

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÜROPATOJENİK *Escherichia coli* İZOLATLARINDA BAZI
VİRÜLANS GENLERİNİN BİYOFİLM İLE İLİŞKİSİNİN
PZR YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi

Dr. Yasemin ALTUN

TRABZON-2024

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÜROPATOJENİK *Escherichia coli* İZOLATLARINDA BAZI
VİRÜLANS GENLERİNİN BİYOFİLM İLE İLİŞKİSİNİN
PZR YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi

Dr. Yasemin ALTUN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Faruk AYDIN

Prof. Dr. Celal Kurtuluş BURUK

TRABZON-2024

ÖNSÖZ

Tez sürecimde ve uzmanlık eğitimimde beni her zaman destekleyen, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren tez hocalarım sayın Prof. Dr. Faruk AYDIN ve Prof. Dr. Celal Kurtuluş BURUK'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca bana kattıkları bilgi ve deneyimler için, her problemimde destekleri için Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'ndaki hocalarım Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ'a, Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA'ya, Prof. Dr. İlknur TOSUN'a, Prof. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU'na, Doç. Dr. Esra ÖZKAYA'ya, Dr. Öğr. Üyesi Metin SANCAKTAR'a ve Dr. Öğr. Üyesi Merve CORA'ya;

Tezimin istatistiksel analizi sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Serdar KARAKULLUKÇU hocama;

Tez çalışmamda yardımlarını eksik etmeyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'nda görev yapan asistan hekim arkadaşlarıma ve tüm personel ekibimize;

Prof. Dr. Celal Kurtuluş BURUK yönetiminde TTU-2023-10874 proje kodlu tez çalışmamı destekleyen KTÜ Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne;

Bugünleri gelmemi sağlayan biricik annem Nurhan KOÇ ve babam Sadık KOÇ'a, hayat boyu desteklerinden ötürü abimlerim ve ablama, sevgili eşimin ailesine;

Gönül şenliğim oğluma ve can yoldaşım, sonsuz destekçim Mehmet ALTUN'a teşekkür ederim.

Dr. Yasemin ALTUN

ÖZET

Üropatojenik *Escherichia coli* İzolatlarında Bazı Virülans Genlerinin Biyofilm ile İlişkisinin PZR Yöntemiyle Araştırılması

Amaç: Bu çalışmada üropatojen *Escherichia coli* (*E. coli*) izolatlarında bazı virülans genlerinin varlığının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle araştırılması ve bu izolatların fenotipik biyofilm üretiminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamızda antibiyotik duyarlılık testleri için otomatize sistem ve disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Aynı hastadan alınan idrar örneklerinden üretilen izolatların moleküler benzerlikleri PZR temelli yöntemler ile araştırılmıştır. Çalışmamızdaki suşlarla tekrarlayan İYE etkeni (tİYE) ve tekrarlamayan İYE etkeni (tmİYE) grupları oluşturulmuştur. Suşların filogenetik sınıflandırması ve *fimH*, *papC*, *sfa*, *csgA*, *csgD*, *afa*, *flu*, *bcsA*, *pgaA*, *pgaC*, *fliCH4* ve *fliCH7* genlerinin varlığı PZR yöntemi ile araştırılmıştır. *pgaA* ve *bcsA* genlerinin ekspresyon düzeyi, mRNA miktarı gerçek zamanlı PZR (RT-PCR) yöntemiyle ölçülerek belirlenmiştir. Suşların fenotipik biyofilm üretimi hem Kongo kırmızılı agar (KKA) kullanılarak hem de mikrotitre plak yöntemi (MPY) ile belirlenmiştir.

Bulgular ve Sonuç: Çalışmamızda tİYE grubunda 54, tmİYE grubunda 54 olmak üzere 108 suş yer almıştır. Seftriakson (CRO), sefiksim (CFM), siprofloksasin (CIP), levofloksasin (LEV) direnci ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üretimi ile İYE'lerin tekrarlaması arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Her iki grupta da suşların çoğunluğu filogrup B2'de, ikinci sırada ise filogrup D'de yer almıştır. Virülans genlerinden *fimH*, *csgA* ve *csgD* tüm suşlarda pozitif bulunmuş, iki grupta da prevalansı en düşük gen *afa* olarak saptanmıştır. *bcsA* ve *pgaC* genlerinin prevalansı tİYE grubunda, *pgaA* geninin ekspresyon düzeyi tmİYE grubunda daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Her iki grupta da suşların çoğunun KKA yöntemiyle biyofilm ürettiği, MPY ile ise düşük düzeyde biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir. İki grup arasında biyofilm üretimi arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

SUMMARY

Investigation of the Relationship Between Some Virulence Genes and Biofilm Formation in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates Using PCR Method

Objective: This study aimed to investigate the presence of certain virulence genes in uropathogen *Escherichia coli* (*E. coli*) isolates using the polymerase chain reaction (PCR) method and to determine the phenotypic biofilm production of these isolates.

Methods: In our study, an automated system and disk diffusion method were used for antibiotic susceptibility testing. The molecular similarities of isolates obtained from urine samples of the same patient were investigated using PCR-based methods. Recurrent UTI (rUTI) and non-recurrent UTI (nrUTI) groups were formed with the strains in our study. The phylogenetic classification of the strains and the presence of *fimH*, *papC*, *sfa*, *csgA*, *csgD*, *afa*, *flu*, *bcsA*, *pgaA*, *pgaC*, *fliCH4*, and *fliCH7* genes were investigated using PCR. The expression levels of *pgaA* and *bcsA* genes were determined by measuring mRNA quantities using real-time PCR (RT-PCR). Phenotypic biofilm production of the strains was determined using both Congo red agar (CRA) and the microtiter plate method (MPM).

Results and Conclusion: A total of 108 strains were included in the study, with 54 strains in the rUTI group and 54 strains in the nrUTI group. A positive correlation was found between resistance to ceftriaxone (CRO), cefixime (CFM), ciprofloxacin (CIP), levofloxacin (LEV), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production, and the recurrence of UTIs ($p < 0.05$). In both groups, the majority of the strains belonged to phylogroup B2, followed by phylogroup D. The virulence genes *fimH*, *csgA*, and *csgD* were found to be positive in all strains, while *afa* was the least prevalent gene in both groups. The prevalence of *bcsA* and *pgaC* genes was higher in the rUTI group, and the expression level of the *pgaA* gene was higher in the nrUTI group ($p < 0.05$). Most strains in both groups produced biofilm by the CRA method and they were low level biofilm producer by the MPM. No significant difference was found in biofilm production between the two groups.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
SUMMARY	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İdrar Yolu Enfeksiyonları.....	3
2.1.1. İdrar Yolu Enfeksiyonlarıyla İlgili Genel Bilgiler.....	3
2.1.2. İdrar Yolu Enfeksiyonlarında Tedavi	4
2.1.3. Tekrarlayan İdrar Yolu Enfeksiyonu	5
2.1.4. İdrar Yolu Enfeksiyonunda <i>E. coli</i> 'nin rolü	6
2.2. Bakterilerin Tiplendirilmesi	14
2.2.1. Antibiyotiplendirme.....	15
2.2.2. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR ile Tiplendirme ...	15
2.2.3. Arbitrary Primed PCR ile Tiplendirme.....	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	17
3.1. Etik Kurul Onayı	17
3.2. Çalışmanın Özellikleri.....	17
3.2.1. Çalışma Grupları.....	17
3.2.2. Çalışmaya Dahil Edilme/Edilmeme Ölçütleri	17
3.3. <i>E. coli</i> İzolatlarının Üretimi ve Tanımlanması	18
3.4. İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	18
3.5. Antibiyotiplendirme	19
3.6. Kromozomal DNA İzolasyonu.....	19
3.7. Genotiplendirme	19
3.7.1. ERIC PCR ile İzolatların Benzerliklerinin Belirlenmesi	20
3.7.2. AP – PCR ile İzolatların Benzerliklerinin Belirlenmesi.....	20
3.8. Filogenotiplendirme	20
3.9. Virülans Genlerinin Belirlenmesi.....	20

3.10. Agaro Jel Elektroforezi.....	23
3.11. Ekzopolisakkarit Genlerinin mRNA Düzeylerinin Belirlenmesi	23
3.11.1. Bakteri Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu	24
3.11.2. İzole Edilen Total RNA'dan cDNA Sentezi	25
3.11.3. RT-PCR ile mRNA Düzeyinin Belirlenmesi.....	25
3.12. İzolatların Fenotipik Biyofilm Üretiminin Saptanması	27
3.12.1. Kongo Kırmızılı Agarda Biyofilm Üretiminin Saptanması.....	27
3.12.2. Mikrotitre Plak Yöntemiyle Biyofilm Üretiminin Saptanması.....	29
3.13. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR	32
4.1. İzolatların Birimlere Göre Dağılımı	32
4.2. İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılıkları	33
4.3. İzolatların Genotiplendirilmesi.....	39
4.3.1. ERIC PCR ile Tiplendirme	39
4.3.2. AP-PCR ile Tiplendirme.....	40
4.4. İzolatların Filogenotiplendirilmesi	41
4. 5. İzolatlarda Virülans Genlerinin Varlığının Belirlenmesi	43
4.6. Ekzopolisakkarit Genlerinin mRNA Düzeylerinin Belirlenmesi	48
4.7. İzolatların Fenotipik Biyofilm Üretimi	54
4.7.1. Kongo Kırmızılı Agarda Biyofilm Üretimi	54
4.7.2. Mikrotitre Plak Yöntemiyle Biyofilm Üretimi	55
4.8. Biyofilm Üretiminin Diğer Parametrelerle İlişkisi.....	56
4.8.1. Antibiyotik Direnci ve Biyofilm Üretimi İlişkisi	56
4.8.2. Filogenetik Gruplar ve Biyofilm Üretimi İlişkisi	57
4.8.3. Virülans Genlerinin Varlığı ve Biyofilm Üretimi İlişkisi.....	58
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ.....	68
6.1. Sonuç	68
6.2. Öneriler.....	68
7. KAYNAKLAR	70

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Agn 43	: Antijen 43
AMC	: Amoksisilin-klavulanik asit
AP-PCR	: Arbitrary primed PCR
ATCC	: American Type Culture Collection
bp	: Base pair, baz çifti
cDNA	: Komplementer DNA
CFM	: Sefiksim
CIP	: Siprofloksasin
Cp	: Crossing point, çakışma noktası
CRA	: Congo red agar
CRO	: Seftriakson
CT	: Cycle threshold, eşik değeri döngüsü
ÇİD	: Çoklu ilaca dirençli
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoxyribonucleoside triphosphate
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ERIC	: Enterobacterial repetitive intergenic consensus
ESBL	: Extended-spectrum beta-lactamase
EUCAST	: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
-F	: Forward (ileri) primer
F	: Nitrofurantoin

FF	: Fosfomisin
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
I	: Duyarlı, yüksek doz
İYE	: İdrar yolu enfeksiyonu
KKA	: Kongo kırmızılı agar
KPC	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemaz
KTÜ	: Karadeniz Teknik Üniversitesi
LB	: Luria Bertani
LEV	: Levofloksasin
MALDI-TOF MS	: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi
mcg / ml	: Mikrogram bölü mililitre
ml	: Mililitre
MLST	: Multilokus sekans tiplendirme
MPM	: Microtiter plate method
MPY	: Mikrotitre plak yöntemi
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit, messenger ribonucleic acid
MS	: Microsoft
NDM	: New Delhi metallo beta laktamaz
nrUTI	: Non-recurrent urinary tract infection
OD	: Optik dansitesi
ODc	: Optik dansite cut-off değeri

OD_{MB}	: Mikroorganizma biyofilminin optik dansitesi
OXA-48	: Oksasilinaz- 48
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PCR	: Polymerase chain reaction
PFGE	: Pulsed-field gel electrophoresis
PGA	: Poli- β -1,6-N-asetil-D-glukozamin polimeri
pH	: Potansiyel Hidrojen İyonu
pmol	: Pikomol
pmol/μl	: Pikomol bölü mikrolitre
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Q1-Q3	: 1. ve 3. çeyreklik
QS	: Quorum sensing
-R	: Reverse (geri) primer
R	: Dirençli
RAPD	: Randomly amplified polymorphic DNA
REP	: Repetitive extragenic palindromic
RFLP	: Restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal RNA
RT-PCR	: Real-time polimeraz chain reaction, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
rUTI	: Recurrent urinary tract infection
S	: Duyarlı
SD	: Standart sapma

Sn	: Saniye
SXT	: Trimetoprim-sulfametoksazol
TBE	: Tris – Borik asit – Etilen diamin tetra asetik asit
TEC	: Tekrarlayan <i>E. coli</i>
tİYE	: Tekrarlayan İYE etkeni
Tm	: Melting temperature, erime noktası
TMEC	: Tekrarlamayan <i>E. coli</i>
tmİYE	: Tekrarlamayan İYE etkeni
UPEC	: Uropathogenic <i>E. coli</i> , üropatojenik <i>E. coli</i>
UV	: Ultraviyole
VIM	: Verona integron-encoded metallo beta laktamaz
%	: Yüzde
β	: Beta
°C	: Santigrad Derece
μl	: Mikrolitre
+	: Pozitif
-	: Negatif

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. UPEC suşlarında varolan fimbrial adezinler (24).....	8
Şekil 2. Biyofilm oluşum aşamaları (30)	10
Şekil 3. Kongo kırmızılı agarda biyofilm üretimi.....	28
Şekil 4. Mikrotitre plak yöntemiyle biyofilm üretimi.....	30
Şekil 5. Her iki çalışma grubunda antimikrobiyal duyarlılık sonuçları (%).....	38
Şekil 6. ERIC primerleri ile PZR işlemi sonrasında elde edilen amplikonların agaroz jel elektroforez görüntüsü.	40
Şekil 7. AP-PCR primeri ‘1247’ ile PZR işlemi sonrasında elde edilen amplikonların agaroz jel elektroforez görüntüsü.	41
Şekil 8. Çalışma gruplarındaki suşların filogenetik dağılımları (% ,n)	42
Şekil 9. <i>csgA</i> primerleri ile PZR işlemi sonucu elde edilen amplikonların agaroz jel elektroforez görüntüsü	47
Şekil 10. <i>bcsA</i> primerleri ile PZR işlemi sonucu elde edilen amplikonların agaroz jel elektroforez görüntüsü	48
Şekil 11. 16S rRNA genine ait amplifikasyon eğrileri ve Cp değerleri	49
Şekil 12. <i>bcsA</i> genine ait amplifikasyon eğrileri ve Cp değerleri.....	49
Şekil 13. <i>pgaA</i> genine ait amplifikasyon eğrileri ve Cp değerleri	50
Şekil 14. 16S rRNA genine ait erime sıcaklığı ve erime eğrisi analizi.....	51
Şekil 15. <i>bcsA</i> genine ait erime sıcaklığı ve erime eğrisi analizi.....	51
Şekil 16. <i>pgaA</i> genine ait erime sıcaklığı ve erime eğrisi analizi	52
Şekil 17. <i>bcsA</i> ve <i>pgaA</i> genlerinin mRNA düzeyleri hesaplamasında elde edilen değerler.....	54
Şekil 18. Kongo kırmızılı agarda biyofilm üretimi.....	54

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>chuA</i> ve <i>yjaA</i> geni ile TspE4.C2 DNA fragmanının PCR ile çoğaltılmasına dayanan <i>E. coli</i> filogenetik sınıflandırması.....	7
Tablo 2. PZR’de kullanılan primer dizileri.....	21
Tablo 3. PZR reaksiyon şartları	22
Tablo 4. RT-PCR reaksiyon koşulları	27
Tablo 5. Mikrotitre plak yöntemiyle biyofilm üretiminin değerlendirilmesi	30
Tablo 6. İdrarında <i>E. coli</i> izole edilen hastaların klinik birimlere göre dağılımı	33
Tablo 7. Tekrarlayan İYE etkeni <i>E. coli</i> izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları .	33
Tablo 8. Tekrarlamayan İYE etkeni <i>E. coli</i> izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları	35
Tablo 9. Tekrarlayan İYE etkeni <i>E. coli</i> izolatlarının ve <i>E.coli</i> ATCC 25922 suşunun virülans genleri.....	43
Tablo 10. Tekrarlamayan İYE etkeni <i>E. coli</i> izolatlarının virülans genleri	45
Tablo 11. <i>E.coli</i> suşlarında virülans genlerinin varlığı	47
Tablo 12. <i>bcsA</i> ve <i>pgaA</i> genlerinin mRNA düzeyleri hesaplamasında elde edilen değerler.....	53
Tablo 13. Her iki grupta mikrotitre plak yöntemiyle biyofilm üretiminin değerlendirilmesi.....	55
Tablo 14. Antibiyotik direnci ve GSBL sentezinin KKA’da biyofilm üretimi ile ilişkisi	56
Tablo 15. Antibiyotik direnci ve GSBL sentezinin MPY ile biyofilm üretimi ile ilişkisi	57
Tablo 16. Filogenetik grup dağılımının KKA’da biyofilm üretimi ile ilişkisi	58
Tablo 17. Filogenetik grup dağılımının MPY ile biyofilm üretimi ile ilişkisi.....	58
Tablo 18. Virülans genlerinin varlığının KKA’da biyofilm üretimi ile ilişkisi.....	59
Tablo 19. Virülans genlerinin varlığının MPY ile biyofilm üretimi ile ilişkisi	60

1. GİRİŞ

İdrar yolu enfeksiyonu (İYE), kadınlar başta olmak üzere, insanlarda en sık görülen enfeksiyonlar arasındadır. Etkilenen kadınların önemli bir kısmında enfeksiyon tekrarlamaktadır (1).

