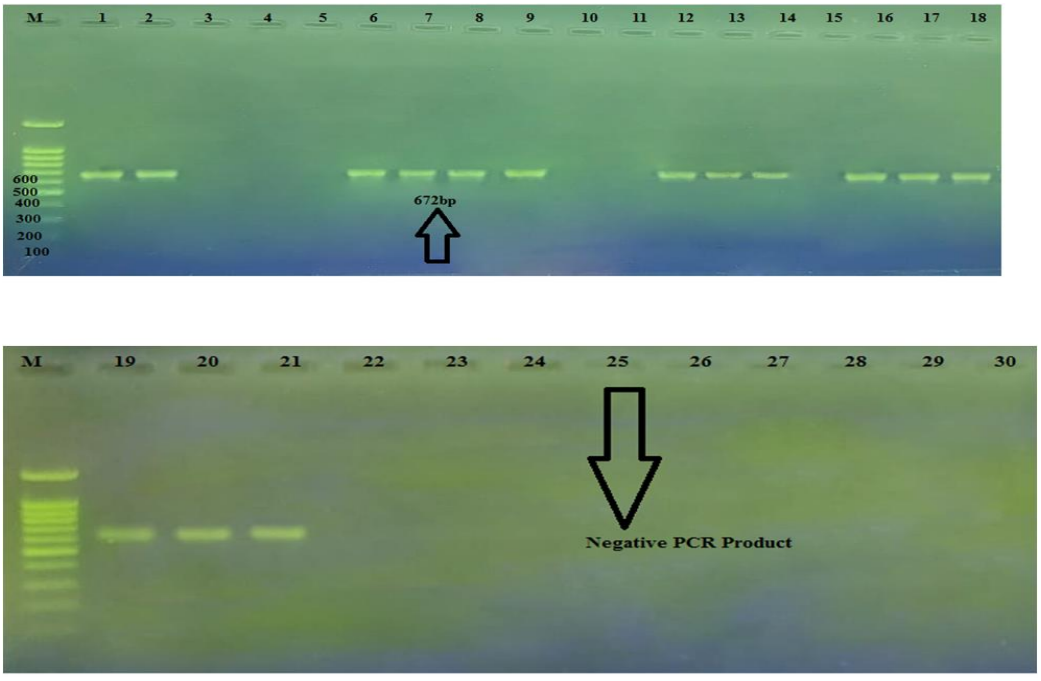




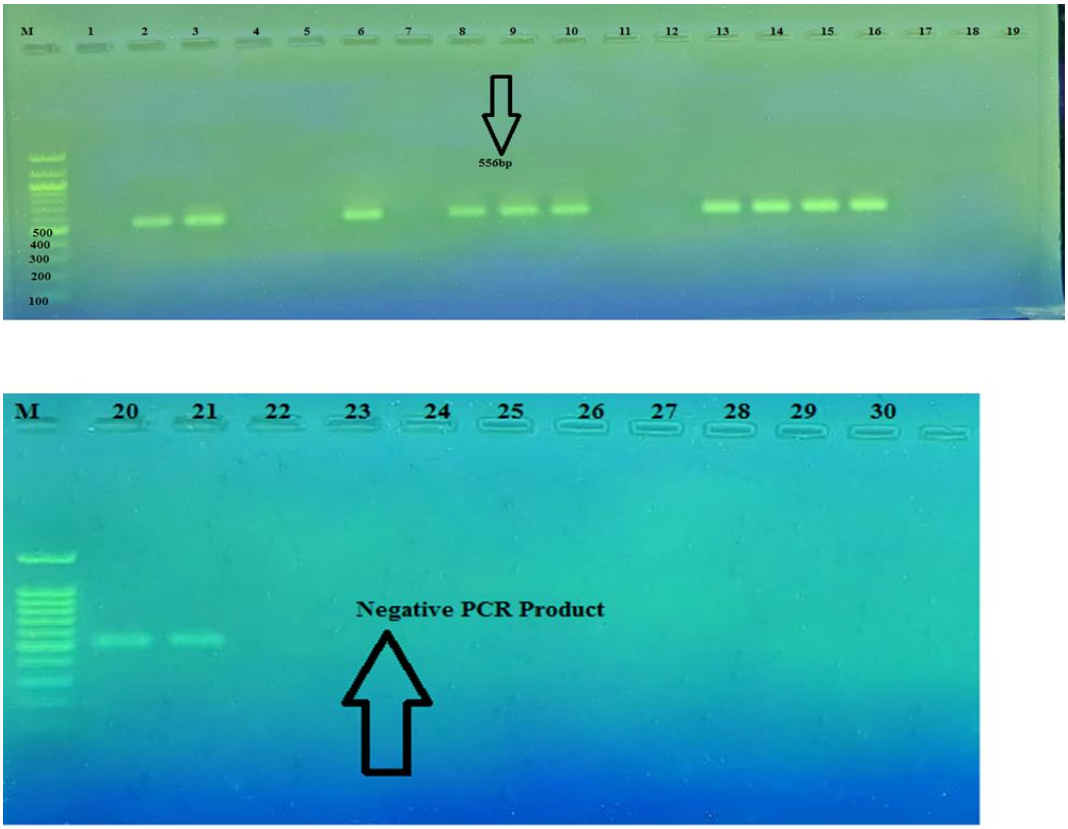
Şekil 4.9 *fimH* geni için agaroz jel elektroforezi



Şekil 4.10 *Aer* geni için agaroz jel elektroforezi



Şekil 4.11 *Afa* geni için agaroz jel elektroforezi



Şekil 4.12 *HlyA* geni için agaroz jel elektroforezi

fimH geni PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılmış ve ardından dizileme hizmeti için Macrogen Company Korea'ya gönderilmiştir. Elde edilen diziler, *E. coli* ve *E. coli O25b*: H4 için belirli nükleotid pozisyonlarında değişiklikler içermektedir. Transisyon C\T, Transversiyon A\T ve C\G değişiklikleri sırasıyla 397., 335. ve 3993842. nükleotid pozisyonlarında tespit edilmiştir. Bu diziler, NCBI standardına göre %99 uyumlu olup aşağıdaki sekans ID'leriyle eşleşmektedir: MH730300.1, MH730300.1, CP103465.1. *Aer* geninin sekanslama sonuçları, *Escherichia coli* ve *Escherichia coli O15:H18* için belirli bir nükleotid konumunda değişiklikler olduğunu göstermektedir. Bu değişiklikler arasında 1012637. nükleotid pozisyonunda Geçiş A\G bulunmaktadır. Ayrıca, 1012820 ve 4482162. nükleotid pozisyonlarında ise iki Transversiyon T\A tespit edilmiştir. Bu sekanslar aşağıdaki sekans ID'leriyle eşleşmektedir: CP117971.1, CP102488.1 ve %99 uyumlu oldukları belirtilmektedir. Çalışmamızda, *Escherichia coli* için *afa* geninin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizde, *afa* geninin dört farklı nükleotid konumunda (4105083, 4105240, 4105243 ve 4105249) Transversiyon G\C değişiklikleri tespit edilmiştir. Bu değişiklikler, CP033762.1 dizi kimliği altında %100 oranında koordine

edilen sekanslarla uyumlu bulunmuştur. Gen Bankasında *HlyA* geninin dizi ID'si CP095514.1 ve CP103672 olarak belirlenmiştir. Bu diziler, *Escherichia coli O25b:H4* için %100 ve %99 uyumluluk göstermektedir. Ayrıca, 4781431 ve 4781327. nükleotid pozisyonlarında iki adet A'dan G'ye ve T'den C'ye geçiş olduğu tespit edilmiştir. 4781301, 4781292 ve 4781302. nükleotid pozisyonlarında ise üç adet A'dan T'ye ve A'dan C'ye geçiş mevcuttur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Genlerin polimorfizm tipini temsil eder