Toplum kökenli İYE'lerin çoğunda etken üropatojenik *E. coli* (UPEC)'dir (2). UPEC izolatlarının, üriner sistemde enfeksiyon oluşumuna yardımcı olan virülans faktörlerinden en önemlisi, biyofilm oluşturma yeteneğidir. Bu suşlar genellikle, biyofilm oluşumunu kolaylaştıran tip 1 fimbria gibi adezinlere ve flagellaya sahiptir. Tip 1 fimbria *fim* operonu tarafından kodlanan, üriner epitele invazyonda etkili bir adezyon faktörüdür. P fimbria akut piyelonefrit gelişimi ile ilişkilidir ve *pap* operonu tarafından kodlanır. Curli fimbria, hücreden çözünebilir proteinler salgılayan ve biyofilm oluşumunu kolaylaştıran amiloid fibriler yapıdır ve *csg* operonu tarafından kodlanır. UPEC patojenitesine katkı sağlayan başka bir adezin grubu ise ototransporter proteinlerdir. Antijen 43, *flu* geni tarafından kodlanan bir ototransporter proteindir. *E. coli*'de yüzeylere yapışma, agregasyon ve biyofilm oluşumu gibi işlevleri vardır. UPEC suşları sahip oldukları bu virülans faktörleri sayesinde üriner sistemde stresli çevresel koşullar varlığında biyofilm oluşturabilir ve kalıcılığı sağlayabilir (3-5). Bu nedenle gerek hedefe yönelik tedavi protokollerinin belirlenmesinde gerekse enfeksiyonun tekrarının önlenmesinde İYE oluşumunda etkili faktörlerin aydınlatılması kritik öneme sahiptir.

Bu çalışmada Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uygulama ve Araştırma Merkezi (Farabi Hastanesi), Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Temmuz 2022- Şubat 2023 tarihleri arasında idrar örneklerinden izole edilen, İYE etkeni *E. coli* suşlarının antibiyotik direnç paternlerinin ve fenotipik biyofilm üretiminin araştırılması ve suşlarda biyofilm oluşumu ile ilgili olduğu bilinen *fimH*, *papC*, *sfa*, *csgA*, *csgD*, *afa*, *flu*, *bcsA*, *pgaA*, *pgaC*, *fliCH4* ve *fliCH7* virülans genlerinin varlığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma ile UPEC suşlarının İYE patogeneğinde yer alan çeşitli virülans faktörleri ve bunların tekrarlayan İYE oluşumu ile ilişkisinin aydınlatılması, elde edilen verilerin enfeksiyonun tekrarının önlenmesine katkı sağlaması hedeflenmiştir.

Aynı zamanda bu çalışma tekrarlayan İYE konusunda gelecekte yapılacak yeni çalışmalarda yol gösterici olacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İdrar Yolu Enfeksiyonları

2.1.1. İdrar Yolu Enfeksiyonlarıyla İlgili Genel Bilgiler

İYE insanlarda en sık görülen bakteriyel enfeksiyonlardandır. Cinsel aktif yaştaki kadınlar başta olmak üzere İYE her iki cinsiyette ve tüm yaş gruplarında önemli bir morbidite nedenidir. Kadınların yaklaşık % 60'ı, erkeklerin ise yaklaşık % 12'si yaşamları boyunca en az bir kere İYE geçirmektedir. Özellikle kadınlarda geçirilen İYE'lerin % 30 ila 40'ı tekrarlama eğilimindedir.

İYE böbrekleri, renal pelvisi, üreterleri, mesaneyi, üretrayı ve diğer çevre dokuları etkileyebilir. Enfeksiyonun yerine göre üst üriner sistem enfeksiyonu (böbrek ve üreterlerin etkilendiği), alt üriner sistem enfeksiyonu (mesane ve üretranın etkilendiği), piyelonefrit (sadece böbrek tutulumu) ve sistit (sadece mesane tutulumu) olarak adlandırılır. Klinik faktörlere göre ise komplike olmayan ve komplike İYE şeklinde temel olarak ikiye ayrılır.

Komplike olmayan İYE: Gebe olmayan, immünkompetan genç kadınlarda görülen; herhangi bir anatomik veya fonksiyonel bozukluğun ve komorbiditenin söz konusu olmadığı idrar yolu enfeksiyonu

Komplike İYE: Yukarıdaki tanımların dışında kalan tüm üriner sistem enfeksiyonlarını kapsamaktadır. Örneğin tekrarlayan İYE, anatomik ve fonksiyonel bozuklukların söz konusu olduğu İYE, gebelerde görülen İYE, üriner sistem kataterleri başta olmak üzere yabancı cisim ile ilişkili İYE, erkeklerde görülen İYE (6-10).

Üriner sistem enfeksiyonları etken mikroorganizmaların asendan yolla periüretral bölgeden mesane ve diğer üriner yapılara ulaşmasıyla veya kan yoluyla bölgeye yerleşip enfeksiyon oluşturmasıyla ortaya çıkabilir. Asendan yolla enfeksiyon oluşumu çok daha sık gözlenmektedir. Periüretral bölgenin rektuma anatomik yakınlığı nedeniyle enteral mikrobiyota üyesi mikroorganizmalar bu bölgeyi kolonize eder ve İYE etyolojisinde önemli rol oynar. Komplike olmayan sistitlerin yaklaşık % 80'inde etken *E. coli*'dir. Bunun yanı sıra *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*,

Enterococcus spp., *Staphylococcus saprophyticus* ve *Pseudomonas aeruginosa* da diğer İYE etkenlerinden en sık görülenleridir (11).

Üretra uzunluğu, idrarın asidik olması ($\text{pH} < 5$) ve vajen mikrobiyotasında yer alan laktobasil türleri, sık sık ve çok miktarda işemenin yıkayıcı etkisi, idrar osmolaritesi ve idrar içeriğinde bakteri çoğalmasını olumsuz etkileyen proteinlerin varlığı, mesanenin iç yüzeyini kaplayan mukus tabakası gibi özellikler İYE oluşumuna karşı konağı koruyan doğal faktörlerdir. Bununla birlikte kadınlarda üretranın kısa olması, haftada 3 kere veya daha sık cinsel ilişki, gebelik, üriner sistemde taş varlığı, vezikoüreteral reflü ya da nörojenik mesane gibi fizyolojik veya anatomik nedenlere bağlı işeme bozuklukları, üriner katater kullanımı, konakta diyabetes mellitus gibi komorbiditelerin varlığı ve immünsupresyon gibi durumlar ise konağı üriner sistem enfeksiyonlarına daha yatkın hale getirir (9, 12).

Enfeksiyon oluşumunda konağın özelliklerinin yanı sıra etken mikroorganizmanın virülans özellikleri de önemli rol oynar. İYE oluşumunda rol alan bakteriler konak savunmasından korunmak ve üriner sistemde invazyonu, kolonizasyonu ve ilerlemeyi sağlamak için bir dizi virülans faktörüne sahiptirler. Bunlardan bazıları periüretral bölgeden üretere ve mesaneye hareketi sağlayan fimbria ve flagella varlığı, mesane epiteline tutunmayı kolaylaştıran adezinler, mikroorganizmanın toksin üretimi, demir alım sistemleri, kapsül yapısı ve biyofilm oluşturmalarıdır (3)

Çocukluk çağında geçirilen ya da ailede var olan İYE öyküsü, birden fazla cinsel partner varlığı, spermisid kullanımı, vulvovajinal pH ve flora değişikliği ve bununla ilişkili olarak laktobasil kolonizasyonunun azalması gibi nedenler tekrarlayan İYE ataklarına neden olabilir. Postmenapozal dönemde ise özellikle östrojen miktarının azalmasına bağlı görülen vajinal atrofi, üriner inkontinans gibi durumlar enfeksiyonun tekrarlaması açısından risk oluşturur (3, 13).

2.1.2. İdrar Yolu Enfeksiyonlarında Tedavi

Akut komplike olmayan İYE’de genellikle ilk tercih antibiyotiklerle ampirik, kısa süreli tedavi önerilir. Reçete edilen ilaçlarla tedavide başarısızlık, yüksek riskli

hastalarda enfeksiyon ya da komplike İYE durumunda ampirik tedaviye başlanmadan önce idrar kültürü alınarak, üreme olması durumunda duyarlılık testi çalışması gerekmektedir (14, 15).

İdrar yolu enfeksiyonlarının %80'inden fazlasında etken *E. coli* olduğu için antibiyotik seçiminde bu durum göz önünde bulundurulmalıdır. Ampirik tedavide tercih edilecek antibiyotiklere üropatojenlere karşı bölgesel direnç düzeyine göre karar verilmektedir. Genellikle tedavide ilk tercih edilen antibiyotikler nitrofurantoin, trimetoprim-sulfametoksazol (SXT) veya fosfomisinidir. Beta-laktamlar ve florokinolonlar ise maliyet ve artan direnç düzeyi nedeniyle ikinci sırada tercih edilir. Enfeksiyon etkeni bakteri genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) enzimi sentezliyorsa tedavide sefepim, ertapenem, meropenem ya da imipenem kullanılabilir. Bakteri karbapenemaz enzimi üretiliyorsa seftazidim-avibaktam, kolistin veya polimiksin B ile enfeksiyon tedavi edilebilir (14-16).

Semptomlarda iyileşme görüldükten sonra tekrar kültürle kanıtlanmış, semptomatik İYE gelişirse yeniden ilk tercih antibiyotiklerle kısa süreli tedavi verilir. Bu noktada tekrarlayan İYE açısından hayat tarzı değişiklikleri ve antibiyotik dışı profilaktik tedaviler (turna yemişi, D-mannoz kullanımı, östrojen içeren vajinal kremler vs.) denenebilir. Bu önlemler yeterli olmuyorsa antibiyotik profilaksisi düşünülmelidir (16). Profilakside en sık tercih edilen antibiyotikler nitrofurantoin, trimetoprim, SXT'dir. Nadiren fosfomisin ya da norfloksasin de tercih edilebilir (15).

2.1.3. Tekrarlayan İdrar Yolu Enfeksiyonu

Tekrarlayan İYE; en az 2 hafta semptomsuz olmak koşuluyla, son 6 ayda 2 veya daha fazla ya da son 1 yılda 3 veya daha fazla, kültürle kanıtlanmış İYE olarak tanımlanır (10). Bu tanımlama sadece komplike olmayan İYE için geçerlidir (14). Geçirilen ilk enfeksiyondan sonra kadınların; yaklaşık %20'sinde 6 ay içinde, yaklaşık %45'inde ise 1 yıl içinde tekrarlayan İYE gözlemlenir. Etkilenen hastaların çoğunda altta yatan herhangi bir fizyolojik veya anatomik bozukluk bulunmaz (9)

Tekrarlayan İYE; ilk epizottaki etkenden farklı bir mikroorganizma ile ortaya çıkarsa bu durum reenfeksiyon olarak adlandırılır. İlk epizottaki ile sonraki

enfeksiyondaki etkenler aynıysa ya tedavi, etkeni üriner sistemden temizlemekte başarısız olmuştur (persistan enfeksiyon) ya da kişi aynı suş ile tekrardan enfekte olmuştur (relaps) (17).

Tekrarlayan İYE vakalarının yarısından fazlasında sorumlu patojen *E. coli*'dir.

2.1.4. İdrar Yolu Enfeksiyonunda *E. coli*'nin rolü

E. coli

E. coli ilk kez 1885 yılında Alman pediatrist Theodor Escherich tarafından tanımlanmıştır (18). Enterobacteriaceae ailesine ait olan *E. coli*, gram negatif, sporsuz, flagella içeren, fakültatif anaerob bir basildir. Laktozu fermente eder. Katalaz testi pozitif, oksidaz testi negatiftir (16, 19). Kanlı agar, MacConkey agar gibi besiyerlerinde kolayca ürer.

E. coli, insanların ve omurgalı hayvanların gastrointestinal sistemlerinde kommensal olarak bulunan bir bakteridir. Kommensal suşlar konak bağışıklığında azalma ya da gastrointestinal bariyerlerde bozulma olmadıkça gastrointestinal sistemde hastalık tablosuna neden olmazlar. Bununla birlikte, bazı suşları insanlarda ve evcil hayvanlarda, intestinal veya ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olur (20). *E. coli*'nin Shiga toksini üreten *E. coli*, enteropatojenik *E. coli*, enterotoksijenik *E. coli*, enteroagregatif *E. coli*, diffüz aderan *E. coli* ve enteroinvaziv *E. coli* olarak adlandırılan altı intestinal patojen tipi vardır. Buna ek olarak bazı suşlar; sepsis, neonatal menenjit, pnömoni, osteomyelit, yumuşak doku enfeksiyonları, yara enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonları gibi bağırsak dışı hastalıklara neden olabilmektedir (19). İYE etkeni *E. coli* üropatojenik *E. coli* olarak adlandırılmaktadır.

***E. coli*'nin Filogenetik Sınıflandırması**

Clermont ve arkadaşları, PZR ile *E. coli* suşlarının 4 ana filogruba (A, B1, B2 ve D) ayrıldığını göstermiştir. Bu sınıflandırma, suşlar ve hastalıklar arasındaki ilişkinin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Ekstraintestinal enfeksiyon oluşumunda rol alan suşların en çok B2 grubuna ve ikinci sırada grup D'ye, kommensal ve intestinal patojen suşların çoğunluğunun grup A'ya ve grup B1'e ait olduğu tespit edilmiştir. Filogenetik gruplandırma multilokus enzim elektroforezi ve ribotipleme

gibi yöntemlerle yapılabilir olsa da bunlar hem zaman alıcı hem de zor uygulanabilir yöntemlerdir. Clermont ve arkadaşlarının 3 gen hedefi kullanarak tripleks PCR ile gerçekleştirdiği filogenetik sınıflandırma ise çok daha hızlı ve kolay uygulanabilmektedir. İlgili çalışmada test edilen izolatların % 99'u referans yönteme göre doğru sınıflandırılmıştır. Bu yöntemde *chuA* ve *yjaA* geni ile TspE4.C2 deoksiribonükleik asit (DNA) fragmanı spesifik primerlerle çoğaltılır ve bu genlerin varlığına ya da yokluğuna bağlı olarak incelenen izolatın filogenetik grubuna karar verilir. *chuA* geni B2 ve D grubuna ait izolatlarda bulunurken A ve B1 grubuna ait olanlarda bulunmaz. *chuA* geni bulunan izolatlarda ayrıca *yjaA* geni de mevcutsa bunlar B2 grubuna, *yjaA* geni olmayanlar ise D grubuna aittir. *chuA* geni olmayanlarda ise TspE4.C2 DNA fragmanının varlığı değerlendirilir. Bu parçayı taşıyanlar B1 grubunda, taşımayanlar ise D grubunda yer alır. (21).