Grup no	Değişim tipi	Lokasyon	Nükleotid	Source	Karşılaştırm alı dizi kimliği
Grup 1	Transversiyon	335	A\T	*Escherichia coli* gene="*fimH*"	ID: MH730300.1
Grup2	Transisyon	397	C\T	*Escherichia coli* gene="*fimH*"	ID: MH730300.1
Grup 3	Transversiyon	3993842	C\G	*Escherichia coli* O25b:H4 gene="*fimH*"	ID: CP103465.1
Grup 1	Transisyon	1012637	A\G	*Escherichia coli* gene="*AER*"	ID: CP117971.1
Grup 2	Transversiyon	1012820	T\A	*Escherichia coli* gene="*AER*"	ID: CP117971.1
Grup 3	Transversiyon	4482162	T\A	*Escherichia coli* O15:H18 gene="*AER*"	ID: CP102488.1
Grup 1	Transversiyon	4105083	G\C	*Escherichia coli* gene="*AFA*"	ID: CP033762.1
	Transversiyon	4105240	G\C		
	Transversiyon	4105243	G\C		
	Transversiyon	4105249	G\C		
Grup 2	---------	------	-----	*Escherichia coli* gene="*AFA*"	ID: CP033762.1
Grup 3	---------	------	-----	*Escherichia coli* gene="*AFA*"	ID: CP033762.1
Grup 1	---------	------	-----	*Escherichia coli* gene="*HlyA*"	ID: CP095514.1
Grup 2	Transisyon	4781431	A\G	*Escherichia coli* O25b:H4 gene="*HlyA*"	ID: CP103672.1
	Transisyon	4781327	T\C		
	Transversiyon	4781302	A\C		
	Transversiyon	4781301	A\T		
	Transversiyon	4781292	A\T		
Grup 3	---------	------	-----	*Escherichia coli* gene="*HlyA*"	ID: CP095514.1

Çalışmamızda, üropatojen *E. coli* izolatlarının 17'sinde (%56,6) en yaygın adezyon geni olan *fimH'nin* mevcut olduğu bulunmuştur; bu da Çin, Romanya, Moğolistan (Dadi *et al.* 2020), İran (Momtaz *et al.* 2013) ve Romanya'da (Wang *et al*. 2014) yapılan araştırmalarla uyumludur. İdrar yolu enfeksiyonlarının (İYE) önlenmesi için potansiyel bir aşı adayı olarak *fimH* geninin hedeflenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu konuda aktif araştırmalar devam etmektedir. Üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC) izolatlarının idrar yolunda yerleşmesi, *fimH'ye* karşı üretilen antikorlar tarafından engellenebilmektedir (Flores-Mireles *et al.* 2015). Bu nedenle, *fimH* genine odaklanan aşılar, İYE'lerin önlenmesinde etkili bir strateji olarak değerlendirilmektedir. İran, Meksika, Brezilya (Dadi *et al.* 2020) ve Romanya'da yapılan araştırmaların aksine 15 (%50) üropatojenik *E. coli* izolatında *Afa* adhesin (*afa* geni) bulundu, bu da kalıcı *E. coli* gelişimini kolaylaştırabileceğini düşündürmektedir (Bien *et al.* 2012).

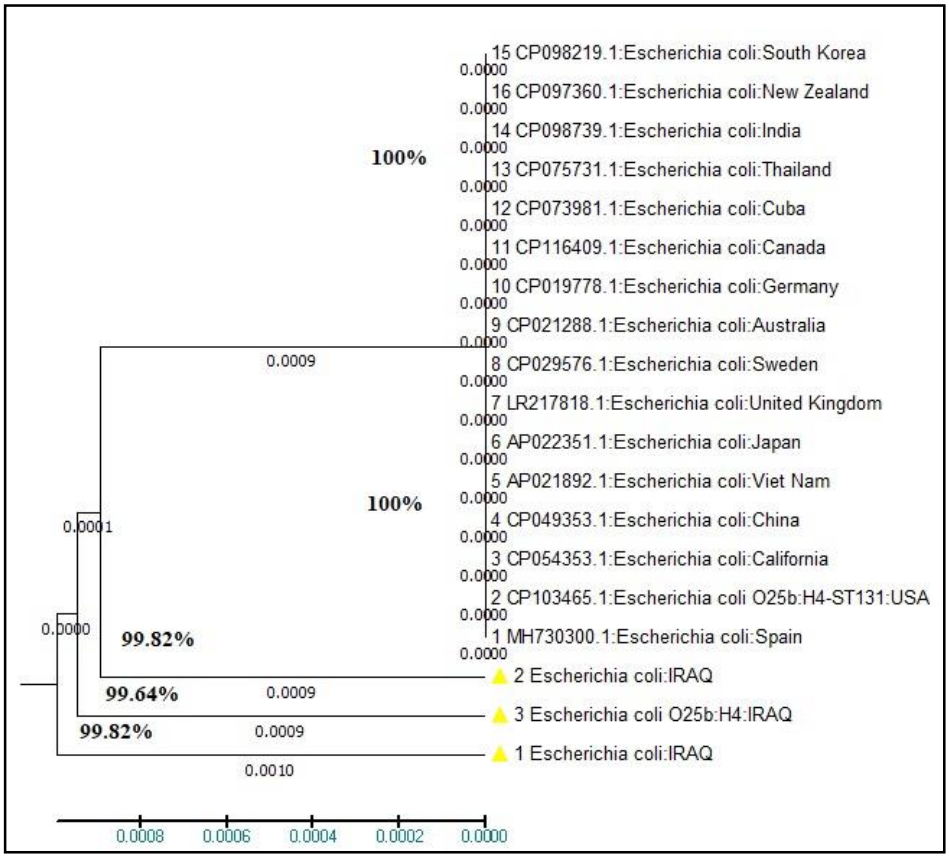
Bu çalışmada, üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC) izolatlarının %40'ının hemolizin (*hly*) genini taşıdığı belirlenmiştir. Bu oran, İran (Momtaz *et al*. 2013) ve Güney Kore (Lee *et al*. 2016) gibi diğer çalışmalarla karşılaştırılabilirken Zimbabve (Mbanga and Mudzana 2014), Tunus (Pourzare *et al*. 2017), Polonya (Kot *et al*. 2016), Meksika (Dadi *et al*. 2020) ve Çin (Wang *et al*. 2014) gibi yapılan çalışmalardan oldukça yüksek bulunmuştur. Uropatojenik *Escherichia coli* (UPEC) izolatlarının yaklaşık %50'si, *HlyA* geni tarafından kodlanan hücre dışı sitolitik protein toksini olan alfa-hemolizini üretir. İdrar yolu enfeksiyonu (İYE) hastalarında alfa-hemolizin klinik şiddetle ilişkilendirildiği birçok çalışmada gözlenmiştir (Yun *et al.* 2014). Bnyan *et al.* (2010)'nin çalışmasında piyelonefrite neden olan *E. coli* izolatlarında siderofor aerobaktin prevalansı %69 olarak bulunmuştur. Oliveira *et al.* (2011)'nin çalışmasında UPEC izolatlarının %76.6'sı aerobaktin üretimi açısından pozitif bulunmuştur. UPEC aerobaktin (*aer* geni) prevalansındaki bu tür farklılıklar, coğrafi varyasyondaki farklılıklardan veya konakçı özellikleri ve benzer bölgesel hava ve iklim ile ilişkideki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. İYE'li bireylerden elde edilen UPEC suşlarının diğer suşlardan farklı virülans faktörlerine ve epidemiyolojiye sahip olduğu görülmektedir (Lin *et al.* 2021).

4.8 Filogenetik Ağaç

MEGA 6.0 programı tarafından üretilen filogenetik ağaç, moleküler evrimsel genetik analiz için kullanılan bir diyagramdır. Bu ağaç, yüksek bir benzerlik oranı olan karakterleri (%98'den yüksek) ve maksimum güvenilirliği (%99'dan yüksek) yansıtmaktadır. Filogenetik analiz için bir *Neighbor joining* ağacı inşa edilmiştir.