Tablo 1. *chuA* ve *yjaA* geni ile TspE4.C2 DNA fragmanının PCR ile çoğaltılmasına dayanan *E. coli* filogenetik sınıflandırması (21)

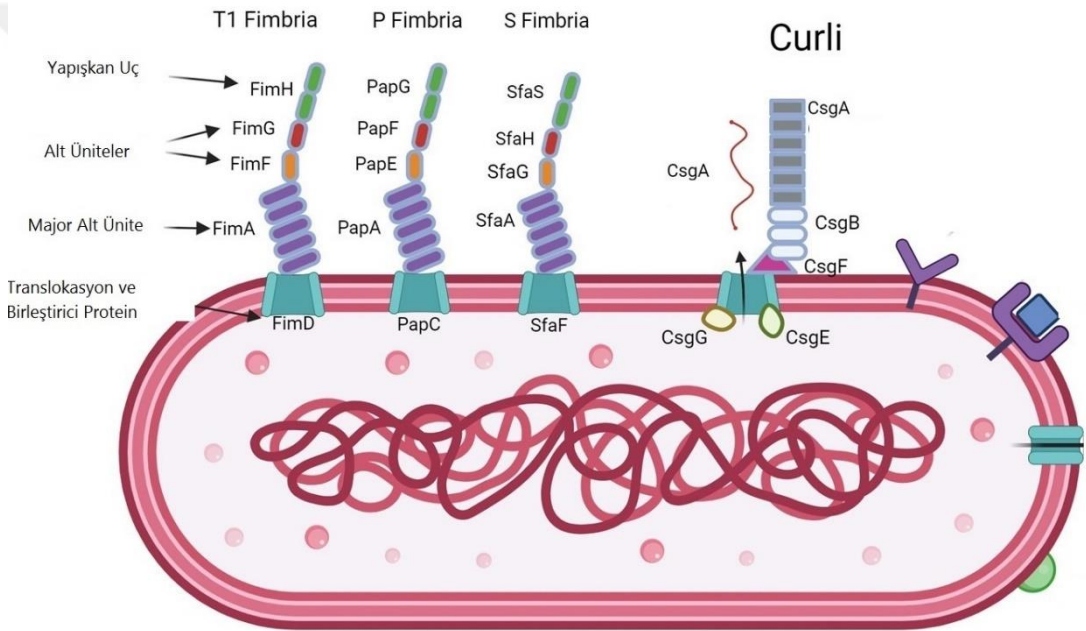
	A	B1	B2	D
<i>chuA</i>	-	-	+	+
<i>yjaA</i>	+/-	+/-	+	-
TspE4.C2	-	+	+/-	+/-

UPEC ve Biyofilm

UPEC suşlarının üriner sistemde tutunup enfeksiyon oluşturmalarını sağlayan ve patojenitesine katkıda bulunan çeşitli virülans faktörleri vardır; toksin üretimi, adezinler, demir alım sistemleri gibi. Bunlardan biri de organizmanın biyofilm oluşturma yeteneğidir. Bu suşlar genellikle, biyofilm oluşumunu kolaylaştıran tip 1 fimbria, P fimbria gibi adezinlere ve flagellaya sahiptir ve bu sayede üriner sistemde, stresli çevresel koşullar varlığında (ör: antibiyotik maruziyeti, besin açlığı vb.) biyofilm oluşturarak hayatta kalabilirler (22). Ayrıca, yapılan çeşitli çalışmalarda UPEC suşlarının ürotelyal invazyon yoluyla hücre içi biyofilm yapısı oluşturabildiği ve bu suşlarda var olan tip 1, P ve S/F1C fimbria gibi adezinlerin bu yapıya katkı

sağladığı görülmüştür (6). Bu intraselüler yapı sayesinde bakteri konak immün yanıtından kaçabilir ve İYE semptomlarına neden olabilir. Yanı sıra, rutin tanı yöntemleriyle tespit edilemez ve hedefe yönelik tedavi uygulanamaz (23). Farklı çalışmalarda hücre içi biyofilm yapısı kronik sistit ve tekrarlayan İYE tablolarının oluşması ile de ilişkilendirilmiştir (6).

Şekil 1. UPEC suşlarında varolan fimbrial adezinler (24)



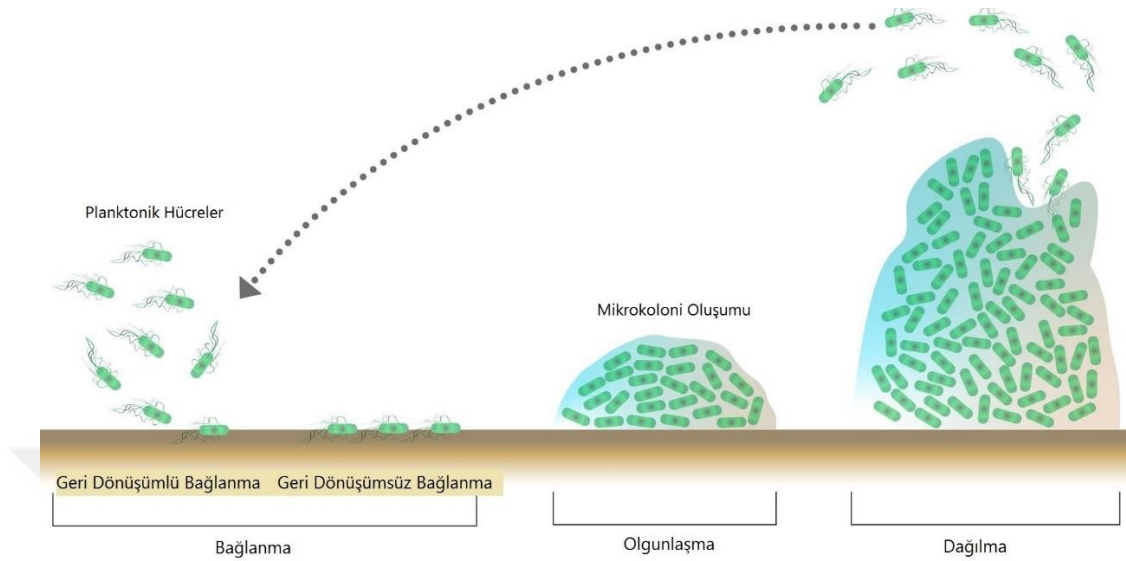
Bakteriyel biyofilmler, planktonik hücrelerin bir yüzeyle etkileşimi sonucunda yüzeye ve birbirlerine yapışarak oluşturdukları bakteri kümeleridir. Biyofilm içindeki bakteriler, kendilerini dış ortamdan ve olumsuz koşullardan koruyan bir matriks üretirler. Bu matriksin yapısında ekzopolisakkaritler, proteinler ve DNA bulunur (25). Biyofilm içindeki bakteriler, üç boyutlu biyofilm yapısını ve farklı işlevler üstlenen heterojen bakteri topluluklarını oluşturmak için birbirleriyle koordineli olarak çalışırlar (9). Koordinasyonu sağlamak için quorum sensing (QS) olarak bilinen kimyasal sinyal yolu aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurarlar. QS ile bakteri hücreleri,

hücre dışı ortama otoindükleyici maddeler salgılar ve gerekli yüksek yoğunluğa ulaşıldığında, biyofilm oluşumunu ve olgunlaşmasını düzenlerler (26)

Biyofilm içindeki bakteriler konakçı bağışıklık yanıtından kaçmak için metabolizmalarını yavaşlatabilir, böylece besin ve oksijen azlığı gibi stresli koşullara da uyum sağlayabilirler. Hücresel fonksiyonlarının azalmasıyla bakteriler, antimikrobiyallerin etkisine daha direçli hale gelir (25). Öyle ki; biyofilmi oluşturan bakterilerin antimikrobiyallere karşı direnci planktonik formdaki bakterilerin 1000 katına varabilir. Bu direncin oluşumunda biyofilm yapısının antibiyotiklerin difüzyonunu sınırlaması, biyofilm içindeki bakterilerin direnç genleri kazanımı vb. genetik değişiklere daha açık olması gibi faktörler etkilidir (17, 27, 28).

Biyofilm oluşumunun 3 temel aşaması vardır: 1. Bağlanma, 2. Olgunlaşma, 3. Dağılma. Bağlanma aşaması iki adımda gerçekleşir. İlk adımda bakteriler epitel hücreleri, insan derisi, hayvan dokuları gibi biyotik veya metal, cam, plastik, tıbbi implantlar, paslanmaz çelik gibi abiyotik yüzeylere tutunur (26). Bakteri- yüzey arasındaki çekme ve itme kuvvetleri nedeniyle yüzeye ilk bağlanma geri dönüşümlüdür. Yüzeylere zayıf bir şekilde yapışan bakterilerin çoğu dış etkiler ya da kendi hareketliliği nedeniyle yüzeyden ayrılarak planktonik faza geri dönebilir (29). İkinci adımda, bakteriler yüzeye fimbrialar gibi hücresel adezyon faktörlerinin etkisiyle daha sıkı bağlarla bağlanır ve artık ayrılamazlar, mikrokoloniler oluştururlar. Olgunlaşma aşamasında yüzeye bağlanan bakteriler üst üste birikir ve agregasyon gerçekleşir. Oluşan mikrokoloniler gelişir, çoğalır ve ekstraselüler matriks üretilir. Böylece kararlı, üç boyutlu biyofilm yapısı oluşturulur. Ototransporter proteinler ve ekstraselüler polimerik maddeler bu yapılaşmada önemli rol oynarlar. Son aşamada ise; ortam sıcaklığının değişmesi, besin ve oksijen miktarında azalma gibi değişikliklerin etkisiyle, bakteriler kümeler halinde ya da tek tek biyofilm yapısından ayrılarak planktonik forma geçiş yapabilir ve başka yüzeyleri kolonize edebilir (26, 30).

Şekil 2. Biyofilm oluşum aşamaları (30)



Tüm mikrobiyal enfeksiyonların yaklaşık % 80’inde biyofilm oluşumunun söz konusu olduğu tahmin edilmektedir. Periodontit, cihaz ilişkili enfeksiyonlar, kistik fibrozis pnömonisi, tekrarlayan tonsillit, kronik otitis media gibi enfeksiyonların yanı sıra üriner sistem ilişkili enfeksiyonlarda da biyofilm oluşumu ciddi sorun teşkil etmektedir (6, 9).

UPEC suşlarının sahip olduğu çeşitli yüzey faktörleri farklı substratlara tutunmada ve biyofilm oluşumunda etkilidir. Örneğin; bakteriye hareketlilik kazandıran flagella (*flaC* geni tarafından kodlanır) yüzeyin tanınmasına ve bakteri-yüzey arası itici kuvvetlerin üstesinden gelerek ilk bağlanmanın gerçekleşmesine katkıda bulunur. Hareket yeteneği, bağlanmanın gerçekleşmesinde ve biyofilm oluşumunda önemli olsa da zorunlu değildir. *fim* operonu tarafından sentezlenen tip 1 fimbria, hem kommensal hem de patojenik *E. coli* izolatları tarafından yaygın olarak eksprese edilen bir adezindir. Hücre yüzeyinde genellikle 100-500 adet bulunan bu fimbria, konak hücre zarındaki mannoz oligosakkaritlerini tanıyarak çeşitli hücresel yapılara bağlanmayı sağlar. Ayrıca tip 1 fimbrianın abiyotik yüzeylere bağlanmada da etkili olduğunu düşündüren çalışmalar mevcuttur. Tip 1 fimbriada bağlanmayı

sağlayan kısım *FimH* proteinidir. Curli fimbria ise, hem başlangıçtaki hücre-yüzey etkileşimlerini hem de sonraki hücre-hücre etkileşimlerini kolaylaştırarak yüzeylere tutunmada ve biyofilm oluşumunda etkili olan amiloid proteindir (29, 30). Curli fimbrianın yapısal alt birimleri *csgBAC* operonu tarafından, transportta görevli yapıları CsgEG ve regülatör protein CsgD ise *csgDEFG* operonu tarafından kodlanır. CsgD proteini ayrıca selüloz üretiminde de görev alır (27). *pap* gen kümesi tarafından sentezlenen P fimbria böbreklerin kolonizasyonu ve piyelonefrit oluşumu ile ilişkilidir (5, 9). Bununla birlikte UPEC izolatlarında patojeniteyi arttıran, S fimbria (*sfa* operonu) ve afimbrial adezinler (*afa* operonu) de bulunabilir (31). Afimbrial adezinler ve curli fimbria, bakterinin üriner sisteme yapışmasını ve rekürren İYE oluşumunu kolaylaştıran biyofilm bileşenlerindendir. *crl* geni, curli fimbriaların ana yapısal alt birimini kodlayan *csgA* geninin transkripsiyonuna katkıda bulunur (32). Ayrıca *csgD* geni de *csg* operonunun yanı sıra biyofilm üretimi ile ilişkili pek çok geni kontrol eder.

Antijen 43 (Agn 43), *E. coli* hücrelerinin dış membranında bulunan bir ototransporter adezyon proteinidir ve *flu* geni tarafından kodlanır. Biyofilm yapısındaki hücrelerin birbirine yapışmasını ve agregasyonunu sağlar, böylece biyofilm yapısının olgunlaşmasına destek olur (30). Ayrıca antijen 43'ün farklı bakteri türlerinde eksprese edildiğinde, bu farklı türlerin birlikte biyofilm oluşturmalarını desteklediğine dair kanıtlar mevcuttur (29).

Matriks yapısında bulunan ekstraselüler polimerik maddeler; çoğunluğu su olmak üzere, ekzopolisakkaritler, proteinler, nükleik asitler, lipitler, besinler ve metabolitler gibi bileşenlerden oluşur. Bu maddeler hücrelere destek sağlar ve olgun biyofilm mimarisini oluşturur. *E. coli* biyofilmi üç ana ekzopolisakkarit içerir: Poli- β -1,6-N-asetil-D-glukozamin polimeri (PGA), selüloz ve kolanik asit. PGA, *E. coli* biyofilminin oluşumunda ve korunmasında etkili bir adezin olarak görev yapar. *pgaABCD* operonu, PGA polimerlerinin sentezinde ve lokalizasyonunda görevli proteinleri kodlar. *bcsABZC* operonu ise, *E. coli* biyofilm yapısına sertlik katan selülozun sentezinde rol oynar (26).

Biyofilm matriksi, biyofilm içine gömülü bakterileri konak immun sisteminden, kurumadan, antibiyotiklerin ve toksik moleküllerin difüzyonundan korur.

Aynı zamanda enzimlerin, besinlerin ve biyofilm içinde önemli fonksiyonları olan sinyal moleküllerinin dış faktörlerin etkisiyle ortamdaki uzaklaşmasını engeller. Bu işlevleri sayesinde bakteriler antimikrobiyallere daha dirençli hale gelir ve tedavisi zor enfeksiyonlara neden olabilir (29).

***E. coli* Biyofilm Yapısının Temeli Olan Ekzopolisakkaritler**

Biyofilmin ana birleştiricisi, biyofilm içinde yerleşmiş hücreler tarafından salgılanan polisakkarit karışımıdır. Ekzopolisakkarit üretemeyen bakterilerin biyofilm oluşturmadaıkları bilinmektedir (33). *E. coli* biyofilminin ekzopolisakkaritleri PGA, selüloz ve kolanik asittir.

PGA, hücrelerin birbirine ve yüzeye yapışmasını destekler. *pgaABCD* operonu PgaA, PgaB, PgaC ve PgaD proteinlerini kodlar. PgaC ve PgaD proteinleri PGA üretiminde ve polimerizasyonunda rol alırken; PgaA ve PgaB, üretilen PGA'nın dış membrana iletilmesinden sorumludur (27).

Selüloz, β -1 $\rightarrow$ 4 lineer glikoz zincirlerinden oluşan organik bir polimerdir. Bazı bakteri türleri tarafından biyofilm yapısının bir komponenti olacak şekilde sentezlenir. Biyofilm yapısını koruyucu, destekleyici ve düzenleyici etkisi mevcuttur. Selüloz sentezinde yer alan proteinler *yhjR-bcsQABZC* ve *bcsEFG* operonları tarafından kodlanır. BcsA ve BcsB proteinleri hücre membranında yer alan ve UDP-glikozun selüloza dönüşümünü sağlayan selüloz sentaz kompleksini oluşturur (27, 34).