4.8.1 *FimH* gene

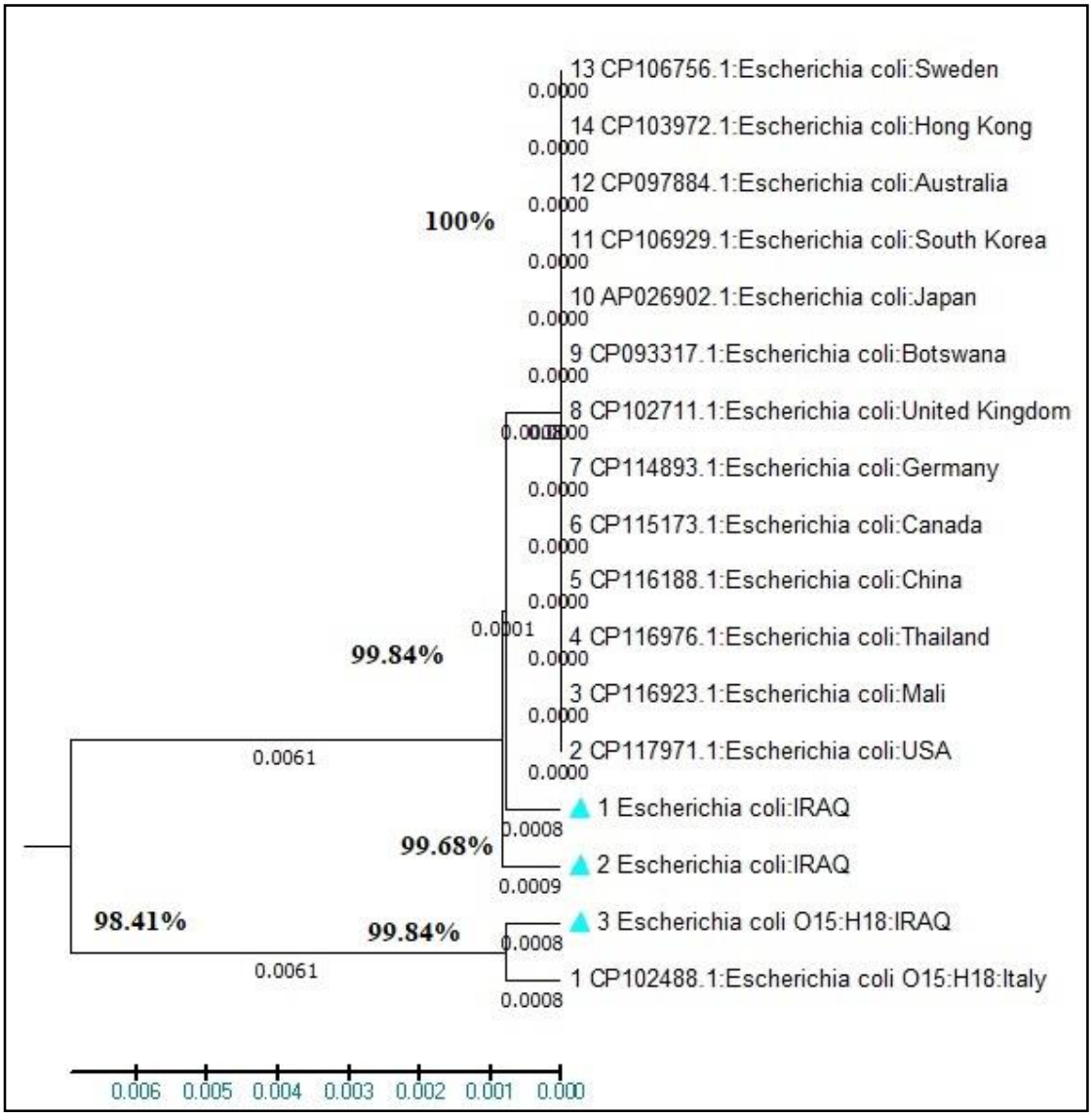
Filogenetik ağaç analizine göre, Irak ve dünya genotipleri arasındaki genetik benzerlik geniş bir ölçekte incelenmiştir. Hiyerarşik küme analiziyle birlikte, birçok alt grup içeren geniş bir ana kümeye bölünmüştür. İlk kök, İspanya, ABD, Kaliforniya, Çin, Vietnam, Japonya, Birleşik Krallık, İsveç, Avustralya, Almanya, Kanada, Küba, Tayland, Hindistan, Güney Kore ve Yeni Zelanda gibi ülkeleri içermektedir (Şekil 4.13). Bu ülkeler arasındaki genetik benzerlik ölçümü 0.0009 düzeyindedir. Irak izolatları ise *E. coli* ile benzerlik ölçümü 0.0009'a ve 0.001'e yakındır.



Şekil 4.13 *FimH* geninin Filogenetik ağaç analizi *Escherichia coli*

4.8.2 *Aer* gene

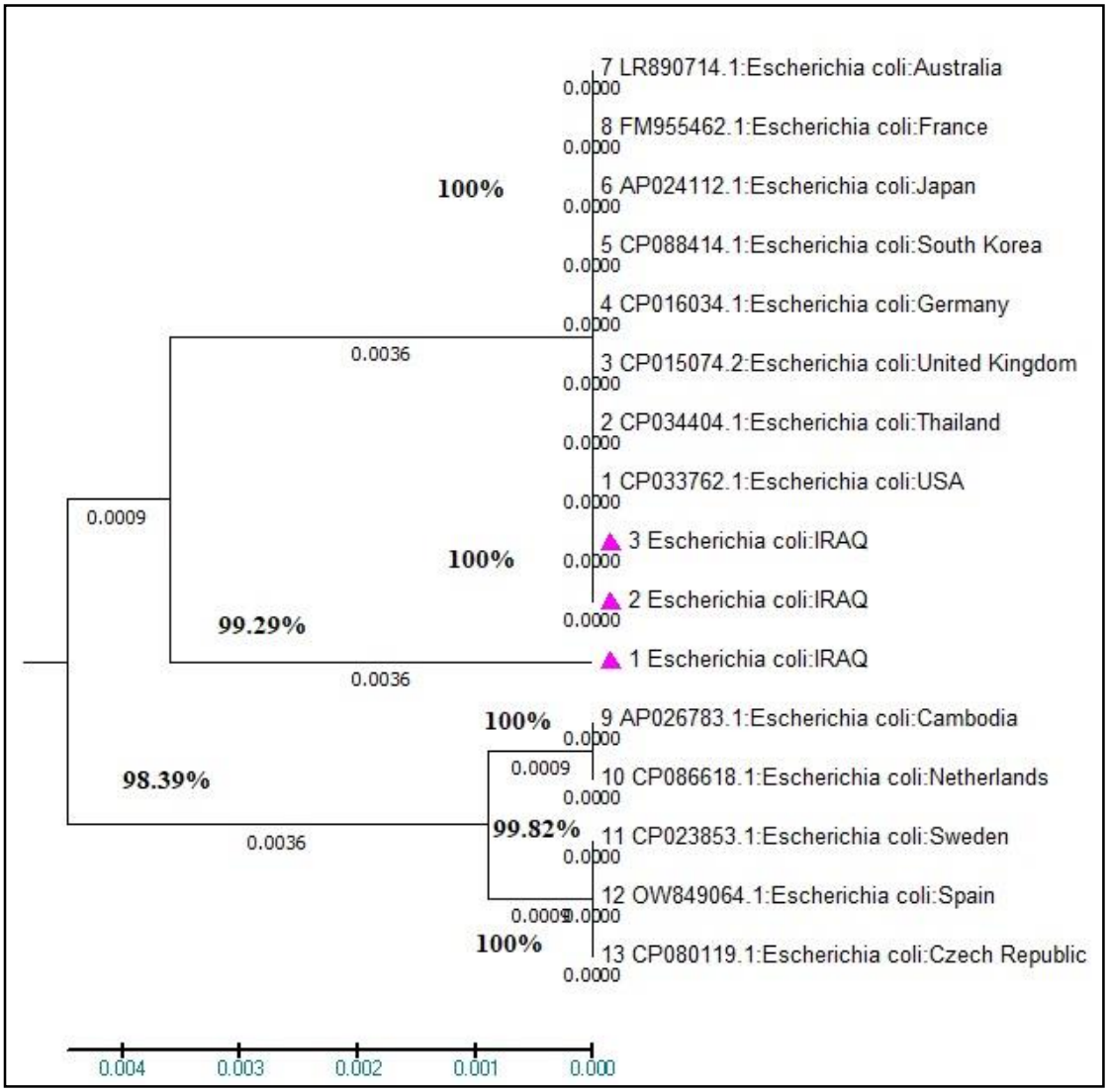
Hiyerarşik küme analizi sonucunda aşağıdaki kümeler belirlenmiştir: büyük bir ana küme, birçok alt kümeye bölünmüştür. İlk kök ABD, Mali, Tayland, Çin, Kanada, Almanya, Birleşik Krallık, Botsvana, Japonya, Güney Kore, Avustralya, İsveç, Hong Kong ve Irak gibi ülkeleri içermektedir (Şekil 4.14). Bu ülkeler arasındaki genetik benzerlik ölçümü 0.0061 seviyesindedir. *Escherichia coli O15: H18* ise İtalya'ya genetik olarak yakındır, genetik benzerlik ölçümü CP102488.1 dizi kimliği altında 0.0008'dir.



Şekil 4.14 *Aer* geninin Filogenetik ağaç analizi *Escherichia coli*

4.8.3 *Afa* gene

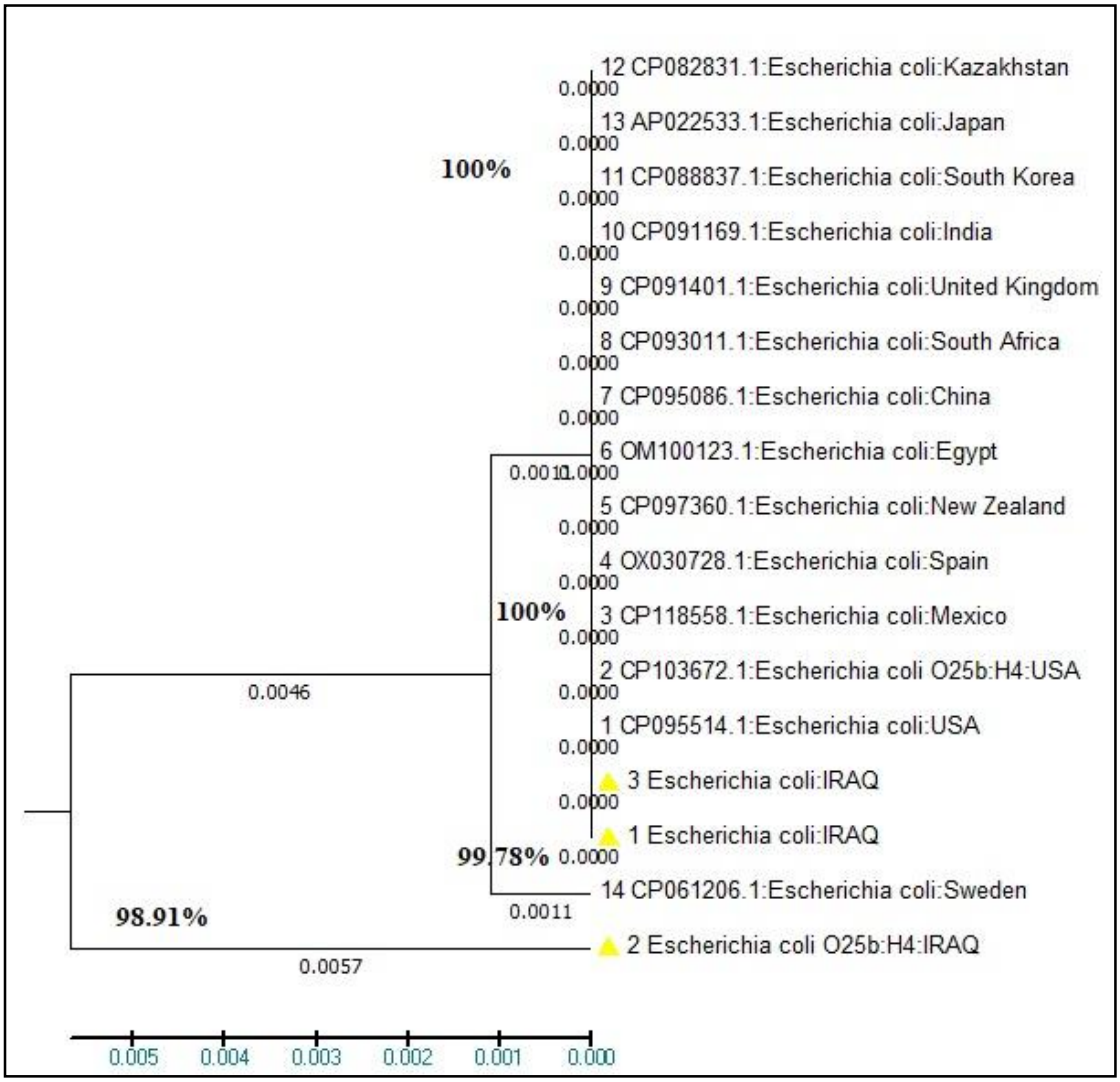
Hiyerarşik grup analizi sonucunda aşağıdaki kümeler belirlenmiştir: Büyük bir ana küme, birkaç alt boyuta ayrılmıştır. İlk kökte ABD, Tayland, Birleşik Krallık, Almanya, Güney Kore, Japonya, Avustralya, Fransa ve Irak yer almaktadır. Bu ülkeler arasındaki genetik benzerlik ölçümü 0.0036 seviyesindedir (Şekil 4.15). Kamboçya, Hollanda, İsveç, İspanya ve Çek Cumhuriyeti ise genetik olarak benzer bir boyuta sahiptir ve genetik benzerlik ölçümü 0.0036'dır.



Şekil 4.15 *Afa* geninin Filogenetik ağaç analizi *Escherichia coli*

4.8.4 *HlyA* gene

Hiyerarşik grup analizi sonucunda aşağıdaki kümeler belirlenmiştir: Büyük bir ana küme, birkaç alt boyuta ayrılmıştır. İlk kökte ABD, Meksika, İspanya, Yeni Zelanda, Mısır, Çin, Güney Afrika, Birleşik Krallık, Hindistan, Güney Kore, Kazakistan, Japonya, İsveç ve Irak yer almaktadır (Şekil 4.16). Bu ülkeler arasındaki genetik benzerlik ölçümü 0.0046 seviyesindedir. Son kümeyi ise *Escherichia coli O25b: H4* oluşturur ve genetik benzerlik ölçümü 0.0057'dir.



Şekil 4.16 *HlyA* geninin Filogenetik ağaç analizi *Escherichia coli*

Mevcut çalışmada izole edilen Escherichia coli, National Center Biotechnology Information (NCBI)'a göre izole edilen ve farklı kaynaklardan izole edilen izolatlar arasında değerlendirme yapıldığında, Ek 7 ve Ek 10 da görüldüğü gibi tüm genler için sekans altında tüketilmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuç

Escherichia coli Amoksisilin-Klavulanik Asit, Ampisilin ve Sefotaksime karşı direnç gösterebilir ve erkek infertilitesinin potansiyel bir nedeni olan idrar yolu enfeksiyonu suşlarına sahip olabilir. Bu çalışmada, *E. coli* O25b: H4, *E. coli* O15: H18 ve diğer sık görülen *E. coli* izolatları için *fimH, aer, afa* ve *HlyA* virülans genleri PCR sekanslama yöntemiyle tanımlanmıştır. Oluşturulan filogenetik ağaç, en yüksek özdeşlik (%98'den fazla) ve maksimum kapsam (%99'dan fazla) göstermiştir. *E. coli*'de en yaygın gen *fimH* olup, bunu *aer* ve *afa* genleri takip etmektedir. *E. coli* izolatları yüksek biyofilm oluşturma kapasitesine sahiptir. Nükleotid dizileme analizi sırasında transversiyon, en yüksek görünen moleküler varyant olarak belirlenmiştir.

5.2 Öneriler

Gerçek zamanlı olarak *fimH, aer, afa* ve *HlyA* virülans genleri için gen ekspresyonunu incelenebilir. Kadın infertilitesinin olası bir nedeni olarak İYE hastalarından izole edilen *E. coli'nin* PCR dizilemesi ile *fimH, aer, afa ve HlyA* virülans genlerinin saptanmalıdır. *E. coli* bakterilerinde biyofilm üreten genlerin yaygınlığının ve biyofilm üretim seviyeleriyle ilişkisinin araştırılmalıdır. Diğer virülans genlerinin ve bunların antibiyotik direnciyle ilişkisi araştırılmalıdır. Farklı kaynaklardan izole edilen *E. coli'nin* genetik ağacı incelenmelidir.