Kolanik asit bir kapsül polisakkaritidir ve bu nedenle, doğal olarak biyofilm yapısında yer almaktadır. *E. coli*'nin stresli çevre koşullarında hayatta kalmasına katkıda bulunur. Kolanik asit sentezinden 19 genden oluşan *wca* gen kümesi sorumludur (35).

***E. coli* ve Antibiyotik Direnci**

E. coli insanlarda hem mikrobiyotanın bir parçası hem de çeşitli enfeksiyonlara neden olan bir mikroorganizmadır. Yapılan çalışmalarda *E.coli* suşlarının çeşitli mekanizmalarla antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği gösterilmiştir. Bu durum

dirençli suşlarla gelişen enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmakta ve ciddi bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır (36).

UPEC suşlarında antibiyotik direnci plazmid, transpozon veya gen kaseti gibi mobil genetik elemanlarla direnç kazanımı, efluks pompası aktivasyonu, membran permeabilitesinde azalma, antibiyotikleri hidroliz eden enzimlerin üretimi gibi çeşitli mekanizmalarla ortaya çıkmaktadır. Beta laktam grubu antibiyotiklere direnç (ampisilin, amoksisilin, sefalosporinler gibi) çeşitli beta laktam enzimlerinin üretimiyle (TEM, SHV, CTX-M gibi) ortaya çıkabilir ve bu direnç sıklıkla plazmid ile aktarılabılır. Beta laktamaz enzimlerinin bir kısmı GSBL olarak adlandırılır. GSBL üreten suşlarda aminopenisilinlere, sefalosporinlere ve monobaktamlara dahil olmak üzere çoğu beta laktam antibiyotiğe karşı direnç gözlenir. Fakat sefamisinler ve karbapenemler direnç gözlenen grubun dışındadır. GSBL enzimi klavulanat başta olmak üzere beta laktamaz enzim inhibitörleri tarafından baskılanır (37, 38). AmpC sınıfı beta laktamazlar ise tipik olarak kromozomal kodlanan, nerdeyse tüm üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç oluşturan ve beta laktamaz inhibitörlerine dirençli enzimlerdir (39).

Karbapenemler özellikle çoklu ilaca dirençli (ÇİD) bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde tercih edilen oldukça etkili bir antibiyotik grubudur. *E. coli* suşlarında bu grup antibiyotiklere de direnç gözlenmektedir. Karbapenemlere direnç; efluks pompası ekspresyonunda artış, dış membran porinlerinin ekspresyonunda azalma veya karbapenemaz enzimi üretimi gibi mekanizmalar sonucu ortaya çıkabilir. *E. coli* suşlarında tanımlanan karbapenemaz enzimlerinden bazıları Verona integron-encoded metallo beta laktamaz (VIM), imipenamaz metallo beta laktamaz (IMP), *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz (KPC), New Delhi metallo beta laktamaz (NDM) ve Oksasilinaz- 48 (OXA-48)'dir. Genellikle karbapenemaz üretiminden sorumlu genler diğer antibiyotik sınıflarına karşı direnç oluşturan genlerle bir arada, plazmid üzerinde bulunur. (37, 40).

Florokinolonlara direnç DNA giraz ve DNA Topoizomeraz IV gibi ilaç hedeflerinde mutasyon, membran permeabilitesinde azalma, efluks pompası aracılı ilaç atımının arttırılması ve plazmid aracılı direnç genleri gibi mekanizmalarla oluşur.

Plazmidle aktarılan *qnr* genlerinin (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*) ürettiği Qnr proteinleri bakteri DNA'sındaki hedef enzimlere bağlanarak bu enzimleri kinolon grubu antibiyotiklerin etkisinden korumaktadır. Ayrıca plazmidle aktarılan diğer genlerden kinolon eflüks pompa genleri *qepA* ve *oqxAB*, modifiye aminoglikozid asetil transferaz geni *aac(6')-Ib-cr* de kinolonlara karşı direnç oluşmasına katkı sağlar (36, 37).

2.2. Bakterilerin Tiplendirilmesi

Bakteriler, organizmaları birbirinden ayırt etmek ve benzer olanları gruplandırmak için sınıflandırılır ve tanımlanır. Bakteri taksonomisinde son aşama tür düzeyinde sınıflandırmadır. Bir tür içinde suşlar ve alt gruplar oluşturdukları hastalık, çevresel yaşam alanları ve diğer birçok özellik açısından farklılık gösterebilir (41). Bu suşlar ve alt gruplar çeşitli tiplendirme yöntemleriyle ayırt edilebilir. Tiplendirme, belli bir türde birbirinden farklı organizmaların belirlenmesidir. Tiplendirme yöntemleri; salgın durumunda izolatların birbiriyle ve salgınla ilişkisini değerlendirmede, bir hastadan belli bir zaman diliminde elde edilen izolatların aynı ya da farklı oluşunu anlamada ya da çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilir (42).

Tiplendirme teknikleri temel olarak ikiye ayrılır: Fenotipik tiplendirme ve genotipik tiplendirme. Fenotipik tiplendirme yöntemleri arasında biyokimyasal reaksiyonlar, serolojik testler, biyotiplendirme, antimikrobiyal veya bakteriyofaj direnç profilleri, multilokus enzim elektroforezi ve Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ile tiplendirme yer alır. Mikroorganizmaların gen ekspresyon ürünlerinin belirlenmesi bu tekniklerin temelini oluşturur (42). Genotipik tiplendirme yöntemleri ise kromozomal ya da ekstrakromozomal genetik elemanların DNA temelli yöntemlerle test edilmesine dayanır. Bu yöntemler arasında plazmid profilleri, kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi (RFLP), multilokus sekans tiplendirme (MLST), belli bir genin ya da gen bölgesinin dizilenmesi, tekrarlayan gen dizilerini hedefleyen teknikler [Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) dizileri, repetitive extragenic palindromic (REP) dizileri vs.], random primerlere dayanan yöntemler [Randomly

amplified polymorphic DNA (RAPD), arbitrary primed PCR (AP-PCR)] ve tüm genom dizileme yer alır (42, 43).

2.2.1. Antibiyotiplendirme

İzolatların; bir ya da daha fazla antibiyotik kullanılarak test edilen *in vitro* duyarlılık paternine göre sınıflandırılmasına antibiyotiplendirme denir. Bu yöntem, antibiyogram sonuçları hızla elde edilebildiği ve ek test yapılmasını gerektirmediği için yapılan çalışmalarda halen kullanılmaktadır. Bununla birlikte antibiyotiplendirmenin temel dezavantajı direnç genlerinin ekspresyonunun değişkenliğidir. Ekspresyon düzeyleri horizontal gen aktarımından, kromozom dışı genetik elemanların kaybından veya başka düzenleyici sistemlerden etkilenebilir. Bu yüzden tiplendirme yaparken antibiyotik duyarlılık profillerinin diğer yöntemlerle kombinasyonu, faydalı ve güvenilir sonuçların elde edilmesine katkıda bulunur (42, 44)

2.2.2. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR ile Tiplendirme

PZR'ye dayalı DNA parmak izi oluşturma yöntemleri kesin, hızlı, tekrarlanabilir, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek yöntemlerdir. Bunların arasında ERIC PCR ise kolay uygulanabilen, ucuz bir yöntem olmasıyla öne çıkmaktadır (45)

ERIC dizileri ilk olarak *E. coli*, ve diğer Enterobacteriaceae üyelerinde tanımlanmıştır. 127 bp uzunluğundaki bu diziler yüksek oranda korunmuş tekrar dizileridir ve genler arası bölgelerde yer almaktadır. Bu dizilerin her suşta farklı sayıda kopyasının bulunması onları genotiplemede kullanışlı bir yöntem haline getirmektedir. ERIC primerleri ve bakteriyel genomun kalıp olarak kullanılmasıyla bu tekrarlayan diziler arasındaki bölgeler çoğaltılarak türe ve suşa özgü DNA parmak izi oluşturulabilmekte ve suşlar arasında karşılaştırma yapılabilabilmektedir. Bu yöntemin çok sayıda bakteri türünde uygulanabildiği gösterilmiştir (46, 47).

2.2.3. Arbitrary Primed PCR (AP-PCR) ile Tiplendirme

AP-PCR de ERIC gibi genotipik tiplendirme tekniklerinden biridir. Bu yöntemde primer tasarlamak için çalışılacak mikroorganizmanın DNA dizilimini

bilmeye gerek yoktur. Nükleotid dizilimi isteğe göre seçilmiş, genomda pek çok farklı noktaya bağlanabilen bir kısa (yaklaşık 8-10 baz) oligonükleotid primer kullanılır. Bu primerin genomdaki tam ya da kısmi eşleştiği bölgelere bağlanmasıyla farklı büyüklükte DNA fragmanları oluşturacak şekilde DNA dizileri çoğaltılır. Oluşan amplikonların sayısı ve uzunluğu incelenen suşa özgü bir patern oluşturur. Bu yöntem ayrıca RAPD adı da verilir. Burada oluşturulan DNA dizilerinin jel elektroforezinde görüntülenmesiyle bakterilerin genetik benzerlikleri belirlenir (48-50).

AP-PCR yönteminin en önemli avantajları basit, kolay uygulanabilir, hızlı bir yöntem olması ve çalışılacak mikroorganizmanın nükleotid dizilimi hakkında bilgi gerektirmemesidir. (50).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Tez çalışmasının etik kurul onayı, KTÜ Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 17.04.2023 tarihli 2023/80 protokol numaralı çalışma olarak verilmiştir (EK-1).

3.2. Çalışmanın Özellikleri

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uygulama ve Araştırma Merkezi (Farabi Hastanesi), Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Temmuz 2022- Şubat 2023 tarihleri arasında idrar örneklerinden izole edilen, İYE etkeni olan *E. coli* izolatlarının bazı virülans genlerinin varlığının PZR yöntemiyle araştırılması ve bu izolatların fenotipik biyofilm üretiminin Kongo kırmızılı agar ve mikrotitre plak yöntemiyle belirlenmesi amaçlandı.

İzolatlar, tekrarlayan İYE etkeni (tİYE) ve tekrarlamayan İYE etkeni (tmİYE) olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Tekrarlayan İYE etkeni grubundaki izolatların benzerliği ERIC PCR ve AP-PCR ile araştırıldı ve filogenetik gruplandırması yapıldı. İzolatların fenotipik biyofilm oluşturma özelliği ve belirlenen virülans genlerinin (*fimH*, *papC*, *sfa*, *csgA*, *csgD*, *afa*, *flu*, *bcsA*, *pgaA*, *pgaC*, *fliCH4*, *fliCH7*) varlığı araştırıldı. Bazı izolatlarda seçilen virülans genlerinin (*bcsA*, *pgaA*) mRNA düzeyleri belirlendi.

3.2.1. Çalışma Grupları

Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında idrar örneklerden izole edilen *E. coli* izolatları bu çalışmaya dahil edildi.

3.2.2. Çalışmaya Dahil Edilme/Edilmeme Ölçütleri

Çalışmaya kabul edilme kriterleri:

- Temmuz 2022 - Şubat 2023 tarihlerinde idrar kültüründe üretilen *E. coli* izolatları

- Tekrarlayan İYE etkeni grubunda; her hasta için en az 2 hafta - en çok 6 ay arayla idrar kültüründe üreyen ve antibiyotik direnç paternleri aynı olan en az 2 izolat
- Tekrarlamayan İYE etkeni grubunda; belirtilen tarih aralığında idrar kültüründe yalnızca 1 kez *E. coli* üremesi olan hastaların izolatları

Çalışmaya kabul edilmeme kriterleri:

- Tekrarlayan İYE etkeni grubunda; her hasta için 2 haftadan az arayla idrar kültüründe üreyen ve antibiyotik direnç paterni benzer olan izolatlar
- Tekrarlayan İYE etkeni grubunda; her hasta için en az 2 hafta - en çok 6 ay arayla idrar kültüründe üreyen fakat antibiyotik direnç paterni benzer olmayan izolatlar

3.3. *E. coli* İzolatlarının Üretimi ve Tanımlanması

KTÜ Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Merkezi (Farabi Hastanesi), Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Temmuz 2022 - Şubat 2023 tarihleri arasında gönderilen idrar örnekleri % 5 koyun kanlı agara ve Eozin Metilen Blue (EMB) besiyerine inoküle edildi ve aerob ortamda 36 ° C’de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında *E. coli* türlerine benzeyen kolonilere matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF) (Bruker, Almanya) ile tür düzeyinde tanımlama yapıldı.

3.4. İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları BD Phoenix M50™ (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, ABD) sisteminde üriner panel kullanılarak ya da ek olarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle test edildi. Test sonuçları EUCAST standartlarına göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak kategorize edildi (51). *E. coli* olarak tiplendirilen ve antimikrobiyal testleri çalışılan izolatların tek koloni pasajları %20 gliserollü sıvı besiyerinde -80 °C’de stoklandı.

3.5. Antibiyotiplendirme

Çalışmamızda tekrarlayan İYE grubuna dahil edilecek izolatlar için; aynı hastada belirtilen zaman aralığında en az 2 farklı idrar kültüründe *E. coli* üremesi olması ve bu iki izolatın antimikrobiyal duyarlılık testinin birbirinin aynısı ya da yalnızca bir antimikrobiyalin duyarlılığında fark olması şartı arandı. Antibiyotik direnç paternine göre seçilen bu izolatların moleküler benzerlik düzeylerinin araştırılması için genotiplendirme yapıldı.

3.6. Kromozomal DNA İzolasyonu

Kromozomal DNA izolasyonu için kaynatma yöntemi kullanıldı. % 5 kanlı agarda (Merck, Almanya) 16 – 18 saat inkübe edilen saf kültürlerden steril saf su kullanılarak 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerinde 1 ml 5 mcf bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan süspansiyon 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Pellet 1 ml steril saf su ile sulandırıldı ve iyice vortekslendi. Santrifüj ve sulandırma işlemi tekrarlandı. Kaynatma işlemi için sacayağına oturtulmuş düzenek kullanıldı. Su kaynadığında spora dizilen mikrosantrifüj tüpleri suyun içine bırakıldı ve 30 dk boyunca kaynatıldı. Daha sonra mikrosantrifüj tüpleri alınarak 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Süpernatant alınarak UV-spektrofotometrede (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, ABD) DNA konsantrasyonu ölçüldü ve sonrasında elde edilen DNA 100 µl hacim içerecek şekilde steril mikrosantrifüj tüplerinde alikotlanarak -20 ° C'de donduruldu.

Bu yöntemle izole edilen DNA'lar genotiplendirme, filogenotiplendirme ve virülans genlerinin belirlenmesinde kullanıldı.

3.7. Genotiplendirme

DNA izolasyonunu takiben izolatların benzerlikleri ERIC PCR ve AP-PCR ile araştırıldı. Her bir hastaya ait izolatların benzerlikleri kendi aralarında karşılaştırılarak izolatların genetik benzerlikleri belirlendi.

3.7.1. ERIC PCR ile İzolatların Benzerliklerinin Belirlenmesi

Tekrarlayan İYE etkeni olduğu düşünülen izolatların benzerliklerini araştırmak için Versalovic ve arkadaşlarının tasarladığı ERIC1R ve ERIC2 primerleri kullanılarak PZR gerçekleştirildi (47). Her hastanın belirtilen zaman aralığında idrar kültüründe üretilen tüm izolatları çalışmaya dahil edildi. Kullanılan primerler Tablo 2’de, PZR koşulları Tablo 3’te verilmiştir. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi sonrası UV transilüminatörde görüntülendi ve bant paternleri değerlendirildi. Bant paterni aynı olanlar AP-PCR ile tekrar genotiplendirildi.

3.7.2. AP – PCR ile İzolatların Benzerliklerinin Belirlenmesi

Daha önce ERIC PCR ile bant paterni aynı olan hasta izolatlarıyla, Madico ve arkadaşları tarafından kullanılan ‘1247’ isimli primer ile AP-PCR gerçekleştirildi (52). Kullanılan primer Tablo 2’de, PZR koşulları Tablo 3’te verilmiştir. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi sonrası UV transilüminatörde görüntülendi ve bant paternleri değerlendirildi. Bant paterni aynı olan izolatlar tekrarlayan İYE etkeni grubuna dahil edildi.