KAYNAKLAR

Akiyama, Y., Luo, Y., Hanno, P.M., Maeda, D. and Homma, Y. 2020. Interstitial cystitis/bladder pain syndrome: The evolving landscape, animal models and future perspectives. International Journal of Urology, 27(6): 491-503.

Alam, M.Z., Alam, Q., Jiman-Fatani, A.A., Shukri, H.A. and Haque, A.A. 2017. Surveillance study on the prevalence and antimicrobial resistance pattern among different groups of bacteria isolated from Western province of Saudi Arabia. Biomed. Res., 28(2): 989-906.

Albadri, A.T.J. 2021. Characterization and Molecular study to detect Multidrug Resistance Bacteria Isolated from Patients with Diabetic Foot Ulcers in Wasit Province. Doctoral dissertation, Wasit University, 114 page, Iraq.

Al-Faham, Q.M.H. 2016. Detection of some virulence genes in multi-drug resistance *Escherichia coli* isolated from different clinical sources in Iraq. MSc Thesis, AL-Kufa University, 85 page, Iraq.

Al-Hemedawi, R.S.H. 2020. Phenotypic characterisation of wild type and mutant strains of adherent invasive *Escherichia coli* and Shigella, in vitro, ex vivo and in vivo models. Doctoral dissertation, University of Strathclyde, 266 page, Scotland.

AlSalim, H.A. and Hassen, R.F. 2023. The Influence of Entamoeba histolytica Against Some Gut Microbiota in Children with Acute Amoebic. Iraqi Journal of Science, 8: 138-148.

Antinori, S. and Pezzani, M. D. 2018. Uncomplicated and complicated urinary tract infections in adults: The infectious diseases's specialist perspective. Imaging and Intervention in Urinary Tract Infections and Urosepsis, 2: 17-33.

Arakawa, S., Kawahara, K., Kawahara, M., Yasuda, M., Fujimoto, G., Sato, A. and Aoyama, N. 2019. The efficacy and safety of tazobactam/ceftolozane in Japanese patients with uncomplicated pyelonephritis and complicated urinary tract infection. Journal of Infection and Chemotherapy, 25(2): 104-110.

Bachoon, D.S. and Wendy, A.D. 2008. Microbiology laboratory manual. Ed. Michael Stranz. Mason, OH: Cengage Learning, 1: 8.

Bandyopadhyay, D. and Mukherjee, M. 2022. Combination of bactericidal antibiotics and inhibitors of Universal stress protein A (UspA): A potential therapeutic

alternative against multidrug resistant *Escherichia coli* in urinary tract infections. The Journal of Antibiotics, 75(1): 21-28.

Bartoletti, R., Cai, T., Wagenlehner, F. M., Naber, K. and Johansen, T.E.B. 2016. Treatment of urinary tract infections and antibiotic stewardship. European Urology Supplements, 15(4): 81-87.

Behzadi, P., Behzadi, E. and Pawlak-Adamska, E. A. 2019. Urinary tract infections (UTIs) or genital tract infections (GTIs). It's the diagnostics that count. GMS Hygiene and Infection Control, 14.

Bien, J., Sokolova, O. and Bozko, P. 2012. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. International Journal of Nephrology, 1: 15.

Bnyan, I.A., Bnyan, H.A. and Ali, J.A. 2010. The siderophore production of *E. coli* isolated from urinary tract infection and fecal isolates. Journal Babylon Univ/Pure Appl. Sci., 18: 862-864.

Brons, J.K., Vink, S.N., de Vos, M.G., Reuter, S., Dobrindt, U. and Van Elsas, J.D. 2020. Fast identification of *Escherichia coli* in urinary tract infections using a virulence gene based PCR approach in a novel thermal cycler. Journal of Microbiological Methods, 169: 105799.

Brubaker, L. and Wolfe, A.J. 2017. The female urinary microbiota, urinary health and common urinary disorders. Ann. Transl. Med, 5: 34.

Cai, T., Palagin, I., Brunelli, R., Cipelli, R., Pellini, E., Truzzi, J. C. and Van Bruwaene, S. 2020. Office-based approach to urinary tract infections in 50 000 patients: results from the REWIND study. International Journal of Antimicrobial Agents, 56(1): 105966.

Coorevits, L., Heytens, S., Boelens, J., and Claeys, G. 2017. The resident microflora of voided midstream urine of healthy controls: Standard versus expanded urine culture protocols. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis, 36: 635-639.

Costa, G. A., Rossatto, F. C., Medeiros, A. W., Correa, A. P. F., Brandelli, A., Frazzon, A. P. G. and MOTTA, A. D. S. 2018. Evaluation antibacterial and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P34 against Staphylococcus aureus and Enterococcus faecalis. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 90: 73-84.

Coureuil, M., Jamet, A., Bille, E., Lécuyer, H., Bourdoulous, S. and Nassif, X. 2019. Molecular interactions between Neisseria meningitidis and its human host. Cellular Microbiology, 21(11): e13063.

Dadi, B. R. 2018. Phenotypic and molecular characterization of uropathogenic *Escherichia coli* from urinary tract infection patients in selected health facilities of Addis Ababa Ethiopia. Doctoral dissertation, Addis Ababa University, 128 page, Ethiopia.

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

Dakheel, A. H. and Saadoon, A. Z. 2022. Evaluation of Interleukin-6 and Interleukin-10 in patients with urinary tract infection. Journal of Pharmaceutical Negative Results, 3(13): 1261-1266.

Daniel, M., Szymanik-Grzelak, H., Sierdziński, J., Podsiadły, E., Kowalewska-Młot, M. and Pańczyk-Tomaszewska, M. 2023. Epidemiology and Risk Factors of UTIs in Children—A Single-Center Observation. Journal of Personalized Medicine, 13(1): 138.

De Gaetano, G. V., Lentini, G., Famà, A., Coppolino, F. and Beninati, C. 2023. In vivo role of two-component regulatory systems in models of urinary tract infections. Pathogens, 12(1): 119.

Dorsey, E. R., Elbaz, A., Nichols, E., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Adsuar, J. C. and Collado-Mateo, D. 2018. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. The Lancet Neurology, 17(11): 939-953.

El-Baz, R., Said, H. S., Abdelmegeed, E. S. and Barwa, R. 2022. Characterization of virulence determinants and phylogenetic background of multiple and extensively drug resistant *Escherichia coli* isolated from different clinical sources in Egypt. Applied Microbiology and Biotechnology, 106(3): 1279-1298.

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.

Fritsche, T. R., Swoboda, S. E., Olson, B. J., Moore, F. M., Meece, J. K. and Novicki, T. J. 2011 . Evaluation of The Sensititre ARIS2x and Vitek 2 Automated Systems for Identification of Bacteral Pathogens Recovered from Veterinary Specimens. LACROSSE University of Wisconsin, 3229.

Fusco, A., Coretti, L., Savio, V., Buommino, E., Lembo, F. and Donnarumma, G. 2017. Biofilm formation and immunomodulatory activity of Proteus mirabilis clinically isolated strains. International Journal of Molecular Sciences, 18(2): 414.

Garretto, A., Miller-Ensminger, T., Ene, A., Merchant, Z., Shah, A., Gerodias, A. and Putonti, C. 2020. Genomic survey of *E. coli* from the bladders of women with and without lower urinary tract symptoms. Frontiers in Microbiology, 11: 2094.

González, M. J., Da Cunda, P., Notejane, M., Zunino, P., Scavone, P. and Robino, L. 2019. Fosfomycin tromethamine activity on biofilm and intracellular bacterial communities produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. Pathogens and Disease, 77(3): 1222.

González, M. J., Robino, L., Iribarnegaray, V., Zunino, P. and Scavone, P. 2017. Effect of different antibiotics on biofilm produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection. Pathogens and Disease, 7: 54.

Habibi, A. and Khameneie, M. K. 2016. Antibiotic resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pregnant women with history of recurrent urinary tract infections. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 15(8): 1745-1750 .

Harding, C., Mossop, H., Homer, T., Chadwick, T., King, W., Carnell, S. and Ali, A. 2022. Alternative to prophylactic antibiotics for the treatment of recurrent urinary tract infections in women: multicentre, open label, randomised, non-inferiority trial. BMJ, 376.