3.8. Filogenotiplendirme

E. coli suşlarının filogenetik sınıflandırması için *chuA* ve *yjaA* geni ile TspE4.C2 DNA fragmanına özgü primerler kullanılarak, Clermont ve arkadaşlarının önerdiği tripleks PZR yöntemiyle gerçekleştirildi (21). PZR ürünleri agaroz jelde elektroforez edildi. Bu yöntemle bant paternleri değerlendirilerek izolatlar Tablo 1’de belirtilen özelliklere göre 4 ana filogruba ayrıldı (A, B1, B2, D).

3.9. Virülans Genlerinin Belirlenmesi

Biyofilm üretimi ile ilişkili olduğu belirlenen *fimH*, *papC*, *sfa*, *csgA*, *csgD*, *afa*, *flu*, *bcsA*, *pgaA*, *pgaC*, *fliCH4* ve *fliCH7* genlerinin varlığı her bir gene özgül primerler kullanılarak PZR yöntemiyle araştırıldı. Referans çalışmalardaki koşullar optimize edilerek uygulandı. Kullanılan primerler ve PZR ürünlerinin bant büyüklükleri Tablo 2’de, PZR koşulları Tablo 3’te listelendi.

Tablo 2. PZR’de kullanılan primer dizileri

Primer	Nükleotid dizisi (5’->3’)	Hedef Gen	Ürün Büyüklüğü (bp*)	Referans
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC			(47)
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG			
1247	AAGAGCCCGT			(52)
ChuA-1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	<i>ChuA</i>	279	(21)
ChuA-2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
YjaA-1	TGAAGTGTGAGGAGACGCTG	<i>YjaA</i>	211	(21)
YjaA-2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC			
TspE4C2-1	GAGTAATGTGCGGGCATTCA	<i>TspE4C2</i>	152	(21)
TspE4C2-2	CGCGCCAACAAAGTATTACG			
fimH-F	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	<i>fimH</i>	508	(53)
fimH-R	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA			
papC-F	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	<i>papC</i>	203	(53)
papC-R	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA			
sfa-F	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	<i>sfaD, sfaE</i>	410	(54)
sfa-R	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA			
csgA-F	GGGCTCAGATGACAGCTCAATC	<i>csgA</i>	76	(55)
csgA-R	GCCGTTCCACTGATCAAGAGTAG			
csgD-F	ACAGCTCTCTTGCAGCACCT	<i>csgD</i>	214	(55)
csgD-R	ACGGGTAATCTTCAGGCGTA			
afa-F	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC	<i>afaB, afaC</i>	750	(54)
afa-R	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG			
flu-F	GGGTAAAGCTGATAATGTGCG	<i>flu</i>	508	(56)
flu-R	GTTGCTGACAGTGAGTGTGC			
bcsA-F	GCTTCTCGGCGCTAATGTTG	<i>bcsA</i>	826	(57)
bcsA-R	GAGGTATAGCCACGACGGTG			
pgaA-F	AGGGACTGCGCATTGATTAC	<i>pgaA</i>	195	(55)
pgaA-R	GTTACGTTTCGACAACATCG			
pgaC-F	ATGATTAATCGCATCGTATCG	<i>pgaC</i>	540	(55)
pgaC-R	CATCGGTTCCACAATATATG			
fliCH4-F	CTGGGGGTAAACAAGTCAA	<i>fliCH4</i>	192	(58)
fliCH4-R	CCAGTGCTTTTAACGGATC			
fliCH7-F	CGACAGGTCTTTATGATCTGA	<i>fliCH7</i>	91	(58)
fliCH7-R	ACTGTGACTTTATCGCCATT			

q-ARN16S-F	TTGACATCCACGGAAGTTTT	16S rRNA 173	(59)
q-ARN16S-R	TGGCAGTCTCCTTTGAGTTC		

*bp: Baz çifti

PZR reaksiyonlarında kullanılan tüm primerler üretici firmanın önerilerine göre sulandırılarak 100 pmol/μl stok solüsyonu ve 10 pmol/μl çalışma solüsyonu elde edildi. Stok solüsyonları -80° C’de, çalışma solüsyonları -20° C’de saklandı.

Tüm reaksiyonlarda total hacim 25 μl için; 12,5 μl 2X PCR Mastermix (Key Reserch R&D Lab Consumables, Türkiye), her bir primerden ERIC PCR ve AP – PCR’de 20 pmol, filogenetik sınıflandırmada 5 pmol, virülans genlerinin gösterilmesinde 10 pmol alınıp, 5 μl kalıp DNA eklenerek kalan hacim steril deiyonize su ile tamamlandı. PZR işlemi thermal cycle cihazı (Techne Thermal Cycler TC-512, Fisher Scientific, Birleşik Krallık) kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 3. PZR reaksiyon şartları

	İlk Denatürasyon (°C / dk)	Denatürasyon (°C / sn)	Bağlanma (°C / sn)	Uzama (°C / sn)	Son Uzama (°C / dk)	Döngü Sayısı
ERIC	94 / 3	94 / 30	52 / 60	72 / 60	72 / 5	35
AP - PCR	95 / 2	95 / 60	36 / 60	72 / 120	72 / 4	45
Filogenetik sınıflandırma	94 / 5	94 / 30	55 / 30	72 / 30	72 / 7	30
<i>fimH</i>	95 / 4	94 / 30	58 / 15	72 / 15	72 / 8	35
<i>papC</i>	95 / 4	94 / 30	60 / 55	72 / 45	72 / 8	33
<i>sfa, afa</i>	95 / 3	94 / 15	63 / 30	72 / 180	72 / 1	30
<i>csgA, csgD</i> <i>pgaA, pgaC</i>	94 / 1,5	94 / 30	55 / 30	72 / 60	72 / 7	30

<i>flu</i>	95 / 3	94 / 30	50 / 30	72 / 60	72 / 5	30
<i>bcsA</i>	95 / 3	94 / 30	60 / 30	72 / 60	72 / 5	30
<i>fliCH4,</i> <i>fliCH7</i>	95 / 3	94 / 30	52 / 30	72 / 30	72 / 5	30

3.10. Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifikasyon sonrasında ERIC PCR ve AP – PCR ürünlerini görüntülemek için % 1.2 ‘lik, diğer PZR ürünleri için % 2’lik agaroz jel kullanıldı. Jel hazırlanırken 0,5 x yoğunlukta Tris – Borik asit – EDTA (TBE) tamponu kullanıldı. Gerekli miktarda agar (SeaKem® LE Agarose, Lonza Inc, İsviçre) hassas terazide tartıldı. Behere önce tampon çözelti koyuldu, üzerine tartılan agar eklendi ve çalkalanarak karıştırıldı. Beherin üzeri plastik bir kapakla kapatıldı ve mikrodalga fırında eritildi. Daha sonra 50 – 55 °C’ye kadar soğutuldu, içine 0,5 mcg / ml konsantrasyonda olacak şekilde etidyum bromür (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya) eklendi ve boyanın iyice homojenize olması sağlandıktan sonra jel, içine tarak yerleştirilmiş olan jel tepsisine döküldü ve oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk kadar katılaşması için bekletildi. Katılaşan jel alınarak içinde 0,5 x yoğunlukta TBE içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Jelde bulunan kuyucuklara 5 – 8 µl kadar PZR ürünü pipetlendi. Daha sonra tank güç kaynağına bağlandı ve 75 voltta yaklaşık 60 – 75 dk elektroforez edildi. Bantlar ultraviyole transillüminatörde (UVP Vilber Lourmat, Almanya) görüntülendi ve dijital görüntüleme cihazı ile (Kodak Gel Logic Imaging System, Kaliforniya, ABD) fotoğrafı çekildi.

3.11. Ekzopolisakkarit Genlerinin mRNA Düzeylerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, biyofilmin kapsül dışındaki polisakkarit yapısını oluşturan PGA ve selülozün sentezinde rol oynayan genlerin ekspresyonundaki değişikliklerin, idrar yolu enfeksiyonlarının tekrarlamasındaki rolleri bu genlerin mRNA düzeyleri karşılaştırılarak belirlendi. Bu amaçla, *bcsA* ve *pgaA* genleri özgül primerler ve SYBR-green boyası içeren master miks kullanılarak RT-PCR yöntemiyle termal döngü

cihazında (LightCycler 480 System, Roche Molecular Systems, ABD) amplifiye edildi. Bakteri örneklerinin hazırlanması, ribonükleik asit (RNA) izolasyonu ve komplementer DNA (cDNA) sentezi sırasında oluşabilecek varyasyonları normalize etmek için referans olarak 16S ribozomal RNA (rRNA) transkriptleri kullanıldı.

3.11.1. Bakteri Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için her izolattan 2-3 saf bakteri kolonisi 2 ml steril Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine (Condalab, İspanya) inoküle edildi. 36 °C’de çalkalamalı etüvde 120 rpm çalkalama hızında, aerob koşullarda 24 s inkübe edildi. Bu bir gecelik bakteri kültüründen 250 µl alınarak daha sonra total RNA izolasyonu yapılmak üzere mikrosantrifüj tüplerinde -80° C’de donduruldu.

Total RNA izolasyonu için EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-preps Super Kit (Bio Basic Inc., Kanada) kullanıldı. Üretici firma önerileri doğrultusunda, daha önce dondurularak saklanmış olan 250 µl bakteri solüsyonu alındı, çözündükten sonra 6000 x g’de 4° C’de 3 dk santrifüj edildi. Lizozim içeren TE solüsyonundan mikrosantrifüj tüpüne 100 µl eklendi ve 37° C’de 3-5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sırasında birkaç defa alt-üst edildi. Daha sonra tüpe 350 µl RLT solüsyonu eklenerek iyice karıştırıldı. 6000 x g’de santrifüj edildi ve süpernatant saklandı. Süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı, her bir tüpün üzerine 260 µl % 99.9 etanol eklendi ve alt-üst edilerek karıştırıldı. EZ-spin column tüpleri 2 ml’lik toplama tüplerine yerleştirildi ve bir önceki adımda oluşturulan karışım bu kolona aktarıldı. 6000 x g’de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı döküldü ve kolon tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirildi. Daha sonra kolona 500 µl RW solüsyonu eklendi, 6000 x g’de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı döküldü ve kolon tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 500 µl RPE solüsyonu eklendi ve 6000 x g’de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı döküldü ve kolon tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirildi. RPE solüsyonu kalıntısı kalmaması için bir kez daha 6000 x g’de 1 dk santrifüj edildi. Kolon, temiz ve RNAaz içermeyen 1.5 ml’lik yeni bir mikrosantrifüj tüpünün içine alındı. Kolondaki membranın ortasından 50 µl RNAaz içermeyen su eklendi. 50° C’de 2 dk inkübe edildi ve 8000 x g’de 1 dk santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüpünde toplanan RNA’nın konsantrasyonu UV-spektrofotometrede

(Nanodrop 2000, Thermo Scientific, ABD) ölçölüp kaydedildi ve tüpler daha sonra cDNA sentezi yapılmak üzere -80° C’de saklandı.

3.11.2. İzole Edilen Total RNA’dan cDNA Sentezi

cDNA sentezi için RNA örnekleri ve deney bileşenleri buz üzerinde eritildi ve hafifçe karıştırılarak hazır hale getirildi. cDNA sentezinde cDNA sentez kiti kullanıldı (Key Reserch R&D Lab Consumables, Türkiye). Tüm çalışma üretici firma önerileri doğrultusunda ve buz üzerinde gerçekleştirildi. Çalışmada 20 µl’lik total reaksiyon hacmi için; 1 µl cDNA enzim mix, 4 µl cDNA reaksiyon buffer (dNTPs, random hexamer primerler ve oligo(dT)18 primerleri içeren), 4 µl total RNA ve 11 µl nükleaz içermeyen su kullanıldı.(bu kısım key research lab protokolü) Hazırlanan reaksiyon karışımı hafifçe karıştırıldı ve kısa süre santrifüj edildi. Sentez işlemi için thermal cycle cihazı (Techne Thermal Cycler TC-512, Fisher Scientific, Birleşik Krallık) kullanıldı. Örnekler 42°C’de 1 saat, ardından 80° C’de 10 dk tutuldu. Daha sonra buz üzerine alındı ve cDNA’lar nükleaz içermeyen su kullanılarak 60 µl’ye dilüe edildi, -80°C’de saklandı.

3.11.3. RT-PCR ile mRNA Düzeyinin Belirlenmesi

RT-PCR, floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresan ışımanın amplifiye olan DNA miktarı ile arttığı bir yöntemdir (60). PZR’nin ilk döngülerinde temel seviyede bir floresan ışımaya görülür. Bu temel seviye, eşik değeri döngüsünü (cycle threshold, CT) belirlemede yardımcı olur. Eşik değeri; floresan ışımadaki temel sinyal seviyesine göre anlamlı artışın yaşandığı sinyal seviyesidir. CT ise sinyalin eşik değeri geçmesi için gerekli olan döngü sayısıdır (61). Çakışma noktası (crossing point, Cp) ise amplifikasyon sırasında floresan sinyal artışının en yüksek olduğu nokta, yani amplifikasyonun logaritmik olarak lineerleştiği kısmın tam orta noktası olarak bilinmektedir.

Çalışmamızda *bcsA*, *pgaA* ve referans olarak 16S rRNA genlerinin ekspresyon seviyeleri üreticinin yönergelerine göre SYBR-green boyası içeren master miks kullanılarak *bcsA-F/bcsA-R*, *pgaA-F/pgaA-R* ve q-ARN16S-F/ q-ARN16S-R primer çiftleri ile belirlendi (Tablo 2). Tüm reaksiyonlarda total hacim 25 µl için; 12,5 µl 2X

SYBR green PCR mix (Hibrogen, Türkiye), 0,5 µl (5 pmol) her bir primerden, 5 µl kalıp cDNA ve 6,5 µl nükleaz içermeyen su kullanıldı. RT-PCR reaksiyonu LightCycler 480 System (Roche Molecular Systems, ABD) cihazında gerçekleştirildi. Her bir izolat için 3 ayrı reaksiyon gerçekleştirildi. RT-PCR sonunda amplifikasyonların değerlendirilmesi için LightCycler 480 Abs Quant/Fit Points yazılımı kullanıldı. LightCycler 480 kullanım kılavuzunda Cp değerinin CT değeri ile eş anlamlı olduğu ve ölçümlerde Cp değeri kullanıldığı ifade edildiğinden analiz sonucu elde edilen Cp değerleri CT değeri olarak kabul edildi ve üç reaksiyon sonucu oluşan CT değerlerinin ortalaması alınarak her bir izolatın CT değeri belirlendi.

SYBR green çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan bir boyadır ve PCR sonunda oluşan ürün miktarının floresan ışımaya ölçümüyle değerlendirilmesini sağlar. Fakat çift zincirli DNA dışında primer dimerleri ya da reaksiyona özgül olmayan amplikonlara da bağlanabildiği için RT-PCR reaksiyonunun özgüllüğünün değerlendirilmesi ihtiyacı ortaya çıkar.

Çift zincirli DNA'nın yarısının ayrılarak tek zincire dönüştüğü sıcaklık erime noktasıdır (melting temperature, T_m). T_m, çift zincirli DNA'nın sekansı, uzunluğu ve G-C oranına bağlıdır. T_m sıcaklığının ölçülmesi RT-PCR ile elde edilen amplikonların özgüllüğünün değerlendirilmesinde kullanılabilir (62). Çalışmamızda bu amaçla RT-PCR reaksiyonu sonunda erime eğrisi (melting curve) analizi yapıldı. RT-PCR için reaksiyon koşulları Tablo 4'te gösterildi. Erime eğrisi analizi için 95°C'de amplifikasyon sonundaki çift zincirlerin birbirinden ayrılması sağlandıktan sonra 60°C'de 1 dakika bekleterek zincirlerin tekrar birleşmesi sağlandı ve 97°C'ye kadar ısıtma işlemi yapıldı. Her bir derece ısı artışında toplam beş defa floresan ölçümü yapıldı. Bu ölçümlerle amplifikasyon ürününün kendine özgü erime sıcaklığı belirlendi.