Harshitha, S. and Sreenath, G. 2022. Urinary Tract Infection in Elderly Women Patients Admitted in a Tertiary care hospital-A Case Series Study. Medica, 11(2): 148.

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

Hertting, O. 2011. Urinary tract infection: pathogenesis and complications. Doctoral dissertation, Karolinska Institutet, 43 page, Sweden.

Hrbacek, J., Cermak, P. and Zachoval, R. 2020. Current antibiotic resistance trends of uropathogens in central Europe: Survey from a Tertiary hospital urology department 2011–2019. Antibiotics, 9(9): 630.

Huen, K. H., Nik-Ahd, F., Chen, L., Lerman, S. and Singer, J. 2019. Neomycin-polymyxin or gentamicin bladder instillations decrease symptomatic urinary tract infections in neurogenic bladder patients on clean intermittent catheterization. Journal of Pediatric Urology, 15(2): 178-e1.

Iranpour, D., Hassanpour, M., Ansari, H., Tajbakhsh, S., Khamisipour, G. and Najafi, A. 2015. Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. BioMed Research International, 7.

Iyamba, J. M. L., Lukukula, C. M., Unya, J. W., Ngbandani, B. K., Bissingou, E., Mabankama, M. and Takaisi-Kikuni, N. B. 2022. Antibiotic resistance pattern and biofilm formation of Staphylococcus and Enterobacteriaceae isolates from clinical samples of patients with urinary tract and surgical site infections in Kinshasa, Democratic republic of Congo. Journal of Pharmacy and Pharmacology Research, 6: 158-168.

Kahlmeter, G., Giske, C. G., Kirn, T. J. and Sharp, S. E. 2019. Point-counterpoint: differences between the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations for reporting antimicrobial susceptibility results. Journal of Clinical Microbiology, 57(9): e01129-19.

Karczewska, M., Strzelecki, P., Bogucka, K., Potrykus, K., Szalewska-Pałasz, A. and Nowicki, D. 2023. Increased Levels of (p) ppGpp Correlate with Virulence and Biofilm Formation, but Not with Growth, in Strains of Uropathogenic *Escherichia coli*. International Journal of Molecular Sciences, 24(4): 3315.

Kavitha, J. R. and Devasena, T. 2013. Molecular and bacteriological examination of cow milk in coliform mastitis. Journal Pharmay Biological Sci., 6(2): 2319-7676.

Klein, R. D. and Hultgren, S. J. 2020. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host–pathogen interactions and new treatment strategies. Nature Reviews Microbiology, 18(4): 211-226.

Kot, B. 2019. Antibiotic resistance among uropathogenic. Polish Journal of Microbiology, 68(4): 403-415.

Kot, B., Wicha, J., Gruzewska, A., Piechota, M., Wolska, K. and Obrebska, M. 2016. Virulence factors, biofilm-forming ability, and antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* strains isolated from hospitalized patients. Turkish Journal of Medical Sciences, 46(6): 1908-1914.

Lee, J. H., Subhadra, B., Son, Y. J., Kim, D. H., Park, H. S., Kim, J. M. and Choi, C. H. 2016. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. Letters in Applied Microbiology, 62(1): 84-90.

Lin, W. H., Zhang, Y. Z., Liu, P. Y., Chen, P. S., Wang, S., Kuo, P. Y. and Kao, C. Y. 2021. Distinct characteristics of *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections in a medical center at a ten-year interval. Pathogens, 10(9): 1156.

Liu, S. C., Han, X. M., Shi, M. and Pang, Z. L. 2016. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the bladders of female patients with sterile urine after antibiotic therapies. Journal of Huazhong University of Science and Technology, 36: 710-715.

Mbanga, J. and Mudzana, R., 2014. Virulence factors and antibiotic resistance patterns of uropathogenic Escherichia coli. African Journal of Microbiology Research, 8(43): 3678–3686.

Momtaz, H., Karimian, A., Madani, M., Safarpoor Dehkordi, F., Ranjbar, R., Sarshar, M. and Souod, N. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 12: 1-12.

Narawad, D. 2020. Clinical and laboratory profile of urinary tract infections in type 2 diabetes mellitus patients in rural hospital. Doctoral dissertation, Maharashtra University of Health Sciences, 95 page, India.

Nielsen, K. L., Stegger, M., Kiil, K., Godfrey, P. A., Feldgarden, M., Lilje, B., *et al.* 2017. Whole-genome comparison of urinary pathogenic *Escherichia coli* and

faecal isolates of UTI patients and healthy controls. Int. J. Med. Microbiol. 307: 497–507.

O'Boyle, N., Douce, G. R., Farrell, G., Rattray, N. J., Schembri, M. A., Roe, A. J. and Connolly, J. P. 2023. Distinct ecological fitness factors coordinated by a conserved *Escherichia coli* regulator during systemic bloodstream infection. Proceedings of the National Academy of Sciences, 120(1): e2212175120.

O'Toole, G. A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. Journal of Visualized Experiments. Journal of Visualized Experiments, 47: e2437

Oliveira, F. A., Paludo, K. S., Arend, L. N. V. S., Farah, S. M. S. S., Pedrosa, F. O., Souza, E. M. and Fadel-Picheth, C. M. 2011. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. Genetic Mol. Res., 10(4): 4114-25.

Ong, L. T. 2020. Antibiotics for complicated urinary tract infection and acute pyelonephritis: A systematic review. World Journal Clin. Infect. Dis, 10: 33-41.

Orole, O. O., Gambo, S. M. and Fadayomi, V. S. 2022. Characteristics of virulence factors and prevalence of virulence markers in resistant *Escherichia coli* from patients with gut and urinary infections in Lafia, nigeria. Microbiology Insights, 15: 11786361221106993.

Öztürk, R. and Murt, A. 2020. Epidemiology of urological infections: a global burden. World Journal of Urology, 38: 2669-2679.

Pokharel, P., Dhakal, S. and Dozois, C. M. 2023. The Diversity of *Escherichia coli* Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen. Microorganisms, 11(2): 344.

Polse, R., Yousif, S. and Assafi, M. 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 .

Pourzare, M., Derakhshan, S. and Roshani, D. 2017. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection in Sanandaj, Iran. Archives of Pediatric Infectious Diseases, 5(3).

Prajapati, A. K. 2018. Urinary tract infection in diabetics. In microbiology of urinary tract infections-microbial agents and predisposing factors. IntechOpen, 30: 2-5.

Price, T. K., Hilt, E. E., Thomas-White, K., Mueller, E. R., Wolfe, A. J., and Brubaker, L. 2020. The urobiome of continent adult women: a cross-sectional study. BJOG, 127: 193–201.

Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L. and Wu, M. 2022. Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Signal Transduction and Targeted Therapy, 7(1): 199.

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

Russell, C. W., Fleming, B. A., Jost, C. A., Tran, A., Stenquist, A. T., Wambaugh, M. A. and Mulvey, M. A. 2018. Context-dependent requirements for FimH and other canonical virulence factors in gut colonization by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Infection and Immunity, 86(3): e00746-17.

Sasirekha, B., Manasa, R., Ramya, P. and Sneha, R. 2010. Frequency and antimicrobial sensitivity pattern of extended spectrum β-lactamases producing *E. coli* And Klebsiella Pneumoniae isolated in a tertiary care hospital. Al. Ameen. J. Med. Sci., 3(4): 265 -271.

Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S. and Gabrani, R. 2016. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. Journal of Applied Microbiology, 121(2): 309-319.

Shea, A. E., Frick-Cheng, A. E., Smith, S. N. and Mobley, H. L. 2022. Phenotypic assessment of clinical *Escherichia coli* isolates as an indicator for uropathogenic potential. Msystems, 7(6): e00827-22.

Stapleton, A. E., Wagenlehner, F. M., Mulgirigama, A. and Twynholm, M. 2020. *Escherichia coli* resistance to fluoroquinolones in community-acquired uncomplicated urinary tract infection in women: a systematic review. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 64(10): e00862-20.

Stehlik-Barry, K. and Babinec, A. J. 2017. Data analysis with IBM SPSS statistics. Packt Publishing Ltd, 229-265.