Hedef genlerin (*bcsA*, *pgaA*) ekspresyon ölçümleri ile 16S rRNA geninin ekspresyon ölçümü oranlanarak normalizasyon işlemi gerçekleştirildi. *pgaA* geninin normalizasyonu için *E. coli* ATCC 25922 suşu referans örnek seçildi ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanıldı. *E. coli* ATCC 25922 suşu *bcsA* geni içermediği için aynı formül bu gen için

uygulanamadı. *bcsA* geninin ekspresyon düzeyi değerlendirilirken yalnızca ΔCT kullanıldı.

$$\Delta CT = CT(\text{hedef gen}) - CT(\text{referans gen})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{hedef örnek}) - \Delta CT(\text{referans örnek})$$

Tablo 4. RT-PCR reaksiyon koşulları

		16S rRNA	<i>bcsA</i>	<i>pgaA</i>
İlk Denatürasyon (°C / dk)		95 / 1	95 / 1	95 / 1
Amplifikasyon	Denatürasyon (°C / sn)	95 / 10	95 / 10	95 / 10
	Bağlanma (°C / sn)	60 / 15	60 / 20	55 / 20
	Uzama (°C / sn)	72 / 20	72 / 60	72 / 25
	Siklus	30	30	30
	(°C / sn)	95 / 5	95 / 5	95 / 5
Melting Curve	(°C / dk)	60 / 1	60 / 1	60 / 1
	(°C)	97	97	97
Soğutma (°C / sn)		40 / 30	40 / 30	40 / 30

3.12. İzolatların Fenotipik Biyofilm Üretiminin Saptanması

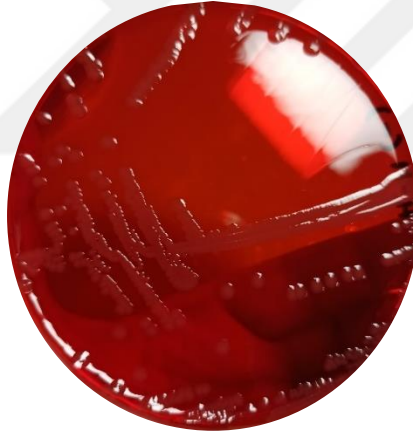
İzolatların biyofilm üretimi hem Kongo kırmızılı agar kullanılarak hem de mikrotitre plak yöntemiyle hesaplandı.

3.12.1. Kongo Kırmızılı Agarda Biyofilm Üretiminin Saptanması

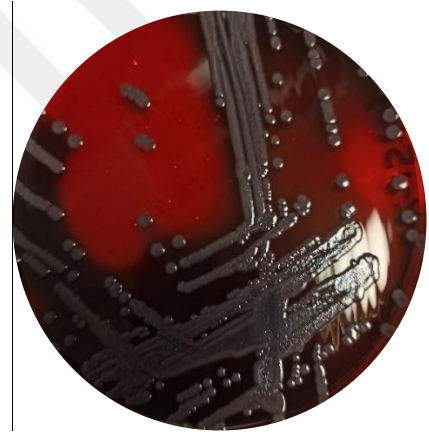
Biyofilm oluşumunun kalitatif tespiti için Kongo kırmızılı agar kullanıldı. 1 litre distile suya 49 g beyin kalp infüzyon agar (Lab M Ltd., Birleşik Krallık), 50 g

sükroz (Merck, Almanya) ve 0,8 g Kongo kırmızısı eklenerek besiyeri hazırlandı. Kongo kırmızısı ayrı bir çözelti olarak hazırlandı. Besiyeri ve Kongo kırmızısı otoklavda 121 °C’de 15 - 20 dk ayrı steril edildi ve agar 55 °C’ye soğuduğunda karıştırılarak uygun koşullarda petrilere döküldü. Biyofilm oluşumunu değerlendirmek için bakterilerin saf kolonisi alınarak hazırlanan agarlara inoküle edildi ve aerop koşullarda 36 °C’de 24 s inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaklar etüvden çıkarılarak oda sıcaklığında 48 s bekletildi ve bu sürenin sonunda biyofilm oluşumu değerlendirildi. Kuru kristal kıvamında siyah koloniler biyofilm üretimi pozitif, pembe – kırmızı renkte koloniler biyofilm üretimi negatif olarak yorumlandı (63).

Şekil 3. Kongo kırmızılı agarda biyofilm üretimi



A. Kongo kırmızılı agarda
biyofilm üretimi negatif
koloniler

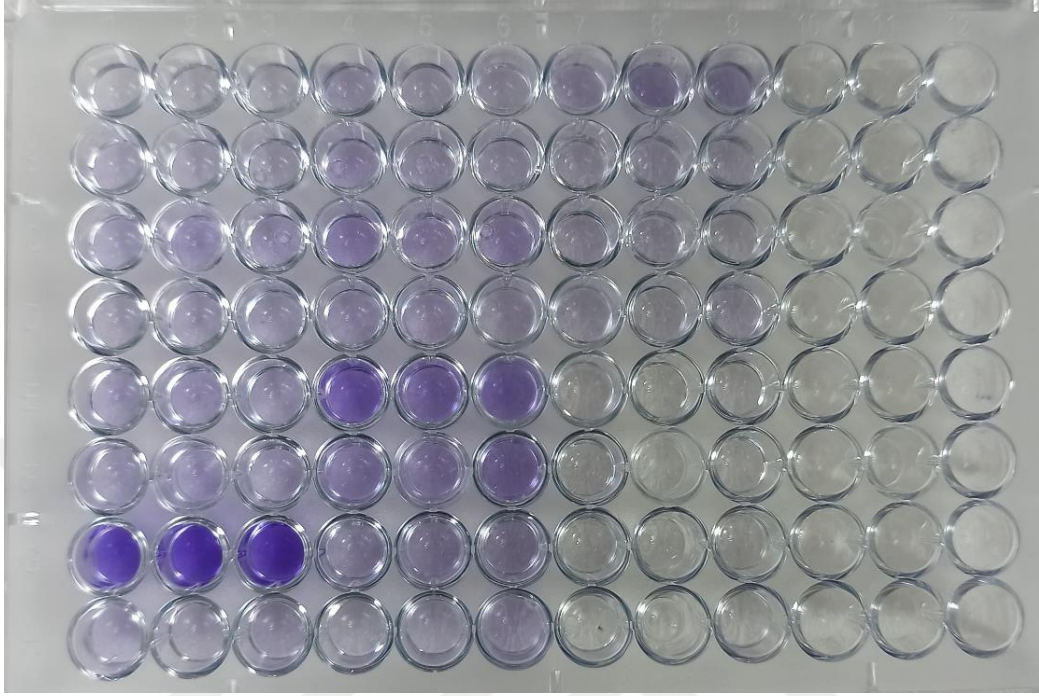


B. Kongo kırmızılı agarda
biyofilm üretimi pozitif
koloniler

3.12.2. Mikrotitre Plak Yöntemiyle Biyofilm Üretiminin Saptanması

Mikrotitre plak yöntemi ile biyofilm deneyi U tabanlı 96 kuyucuklu plakta referans yöntem modifiye edilerek gerçekleştirildi. Deney için 2-3 saf bakteri kolonisi 2 ml steril LB sıvı besiyerine (Condalab, İspanya) inoküle edildi. 36 °C’de çalkalamalı etüvde 120 rpm çalkalama hızında, aerop koşullarda 24 s inkübe edildi. Bir gecelik kültürden 10 µl alınarak taze LB sıvı besiyerinde 1: 100 oranında dilüe edildi. Bu dilüsyondan 100 µl alındı ve steril mikrotitre plak kuyucuklarına aktarıldı ve plağın kapağı kapatılarak aerop koşullarda 36 °C’de 48 s inkübe edildi. Her suş için 3 kuyucuk kullanıldı. İnkübasyon sonunda kuyucukların içeriği nazıkçe döküldü ve kuyucuklar steril fosfat tamponlu salin (PBS) ile 3 kere yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 µl metanol (% 99.9 saflıkta) eklenerek oluşan biyofilm yapısı oda sıcaklığında 15 dk tespit edildi. Sonrasında kuyucuklar steril PBS ile 1 kere yıkandı. Kuyucuklara 125 µl % 0.1 kristal viyole eklendi, 15 dk sonunda kuyucuklar steril PBS ile 3 kez yıkandı ve oda sıcaklığında bir gece kurumaya bırakıldı. Daha sonra 125 µl %30 asetik asit çözeltisi ile boya çözüldü. Kuyucukların içeriği yeni bir steril plağa aktarıldı ve her kuyucuğun optik dansitesi (OD) 550 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, CA, ABD) ölçüldü. Negatif kontrol olarak steril LB sıvı besiyeri kullanıldı (64).

Şekil 4. Mikrotitre plak yöntemiyle biyofilm üretimi



Sonuçların değerlendirilmesinde Stepanovic ve arkadaşları (65) tarafından belirlenen kriterler kullanıldı (Tablo 5). OD_c değeri her plak için ayrı ayrı hesaplandı.

Tablo 5. Mikrotitre plak yöntemiyle biyofilm üretiminin değerlendirilmesi

Ortalama OD değeri	Biyofilm üretimi	Biyofilm Derecesi
$OD_{MB} \leq OD_c$	Yok	0
$OD_c < OD_{MB} \leq 2x OD_c$	Zayıf	I
$2x OD_c < OD_{MB} \leq 4x OD_c$	Orta	II
$4x OD_c < OD_{MB}$	Güçlü	III

OD_{MB}: Mikroorganizma biyofilminin optik dansitesi, Optik dansite cut-off değeri (OD_c) = Negatif kontrolün ortalama OD'si + 3x negatif kontrolün standart sapması (SD)

3.13. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler MS-Excel programına aktarıldı. Verilerin analiz aşamasında SPSS 26.0 istatistik paket programı kullanıldı. Değerlendirme sonuçlarının tanımlayıcı istatistikleri; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde, sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, ortanca, 1. ve 3. çeyreklik (Q1-Q3) olarak verildi. Grupların normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi. Bağımsız iki grup arasında sayısal değişkenlerin karşılaştırmaları; normal dağılım koşulu sağlandığında Student T testi; sağlanmadığında Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Bağımsız kategorik verilerin karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanıldı. İstatistiksel alfa önemlilik seviyesi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İzolatların Birimlere Göre Dağılımı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Merkezi (Farabi Hastanesi), Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Temmuz 2022-Şubat 2023 tarihleri arasında 2230 hastadan elde edilen 3094 idrar örneği kültüründe *E.coli* üremesi mevcuttu ve bu izolatlar gliserollü sıvı besiyerinde stoklandı. Bunlar arasında tekrarlayan İYE etkeni tanımına uyan, 278 hastaya ait 556 izolat TEC 1, TEC 2 (tekrarlayan *E. coli*) şeklinde numaralandırılarak stoklandı. Tekrarlayan İYE etkeni grubunu oluşturmak amacıyla tanıma uyanlar arasından rastgele seçilmiş 87 hastaya ait 197 *E.coli* izolatına; her hastaya ait izolatların genetik benzerliğini kendi aralarında değerlendirmek amacıyla ERIC PCR yapıldı. ERIC PCR sonucunda 62 hastaya ait izolatların bant paternleri aynı bulundu. Daha sonra bu 62 hastaya ait izolatların benzerliği AP-PCR yöntemiyle yeniden değerlendirildi ve 57 hastaya ait izolatların bant paternlerinin birbiriyle aynı olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak başlangıçta çalışmaya alınan 87 hastaya ait izolatlardan 57 hastanın izolatlarının birbiriyle aynı olduğu tespit edildi (%65,5). Bunlardan 54 hastaya ait suşlar rastgele seçildi. Her hastayı 1 suş temsil edecek şekilde 54 suştan tekrarlayan İYE etkeni grubu oluşturuldu. 54 hastanın 34'ü kadın (%63), 20'si erkekti (%37). Stoklanmış tekrarlamayan İYE etkeni tanımına uyan *E.coli* izolatları TMEC 1, TMEC 2 (tekrarlamayan *E. coli*) şeklinde numaralandırılarak stoklandı. Daha sonra bu stoktan 54 izolat, 34 kadın ve 20 erkek hastaya ait olacak şekilde rastgele seçilerek tekrarlamayan İYE etkeni grubu oluşturuldu.

Tekrarlayan İYE etkeni grubundaki hastaların yaş ortalaması $53,6 \pm 27,4$ (2-96), tekrarlamayan İYE grubundaki hastaların yaş ortalaması ise $59 \pm 27,2$ (2-93) idi.

Hastaların klinik birimlere göre dağılımı Tablo 6'da gösterildi. Tekrarlayan İYE etkeni grubunda pediatri servislerinden gelen 1 izolat (%1,9), pediatri polikliniklerinden 7 izolat (%13); tekrarlamayan İYE grubunda pediatri servislerinden gelen 0 izolat (%0), pediatri polikliniklerinden 7 (%13) izolat vardı.

Tablo 6. İdrarında *E. coli* izole edilen hastaların klinik birimlere göre dağılımı

Örnek Alınan Klinik Birimler	tİYE Grubu		tmİYE Grubu	
	n	%	n	%
Dahili Bilimler Servisleri	4	7,4	4	7,4
Dahili Bilimler Poliklinikleri	22	40,7	27	50
Cerrahi Bilimler Servisleri	4	7,4	2	3,7
Cerrahi Bilimler Poliklinikleri	23	42,6	20	37
YBÜ	1	1,9	1	1,9
Toplam	54	100	54	100

tİYE: Tekrarlayan İYE etkeni grubu, tmİYE: Tekrarlamayan İYE etkeni grubu, YBÜ: Yoğun bakım ünitesi

4.2. İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılıkları

Çalışmamızdaki *E. coli* izolatlarının fosfomisin, nitrofurantoin, trimethoprim-sulfametoksozol, amoksisilin-klavulanik asit, siprofloksasin levofloksasin, seftriakson, sefiksime, imipenem, meropenem ve ertapenem antimikrobiyalleri için BD Phoenix™ otomatize sistemi ile belirlenen antimikrobiyal MİK değerleri EUCAST sınır değerlerine göre yorumlanarak antimikrobiyal duyarlılık kategorileri Tablo 7 ve Tablo 8’de belirtildi.

Tablo 7. Tekrarlayan İYE etkeni *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları

Suş No	SXT	AMC	CIP	LEV	CRO	CFM	GSBL
TEC 1	R	R	R	R	S	R	-
TEC 5	R	S	R	R	R	R	+
TEC 9	R	R	R	R	S	R	-
TEC 11	R	S	R	R	R	R	+
TEC 13	S	R	R	R	R	R	+
TEC 15	S	S	S	S	S	S	-
TEC 21	R	R	I	S	R	R	-
TEC 23	R	S	S	S	R	R	+
TEC 25	S	S	S	S	S	S	-
TEC 27	R	S	R	R	S	S	-
TEC 29	R	R	S	S	S	R	+
TEC 31	S	R	R	R	R	R	+
TEC 34	R	S	S	S	S	S	-
TEC 35	S	S	S	S	S	S	-
TEC 37	S	R	S	S	S	R	-
TEC 39	S	R	R	R	R	R	+
TEC 41	R	R	S	S	S	S	-
TEC 43	R	R	R	R	R	R	-
TEC 54	S	S	S	S	S	S	-
TEC 55	S	S	S	S	S	S	-
TEC 59	R	S	R	R	R	R	+
TEC 61	R	R	R	R	R	R	+
TEC 64	R	R	S	S	S	S	-
TEC 65	S	R	R	R	R	R	+
TEC 67	S	S	S	S	S	S	-
TEC 69	R	R	R	R	R	R	+
TEC 73	S	S	S	S	S	S	-
TEC 75	S	R	R	R	R	R	+
TEC 79	R	R	R	R	R	R	+
TEC 85	R	S	R	R	R	R	+
TEC 93	R	R	I	S	R	R	-
TEC 95	S	S	S	S	S	S	-

TEC 99	S	S	S	S	S	S	-
TEC 101	R	R	R	R	R	R	+
TEC 103	S	R	I	I	S	R	+
TEC 107	S	R	R	R	R	R	+
TEC 109	S	S	S	S	S	S	-
TEC 111	S	S	S	S	S	S	-
TEC 119	R	R	S	S	S	S	-
TEC 121	S	S	S	S	S	S	-
TEC 127	S	S	S	S	S	S	-
TEC 133	R	S	I	S	R	R	+
TEC 139	S	R	S	S	S	R	-
TEC 141	S	S	S	S	S	S	-
TEC 145	S	S	S	S	S	S	-
TEC 147	R	R	R	R	R	R	+
TEC 149	R	R	R	R	R	R	+
TEC 153	S	R	S	S	S	R	-
TEC 159	R	R	R	R	R	R	+
TEC 162	R	S	R	R	R	R	+
TEC 163	R	R	R	R	S	S	-
TEC 167	R	S	R	R	R	R	+
TEC 169	R	R	R	R	S	R	-
TEC 171	S	S	S	S	S	S	-

SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, CRO: Seftriakson, CFM: Sefiksim. GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretimi, S: Duyarlı, standart doz; I: Duyarlı, yüksek doz; R: Dirençli, +: Pozitif, -: Negatif

Tablo 8. Tekrarlamayan İYE etkeni *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları

Suş No	SXT	AMC	CIP	LEV	CRO	CFM	GSBL
TMEC 2	S	S	I	I	S	S	-
TMEC 4	R	S	I	S	R	R	+
TMEC 5	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 6	S	S	S	S	S	S	-

TMEC 7	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 8	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 9	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 10	S	S	R	R	S	S	-
TMEC 14	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 15	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 19	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 20	S	R	R	R	S	S	-
TMEC 21	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 22	S	R	S	S	R	R	+
TMEC 23	R	R	R	R	R	R	-
TMEC 24	R	S	R	R	S	S	-
TMEC 25	R	S	S	S	S	S	-
TMEC 26	R	R	R	R	R	R	+
TMEC 27	R	R	S	S	S	R	-
TMEC 29	R	R	I	I	S	S	-
TMEC 30	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 31	S	R	S	S	S	R	-
TMEC 32	S	R	S	S	S	S	-
TMEC 33	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 35	S	R	S	S	S	S	-
TMEC 36	R	R	R	R	R	R	-
TMEC 37	R	R	S	S	S	S	-
TMEC 38	S	R	R	R	R	R	+
TMEC 39	R	S	S	S	S	S	-
TMEC 41	R	S	R	R	S	S	-
TMEC 43	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 44	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 45	R	R	S	S	S	S	-
TMEC 46	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 47	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 48	R	S	R	R	R	R	+
TMEC 51	S	S	R	R	S	R	-
TMEC 52	S	R	S	S	R	R	-

TMEC 53	S	R	S	S	S	R	-
TMEC 54	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 55	S	R	S	S	S	R	-
TMEC 56	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 57	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 67	R	S	S	S	S	S	-
TMEC 68	R	S	R	R	S	S	-
TMEC 72	R	S	R	R	R	R	+
TMEC 92	R	R	R	R	R	R	+
TMEC 95	R	S	S	S	S	S	-
TMEC 101	R	R	I	I	R	R	+
TMEC 111	R	R	S	S	S	S	-
TMEC 113	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 124	S	S	S	S	S	S	-
TMEC 126	R	S	S	S	S	S	-
TMEC 129	R	R	S	S	S	S	-

SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, CRO: Seftriakson, CFM: Sefiksime. GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretimi, S: Duyarlı, standart doz; I: Duyarlı, yüksek doz; R: Dirençli, +: Pozitif, -: Negatif

Tekrarlayan İYE etkeni grubunda fosfomine TEC 31 ve TEC 149 suşları dirençli (%3,7), diğer suşlar duyarlı (%96,3); nitrofurantoine TEC 41 ve TEC 149 suşları dirençli (%3,7), diğer suşlar duyarlı (%96,3) bulundu. Trimetoprim-sulfametoksazole suşlardan 28'i dirençli (%51,9), 26'sı duyarlı (%48,1) tespit edildi. Beta laktam grubu antibiyotiklere bakıldığında amoksisilin-klavulanik asite 28 suş dirençli (%51,9), 26'sı duyarlı (%48,1); seftriaksona 24 suş dirençli (%44,4), 30 tanesi duyarlı (%55,6); sefiksim 32 suş dirençli (%59,2), 22 suş duyarlı (%40,8) olarak belirlendi. Florokinolon direnci değerlendirildiğinde siprofloksasine 25 suş dirençli (%46,3), 4 suş yüksek dozda duyarlı (%7,4), 25 suş duyarlı (%46,3); levofloksasine 25 suş dirençli (%46,3), 1 suş yüksek dozda duyarlı (%1,8), 28 suş duyarlı (%51,9) bulundu. Bu grupta tüm suşlar test edilen karbapenem grubu antibiyotiklere (ertapenem, imipenem, meropenem) duyarlı (%100) bulundu. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretimi 23 suшта gözlenirken (%42,6) 31 tanesinde gözlenmedi (%57,4).

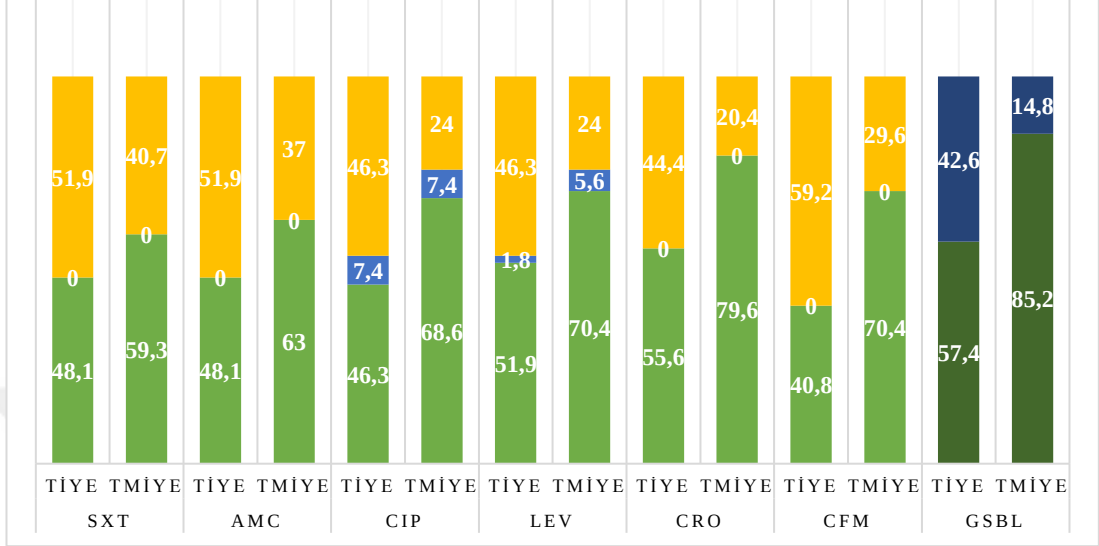
Tekrarlamayan İYE etkeni grubunda tüm suşlar fosfomisin ve nitrofurantoina duyarlı (%100) bulundu. Trimetoprim-sulfametoksazole suşlardan 22'si dirençli (%40,7), 32'si duyarlı (%59,3) tespit edildi. Beta laktam grubu antibiyotiklere bakıldığında amoksisilin-klavulanik asite 20 suş dirençli (%37), 34'ü duyarlı (%63); seftriaksona 11 suş dirençli (%20,4), 43 tanesi duyarlı (%79,6); sefiksim 16 suş dirençli (%29,6), 38 suş duyarlı (%70,4) olarak belirlendi. Florokinolon direnci değerlendirildiğinde siprofloksasine 13 suş dirençli (%24), 4 suş yüksek dozda duyarlı (%7,4), 37 suş duyarlı (%68,6); levofloksasine 13 suş dirençli (%24), 3 suş yüksek dozda duyarlı (%5,6), 38 suş duyarlı (%70,4) bulundu. Bu grupta ertapeneme yalnızca TMEC 20 numaralı suş dirençli (%1,8), 53 suş duyarlı (%98,2) bulunurken diğer karbapenemlere (imipenem, meropenem) karşı direnç tespit edilmedi. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretimi 8 suşta gözlenirken (%14,8) 46 tanesinde gözlenmedi (%85,2).

Tekrarlayan İYE etkeni ve tekrarlamayan İYE etkeni grupları antibiyotik direnci ve GSBL üretimi açısından değerlendirildiğinde iki grup arasında siprofloksasin (p değeri:0,043), levofloksasin (p değeri:0,028), seftriakson (p değeri:0,008), sefiksim (p değeri:0,002) direnci ve GSBL üretimi (p değeri:0,001) açısından anlamlı fark bulundu. Söz konusu antibiyotiklere direnç ve GSBL üretimi tekrarlayan İYE etkeni grubunda daha yüksek olarak belirlendi. Diğer antibiyotiklere direnç oranlarında iki grup arasında anlamlı fark tespit edilmedi.

Şekil 5. Her iki çalışma grubunda antimikrobiyal duyarlılık sonuçları (%)

ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK SONUÇLARI (%)

■ Duyarlı ■ Yüksek Dozda Duyarlı ■ Dirençli ■ Negatif ■ Pozitif

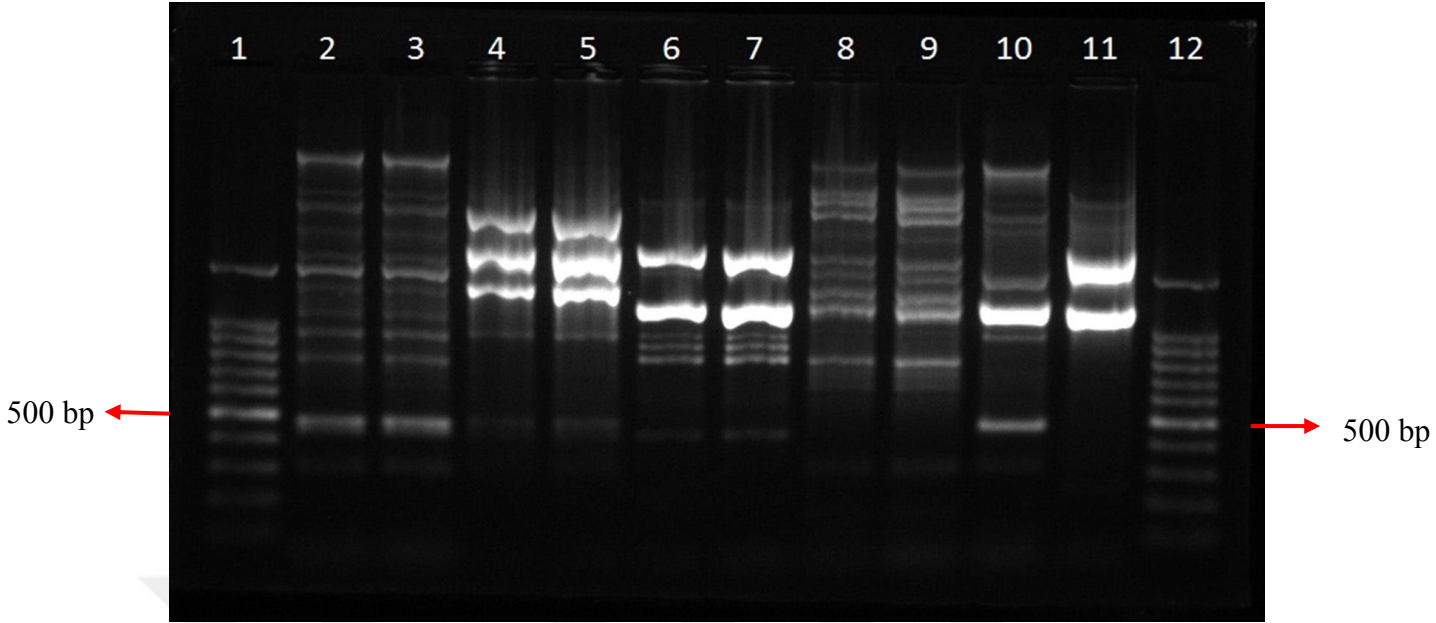


TİYE: Tekrarlayan İYE etkeni grubu, TMIYE: Tekrarlamayan İYE etkeni grubu, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, CRO: Seftriakson, CFM: Sefiksim, GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz

4.3. İzolatların Genotiplendirilmesi

4.3.1. ERIC PCR ile Tiplendirme

Tekrarlayan İYE etkeni grubunu oluşturmak için, daha önce stoklanan 556 izolat arasından rastgele seçilmiş 87 hastaya ait 197 *E.coli* izolatına; her hastaya ait izolatların genetik benzerliğini kendi aralarında değerlendirmek amacıyla ERIC PCR yapıldı. ERIC PCR sonucunda 62 hastaya ait izolatların bant paternleri aynı bulundu.

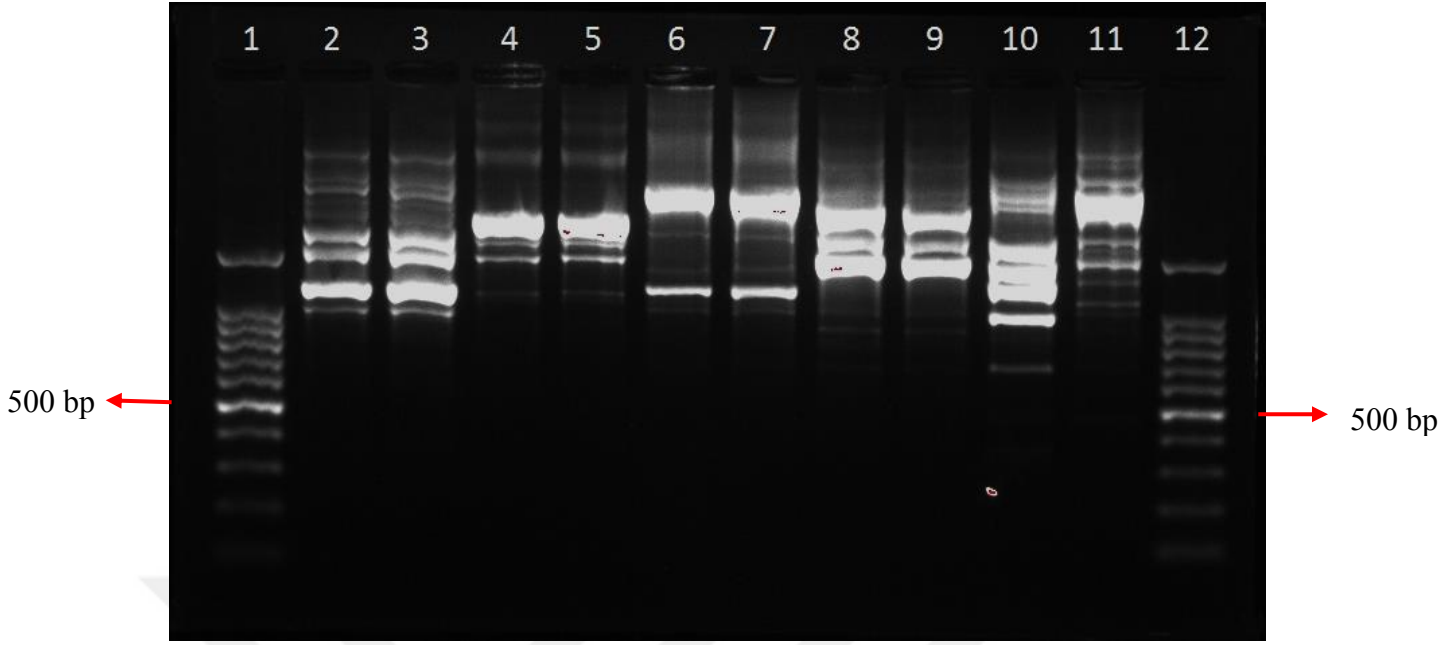


Şekil 6. ERIC primerleri ile PZR işlemi sonrasında elde edilen ampliconların agaroz jel elektroforez görüntüsü.

(1 ve 12: 100 bp DNA marker, 2 ve 3: *E. coli* ATCC 25922, 4 ve 5: *E. coli* NCTC 13846, 6 ve 7: Aynı hastaya ait bant paterni aynı olan TEC 145 ve TEC 146 suşları, 8 ve 9: Aynı hastaya ait bant paterni aynı olan TEC 147 ve 148 suşları, 10 ve 11: Aynı hastaya ait bant paterni farklı olan TEC 155 ve TEC 156 suşları)

4.3.2. AP-PCR ile Tiplendirme

ERIC PCR ile bant paterni aynı bulunan 62 hastaya ait izolatların benzerliği AP-PCR yöntemiyle yeniden değerlendirildi ve 57 hastaya ait izolatların bant paternlerinin birbiriyle aynı olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak başlangıçta çalışmaya alınan 87 hastaya ait izolatlardan 57 hastanın izolatlarının birbiriyle aynı olduğu tespit edildi (%65,5). 54 hastaya ait izolatlar, her hastayı 1 izolat temsil edecek şekilde rastgele seçilerek tekrarlayan İYE etkeni grubu oluşturuldu.