Subashchandrabose, S. and Mobley, H. L. 2017. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management, 235-261.

Tabasi, M., Karam, M. R. A., Habibi, M., Mostafavi, E. and Bouzari, S. 2016. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from patients with acute cystitis, pyelonephritis and asymptomatic bacteriuria. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 10(12): 01.

Tamadonfar, K. O., Di Venanzio, G., Pinkner, J. S., Dodson, K. W., Kalas, V., Zimmerman, M. I. and Hultgren, S. J. 2023. Structure–function correlates of fibrinogen binding by Acinetobacter adhesins critical in catheter-associated urinary tract infections. Proceedings of the National Academy of Sciences, 120(4): e2212694120.

Tang, J., Kang, M., Chen, H., Shi, X., Zhou, R., Chen, J. and Du, Y. 2011. The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in Staphylococcus aureus and other biofilm-forming bacteria. Science China Life Sciences, 54: 863-869.

Thänert, R., Reske, K. A., Hink, T., Wallace, M. A., Wang, B., Schwartz, D. J. and Dantas, G. 2019. Comparative genomics of antibiotic-resistant uropathogens implicates three routes for recurrence of urinary tract infections. MBio, 10: e01977-19.

Tiku, V. and Tan, M. W. 2021. Host immunity and cellular responses to bacterial outer membrane vesicles. Trends in Immunology, 42(11): 1024-1036.

Wang, Y., Zhao, S., Han, L., Guo, X., Chen, M., Ni, Y. and He, P. 2014. Drug resistance and virulence of uropathogenic *Escherichia coli* from Shanghai, China. The Journal of Antibiotics, 67(12): 799-805.

Yao, R., Mao, X., Xu, Y., Qiu, X., Zhou, L., Wang, Y. and Cui, X. 2022. Polysaccharides from Vaccaria segetalis seeds reduce urinary tract infections by inhibiting the adhesion and invasion abilities of uropathogenic *Escherichia coli*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 12: 1733.

Yun, K. W., Kim, H. Y., Park, H. K., Kim, W. and Lim, I. S. 2014. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 47(6): 455-461.

Zykov, I. N., Sundsfjord, A., Småbrekke, L. and Samuelsen, Ø. 2016. The antimicrobial activity of mecillinam, nitrofurantoin, temocillin and fosfomycin and comparative analysis of resistance patterns in a nationwide collection of ESBLproducing *Escherichia coli* in Norway 2010–2011. Infectious Diseases, 48(2): 99- 107.

EKLER

EK 1. Vitek II sistemi

EK 2. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nden (NCBI) elde edilen DNA dizilerinin gen bankasındaki sıralama kimliği, skoru, beklentileri ve uyumluluğu

EK 1. Vitek II sistemi

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed February 7, 2023 7:45:18 AM AST

Patient Name:Mohammad Nasra,5
Location:
Lab ID: 53424

Patient ID: 53424
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source:

Collected:

Comments:	

Susceptibility Information | **Analysis Time:** 15.60 hours | **Status:** Final

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
+Temocillin		R	Ceftolozane/Tazobactam	<= 0.25	S
+Amoxicillin		R	+Cefepime		R
+Ampicillin		R	Aztreonam	>= 64	R
+Amoxicillin/Clavulanic Acid		R	Doripenem	<= 0.12	S
Ampicillin/Sulbactam	>= 32	R	+Imipenem		R
+Carbenicillin		R	Meropenem/Vaborbactam	>= 64	R
+Piperacillin		R	+Amikacin		S
Piperacillin/Sulbactam	>= 64	R	+Gentamicin		
+Piperacillin/Tazobactam		R	Tobramycin	<= 1	S
+Cefsulodin		R	+Cinoxacin		R
+Cefadroxil		R	+Ciprofloxacin		S
+Cefazolin		R	+Enoxacin		
+Cefradine		R	Levofloxacin	1	S
+Loracarbef		R	+Marbofloxacin		
+Cefotetan		R	Doxycycline	>= 16	R
Cefoxitin	<= 4	*R	Minocycline	2	S
+Cefditoren		R	Tetracycline	>= 16	R
+Cefixime		R	Tigecycline	<= 0.5	S
Cefotaxime	>= 64	R	Chloramphenicol	16	I
Ceftazidime/Avibactam	0.25	S	Colistin		

***= AES modified **= User modified**

AES Findings	
Confidence:	Consistent

EK 1(devam)

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed February 7, 2023 7:45:18 AM AST

Patient Name: Mohammad Nasra,4 Patient ID: 53425
Location: Physician:
Lab ID: 53425 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: **Collected:**

Comments:	

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 17.32 hours	**Status:** Final

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
+Temocillin			Ceftolozane/Tazobactam	16	R
+Amoxicillin		R	+Cefepime		
+Ampicillin		R	Aztreonam	>= 64	R
+Amoxicillin/Clavulanic Acid		R	Doripenem	0.5	S
Ampicillin/Sulbactam	>= 32	R	+Imipenem		R
+Carbenicillin		R	Meropenem/Vaborbactam	32	R
+Piperacillin		R	+Amikacin		S
Piperacillin/Sulbactam	8*	*R	+Gentamicin		
+Piperacillin/Tazobactam		R	Tobramycin	<= 1	S
+Cefsulodin		R	+Cinoxacin		R
+Cefadroxil		R	+Ciprofloxacin		S
+Cefazolin		R	+Enoxacin		
+Cefradine		R	Levofloxacin	1	S
+Loracarbef		R	+Marbofloxacin		
+Cefotetan			Doxycycline	2	S
Cefoxitin	>= 64	R	Minocycline	1	S
+Cefditoren			Tetracycline	2	S
+Cefixime		R	Tigecycline	<= 0.5	S
Cefotaxime	8	R	Chloramphenicol	16	I
Ceftazidime/Avibactam	<= 0.12	S	Colistin		

***= AES modified **= User modified**

AES Findings	
Confidence:	Consistent with correction

EK 1(devam)

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed February 7, 2023 7:45:19 AM AST

Patient Name: Mohammad Nasra,1 Patient ID: 53428
Location: Physician:
Lab ID: 53428 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: **Collected:**

Comments:	

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 11.97 hours	**Status:** Final

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
+Temocillin		R	Ceftolozane/Tazobactam	<= 0.25	S
+Amoxicillin		R	+Cefepime		R
+Ampicillin		R	Aztreonam	4	S
+Amoxicillin/Clavulanic Acid		R	Doripenem	<= 0.12	S
Ampicillin/Sulbactam	16	*R	+Imipenem		R
+Carbenicillin		R	Meropenem/Vaborbactam	<= 0.5	S
+Piperacillin		R	+Amikacin		S
Piperacillin/Sulbactam	4*	*R	+Gentamicin		
+Piperacillin/Tazobactam		R	Tobramycin	<= 1	S
+Cefsulodin		R	+Cinoxacin		R
+Cefadroxil		R	+Ciprofloxacin		S
+Cefazolin		R	+Enoxacin		
+Cefradine		R	Levofloxacin	1	S
+Loracarbef		R	+Marbofloxacin		
+Cefotetan		R	Doxycycline	8	*R
Cefoxitin	8	*R	Minocycline	2	S
+Cefditoren		R	Tetracycline	>= 16	R
+Cefixime		R	Tigecycline	<= 0.5	S
Cefotaxime	>= 64	R	Chloramphenicol	4	S
Ceftazidime/Avibactam	>= 16	R	Colistin		

***= AES modified **= User modified**

AES Findings	
Confidence:	Consistent with correction

EK 1(devam)

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed February 7, 2023 7:45:19 AM AST

Patient Name: Muhammad Nasra,2 Patient ID:53427
Location: Physician:
Lab ID: 53427 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: **Collected:**

Comments:	

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 11.47 hours	**Status:** Final

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
+Temocillin			Ceftolozane/Tazobactam	<= 0.25	S
+Amoxicillin		R	+Cefepime		
+Ampicillin		R	Aztreonam	16	R
+Amoxicillin/Clavulanic Acid			Doripenem	<= 0.12	S
Ampicillin/Sulbactam	16	I	+Imipenem		S
+Carbenicillin		R	Meropenem/Vaborbactam	<= 0.5	S
+Piperacillin		R	+Amikacin		S
Piperacillin/Sulbactam	16	I	+Gentamicin		
+Piperacillin/Tazobactam			Tobramycin	<= 1	S
+Cefsulodin		R	+Cinoxacin		R
+Cefadroxil		R	+Ciprofloxacin		
+Cefazolin		R	+Enoxacin		
+Cefradine		R	Levofloxacin	4	*R
+Loracarbef		R	+Marbofloxacin		
+Cefotetan			Doxycycline	4	S
Cefoxitin	<= 4	S	Minocycline	1	S
+Cefditoren			Tetracycline	<= 1	S
+Cefixime			Tigecycline	<= 0.5	S
Cefotaxime	>= 64	R	Chloramphenicol	32	R
Ceftazidime/Avibactam	0.25	S	Colistin		

***= AES modified **= User modified**

AES Findings	
Confidence:	Consistent

EK 1(devam)

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed February 7, 2023 7:45:19 AM AST

Patient Name: Mohammad Nasra,3 Patient ID: 53426
Location: Physician:
Lab ID: 53426 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: **Collected:**

Comments:	

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 14.40 hours	**Status:** Final

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
+Temocillin		R	Ceftolozane/Tazobactam	<= 0.25	S
+Amoxicillin		R	+Cefepime		R
+Ampicillin		R	Aztreonam	16	R
+Amoxicillin/Clavulanic Acid		R	Doripenem	<= 0.12	S
Ampicillin/Sulbactam	16	*R	+Imipenem		R
+Carbenicillin		R	Meropenem/Vaborbactam	32	R
+Piperacillin		R	+Amikacin		
Piperacillin/Sulbactam	32	*R	+Gentamicin		
+Piperacillin/Tazobactam		R	Tobramycin	4	*R
+Cefsulodin		R	+Cinoxacin		R
+Cefadroxil		R	+Ciprofloxacin		S
+Cefazolin		R	+Enoxacin		
+Cefradine		R	Levofloxacin	1	S
+Loracarbef		R	+Marbofloxacin		
+Cefotetan		R	Doxycycline	8	I
Cefoxitin	<= 4	*R	Minocycline	1	S
+Cefditoren		R	Tetracycline	2	S
+Cefixime		R	Tigecycline	<= 0.5	S
Cefotaxime	>= 64	R	Chloramphenicol	>= 64	R
Ceftazidime/Avibactam	>= 16	R	Colistin		

***= AES modified **= User modified**

AES Findings	
Confidence:	Consistent

EK 1(devam)

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed February 8, 2023 2:15:59 PM AST

Patient Name: Mohammad Nasra,5 Patient ID: 38143
Location: Physician:
Lab ID: 38143 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: **Collected:**

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	3.88 hours	**Status:** Final
Selected Organism	99% Probability **Bionumber:**	**Escherichia coli** 0407610554524611	
ID Analysis Messages			

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	+
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	+	53	lHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	+	64	lLATa	-			

EK 1(devam)

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed February 8, 2023 2:15:59 PM AST

Patient Name: Mohammad Nasra,4 Patient ID: 38144
Location: Physician:
Lab ID: 38144 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: **Collected:**

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	3.88 hours	**Status:** Final
Selected Organism	99% Probability	**Escherichia coli**	
	Bionumber:	0401610450002610	
ID Analysis Messages			

Biochemical Details																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	lLATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

EK 1(devam)

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed February 8, 2023 2:15:59 PM AST

Patient Name: Mohammad Nasra,3 Patient ID: 38145
Location: Physician:
Lab ID: 38145 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: **Collected:**

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	3.90 hours	**Status:** Final
Selected Organism	99% Probability	**Escherichia coli**	
	Bionumber:	0405610450006610	
ID Analysis Messages			

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	lLATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	lHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

EK 1(devam)

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed February 8, 2023 2:15:59 PM AST

Patient Name: Mohammad Nasra,1 Patient ID: 38147
Location: Physician:
Lab ID:38147 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: **Collected:**

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	3.90 hours	**Status:** Final
Selected Organism	99% Probability	**Escherichia coli**	
	Bionumber:	0405610550406610	
ID Analysis Messages			

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	lLATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	lHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

EK 1(devam)

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed February 8, 2023 2:15:59 PM AST

Patient Name: Mohammad Nasra,2 Patient ID: 38146
Location: Physician:
Lab ID: 38146 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: **Collected:**

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	6.83 hours	**Status:** Final
Selected Organism	95% Probability	**Escherichia coli**	
	Bionumber:	0401611450000210	
ID Analysis Messages			

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	lLATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

EK 2. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nden (NCBI) elde edilen DNA dizilerinin gen bankasındaki sıralama kimliği, skoru, beklentileri ve uyumluluğu

gene="*fimH*"			
Erişim	**Ülke**	**Suş**	**Uyumluluk**
ID: MH730300.1	**İspanya**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP103465.1	**ABD**	***Escherichia coli* O25b:H4**	**99%**
ID: CP054353.1	**Kaliforniya**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP049353.1	**Çin**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: AP021892.1	**Viet nam**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: AP022351.1	**Japonya**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: LR217818.1	**Birleşik Krallık**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP029576.1	**İsveç**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP021288.1	**Avustralya**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP019778.1	**Almanya**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP116409.1	**Kanada**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP073981.1	**Küba**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP075731.1	**Tayland**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP098739.1	**Hindistan**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP098219.1	**Güney Kore**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP097360.1	**Yeni Zellanda**	***Escherichia coli***	**99%**

EK 2(devam)

gene="*AER*"			
Erişim	**Ülke**	**suş**	**Uyumluluk**
ID: CP102488.1	**İtalya**	***Escherichia coli* O15:H18**	**99%**
ID: CP117971.1	**USA**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP116923.1	**Mali**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP116976.1	**Tayland**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP116188.1	**Çin**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP115173.1	**Kanada**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP114893.1	**Almanya**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP102711.1	**Birleşik Krallık**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP093317.1	**Botswana**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: AP026902.1	**Japonya**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP106929.1	**Güney Kore**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP097884.1	**Avustralya**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP106756.1	**İsveç**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP103972.1	**Hong Kong**	***Escherichia coli***	**99%**

EK 2(devam)

gene="*AFA*"			
Erişim	**Ülke**	**suş**	**Uyumluluk**
ID: CP033762.1	**ABD**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP034404.1	**Tayland**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP015074.2	**Birleşik Krallık**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP016034.1	**Almanya**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP088414.1	**Güney Kore**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: AP024112.1	**Japonya**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: LR890714.1	**Avustralya**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: FM955462.1	**Fransa**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: AP026783.1	**Kamboçya**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP086618.1	**Hollanda**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP023853.1	**İsveç**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: OW849064.1	**İspanya**	***Escherichia coli***	**99%**
ID: CP080119.1	**Çekya**	***Escherichia coli***	**99%**

EK 2(devam)

gene="*HlyA*"			
Erişim	**Ülke**	**suş**	**Uyumluluk**
ID: CP095514.1	**ABD**	***Escherichia coli***	**100%**
ID: CP103672.1	**ABD**	***Escherichia coli* O25b:H4**	**100%**
ID: CP118558.1	**Meksika**	***Escherichia coli***	**100%**
ID: OX030728.1	**İspanya**	***Escherichia coli***	**100%**
ID: CP097360.1	**Yeni Zellanda**	***Escherichia coli***	**100%**
ID: OM100123.1	**Mısır**	***Escherichia coli***	**100%**
ID: CP095086.1	**Çin**	***Escherichia coli***	**100%**
ID: CP093011.1	**Güney Afrika**	***Escherichia coli***	**100%**
ID: CP091401.1	**Birleşik Krallık**	***Escherichia coli***	**100%**
ID: CP091169.1	**Hindistan**	***Escherichia coli***	**100%**
ID: CP088837.1	**Güney Kore**	***Escherichia coli***	**100%**
ID: CP082831.1	**Kazakistan**	***Escherichia coli***	**100%**
ID: AP022533.1	**Japonya**	***Escherichia coli***	**100%**
ID: CP061206.1	**İsveç**	***Escherichia coli***	**99%**

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Mohammed Nasri Hasan AL-BAYATI

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2021-2023
Lisans	Anbar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2001-2002