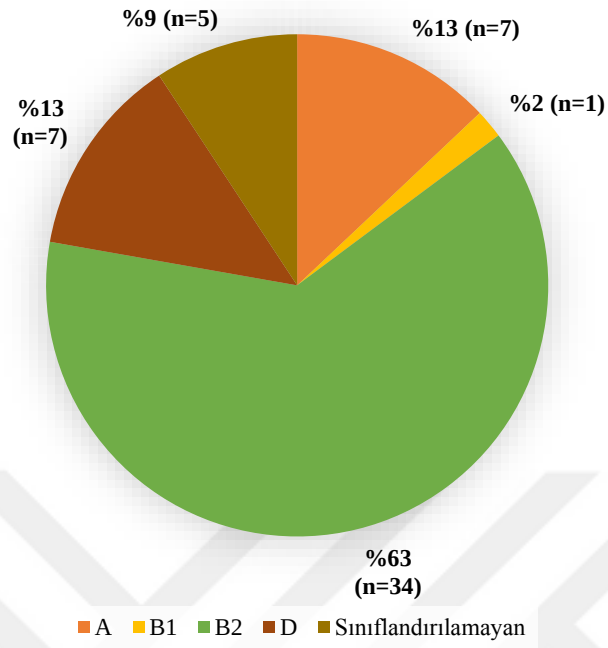
Şekil 7. AP-PCR primeri ‘1247’ ile PZR işlemi sonrasında elde edilen ampliconların agaroz jel elektroforez görüntüsü.

(1 ve 12: 100 bp DNA marker, 2 ve 3: *E. coli* ATCC 25922, 4 ve 5: *E. coli* NCTC 13846, 6 ve 7: Aynı hastaya ait bant paterni aynı olan TEC 167 ve TEC 168 suşları, 8 ve 9: Aynı hastaya ait bant paterni aynı olan TEC 169 ve TEC 170 suşları, 10 ve 11: Aynı hastaya ait bant paterni farklı olan TEC 151 ve TEC 152 suşları)

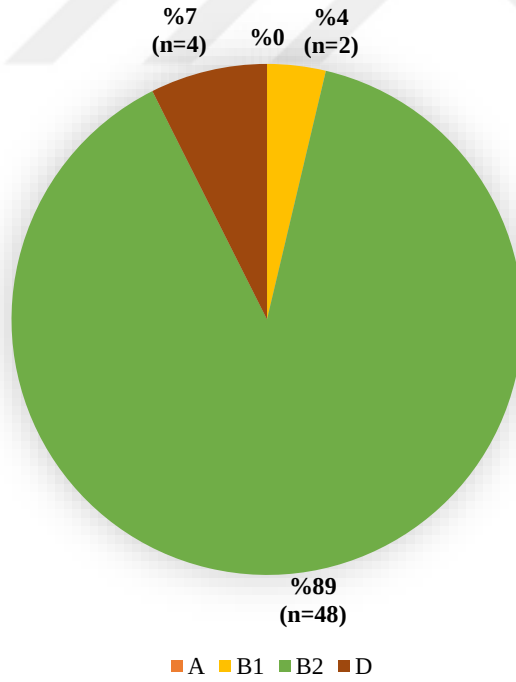
4.4. İzolatların Filogenotiplendirilmesi

Tekrarlayan ve tekrarlamayan İYE etkeni gruplarındaki bakteriler, *chuA* ve *yjaA* geni ile TspE4.C2 DNA fragmanına özgü primerler kullanılarak, Clermont ve arkadaşlarının (21) yöntemiyle triplex PCR ile 4 filogenetik gruba ayrıldı (A, B1, B2, D). Tekrarlayan İYE etkeni grubunda 7 suş grup A’ya, 1 suş grup B1’e, 34 suş grup B2’ye ve 7 suş grup D’ye ait bulundu. 5 suşa ise bu yöntemle filogenetik sınıflandırılama yapılamadı. Tekrarlamayan İYE etkeni grubunda ise 2 suş grup B1’e, 48 suş grup B2’ye, 4 suş grup D’ye ait bulundu. Grup A’ya ait suş bulunamadı.

Tekrarlayan İYE Etkeni



Tekrarlamayan İYE Etkeni



Şekil 8. Çalışma gruplarındaki suşların filogenetik dağılımları (% ,n)

4. 5. İzolatlarda Virülans Genlerinin Varlığının Belirlenmesi

Her iki grupta bulunan izolatlarda biyofilm üretimi ile ilişkili olduğu belirlenen *fimH*, *papC*, *sfa*, *csgA*, *csgD*, *afa*, *flu*, *bcsA*, *pgaA*, *pgaC*, *fliCH4* ve *fliCH7* genlerinin varlığı her bir gene özgül primerler kullanılarak PZR yöntemiyle araştırıldı. Sonuçlar Tablo 9 ve Tablo 10’da gösterildi. Her iki gruptaki tüm izolatlar *fimH*, *csgA* ve *csgD* geni içerdiği için tablolarda bu sonuçlara yer verilmedi.

Tablo 9. Tekrarlayan İYE etkeni *E. coli* izolatlarının ve *E.coli* ATCC 25922 suşunun virülans genleri

Suş No	<i>papC</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>	<i>flu</i>	<i>bcsA</i>	<i>pgaA</i>	<i>pgaC</i>	<i>fliC</i>
TEC 1	+	-	-	-	+	+	+	+
TEC 5	-	-	-	+	-	+	+	-
TEC 9	-	-	-	+	+	+	-	-
TEC 11	-	-	-	+	+	-	-	-
TEC 13	-	-	-	+	+	+	+	-
TEC 15	-	-	-	+	+	+	+	-
TEC 21	-	-	+	+	-	+	-	-
TEC 23	-	-	-	-	+	+	+	+
TEC 25	-	-	-	+	+	+	+	+
TEC 27	+	-	-	-	-	+	-	-
TEC 29	+	-	-	+	-	+	-	+
TEC 31	+	-	-	+	-	+	+	+
TEC 34	+	-	-	+	+	-	-	-
TEC 35	-	-	-	-	+	-	-	-
TEC 37	+	+	-	+	-	+	-	-
TEC 39	+	-	-	+	+	-	-	-
TEC 41	-	-	-	+	+	-	-	-
TEC 43	-	-	+	+	-	+	-	+
TEC 54	+	+	-	-	-	+	+	-
TEC 55	-	-	-	-	+	+	+	-
TEC 59	-	-	-	+	-	+	-	+

TEC 61	-	-	-	+	-	+	+	-
TEC 64	-	-	-	+	+	+	-	-
TEC 65	-	-	-	+	-	+	-	+
TEC 67	+	-	-	+	-	+	-	+
TEC 69	+	-	-	+	+	+	-	-
TEC 73	+	-	-	-	-	-	-	-
TEC 75	-	-	-	+	-	+	+	+
TEC 79	-	-	-	-	+	+	-	-
TEC 85	-	-	-	+	-	+	-	+
TEC 93	-	-	+	+	-	+	-	-
TEC 95	-	-	-	+	+	-	-	+
TEC 99	+	+	-	+	-	+	-	-
TEC 101	+	-	-	+	-	+	-	+
TEC 103	+	-	-	+	+	-	-	-
TEC 107	+	-	+	+	+	+	-	-
TEC 109	-	-	-	+	+	+	-	-
TEC 111	+	-	-	+	+	+	+	-
TEC 119	-	+	-	+	-	+	+	-
TEC 121	+	+	-	+	+	-	-	+
TEC 127	-	+	-	+	-	-	-	-
TEC 133	+	+	-	+	-	+	+	-
TEC 139	+	-	-	+	+	+	+	-
TEC 141	+	+	-	-	-	-	-	-
TEC 145	+	+	-	+	-	+	-	-
TEC 147	+	+	-	+	-	+	-	+
TEC 149	-	-	-	+	+	+	+	-
TEC 153	+	+	-	+	-	+	+	-
TEC 159	+	+	+	-	+	+	+	+
TEC 162	-	-	-	+	-	+	+	+
TEC 163	-	-	-	+	+	-	-	-
TEC 167	+	-	-	+	-	+	+	+
TEC 169	-	-	-	+	-	+	+	-
TEC 171	+	+	-	+	-	+	+	-
ATCC 25922	+	+	-	+	-	+	+	-

Tablo 10. Tekrarlamayan İYE etkeni *E. coli* izolatlarının virülans genleri

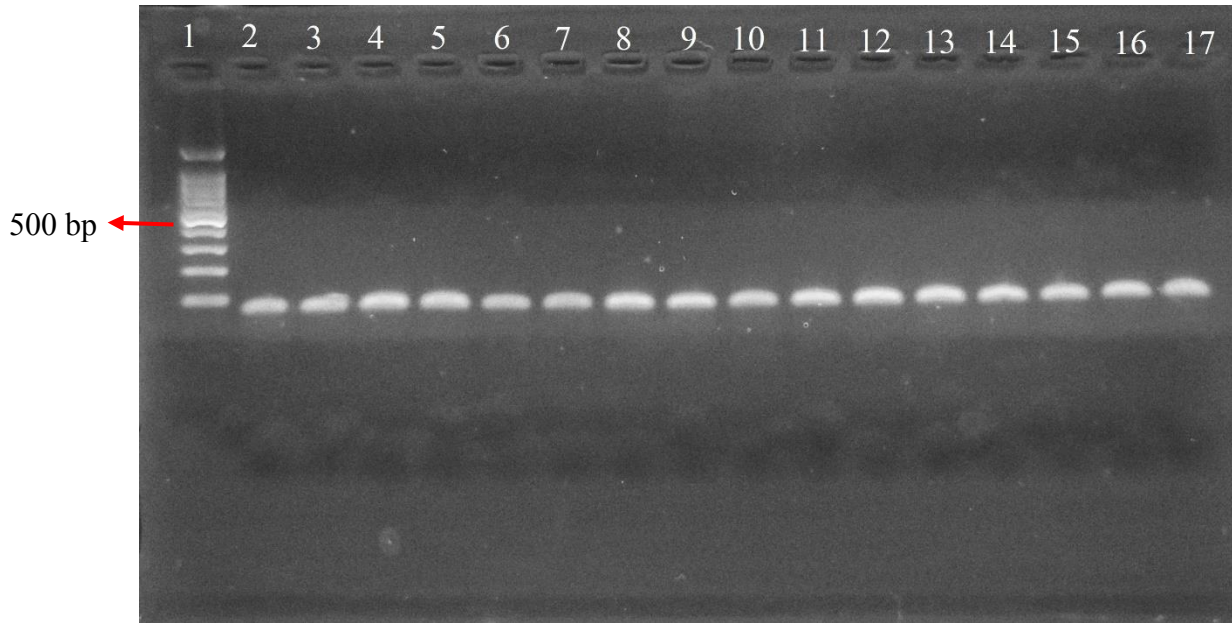
Suş No	<i>papC</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>	<i>flu</i>	<i>bcsA</i>	<i>pgaA</i>	<i>pgaC</i>	<i>fliC</i>
TMEC 2	+	+	-	+	-	+	-	+
TMEC 4	+	+	-	-	-	+	-	-
TMEC 5	-	+	+	+	-	-	-	-
TMEC 6	+	+	-	-	-	-	-	-
TMEC 7	+	+	-	+	+	+	-	+
TMEC 8	+	+	-	+	-	+	-	-
TMEC 9	-	+	-	-	-	+	-	-
TMEC 10	-	-	-	+	-	+	-	-
TMEC 14	+	+	-	+	-	+	-	-
TMEC 15	+	+	-	+	-	-	-	-
TMEC 19	+	-	-	+	+	-	-	+
TMEC 20	+	-	-	+	+	+	-	-
TMEC 21	+	+	-	-	-	+	-	-
TMEC 22	+	+	-	+	-	+	-	-
TMEC 23	-	+	-	+	-	+	-	+
TMEC 24	+	+	+	-	-	-	-	-
TMEC 25	+	+	-	+	-	-	-	-
TMEC 26	+	+	-	+	-	+	-	+
TMEC 27	-	+	-	+	-	+	-	-
TMEC 29	-	-	-	+	-	+	-	-
TMEC 30	+	-	-	-	-	+	-	-
TMEC 31	-	-	-	+	-	+	-	-
TMEC 32	+	+	-	+	-	+	-	-
TMEC 33	-	-	+	+	-	-	-	-
TMEC 35	-	+	-	+	-	+	-	-
TMEC 36	-	+	-	+	+	+	-	+
TMEC 37	-	+	-	+	-	+	-	-
TMEC 38	-	-	-	-	+	+	-	-
TMEC 39	+	+	-	+	-	-	-	-

TMEC 41	+	-	-	+	+	+	+	-
TMEC 43	-	-	-	-	+	-	-	-
TMEC 44	+	+	-	+	-	+	-	-
TMEC 45	-	+	-	+	-	-	-	-
TMEC 46	+	+	-	+	-	+	-	-
TMEC 47	+	-	-	+	+	-	-	-
TMEC 48	-	-	-	+	-	+	-	+
TMEC 51	+	+	-	+	-	+	-	-
TMEC 52	-	-	+	+	-	+	-	+
TMEC 53	-	-	+	+	-	+	-	-
TMEC 54	+	-	-	+	-	+	-	-
TMEC 55	-	-	+	+	-	+	-	+
TMEC 56	-	+	-	+	+	+	-	-
TMEC 57	-	-	-	-	-	+	-	-
TMEC 67	-	-	-	+	-	+	-	-
TMEC 68	-	+	-	+	-	+	-	-
TMEC 72	-	+	-	+	-	+	-	+
TMEC 92	-	+	-	+	+	+	-	-
TMEC 95	+	-	-	+	-	-	-	-
TMEC 101	+	-	-	+	-	+	-	-
TMEC 111	+	+	-	+	-	+	-	-
TMEC 113	+	+	-	+	-	+	-	-
TMEC 124	+	+	-	+	-	+	-	-
TMEC 126	-	-	-	+	-	-	-	-
TMEC 129	-	-	-	+	-	+	-	-

Virölans genlerinin tekrarlayan İYE etkeni ve tekrarlamayan İYE etkeni gruplarında bulunma durumları değerlendirildiğinde *sfa* geninin tekrarlamayan İYE etkeni grubunda daha yüksek oranda bulunduğu, *bcsA* ve *pgaC* genlerinin ise tekrarlayan İYE etkeni grubunda daha yüksek oranda bulunduğu ve aradaki farkın anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Diğer virölans genlerinin varlığı açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunamadı (Tablo 11).

Tablo 11. *E.coli* suşlarında virülans genlerinin varlığı

Virülans Genleri	Tekrarlayan İYE etkeni (n=54)	Tekrarlamayan İYE etkeni (n=54)	P değeri
<i>fimH</i>	54 (%100)	54 (%100)	-
<i>papC</i>	26 (%48,1)	28 (%51,9)	0,7
<i>sfa</i>	13 (%24,1)	32 (%59,3)	< 0,001
<i>csgA</i>	54 (%100)	54 (%100)	-
<i>csgD</i>	54 (%100)	54 (%100)	-
<i>afa</i>	5 (%9,3)	6 (%11,1)	0,75
<i>flu</i>	44 (%81,5)	45 (%83,3)	0,8
<i>bcsA</i>	25 (%46,3)	10 (%18,5)	0,002
<i>pgaA</i>	42 (%77,8)	41 (%75,9)	0,82
<i>pgaC</i>	22 (%40,7)	1 (%1,9)	< 0,001
<i>fliC</i>	18 (%33,3)	10 (%18,5)	0,079



Şekil 9. *csgA* primerleri ile PZR işlemi sonucu elde edilen amplikonların agaroz jel elektroforez görüntüsü

(1:100 bp DNA marker, 2: TEC 5, 3: TEC 23, 4: TEC 25, 5: TEC 31, 6: TEC 35, 7: TEC 37, 8: TEC 39, 9: TEC 41, 10: TEC 43, 11: TEC 54, 12: TEC 55, 13: TEC 61, 14: TEC 75, 15: TEC 111, 16: TEC 119, 17: TEC 133)

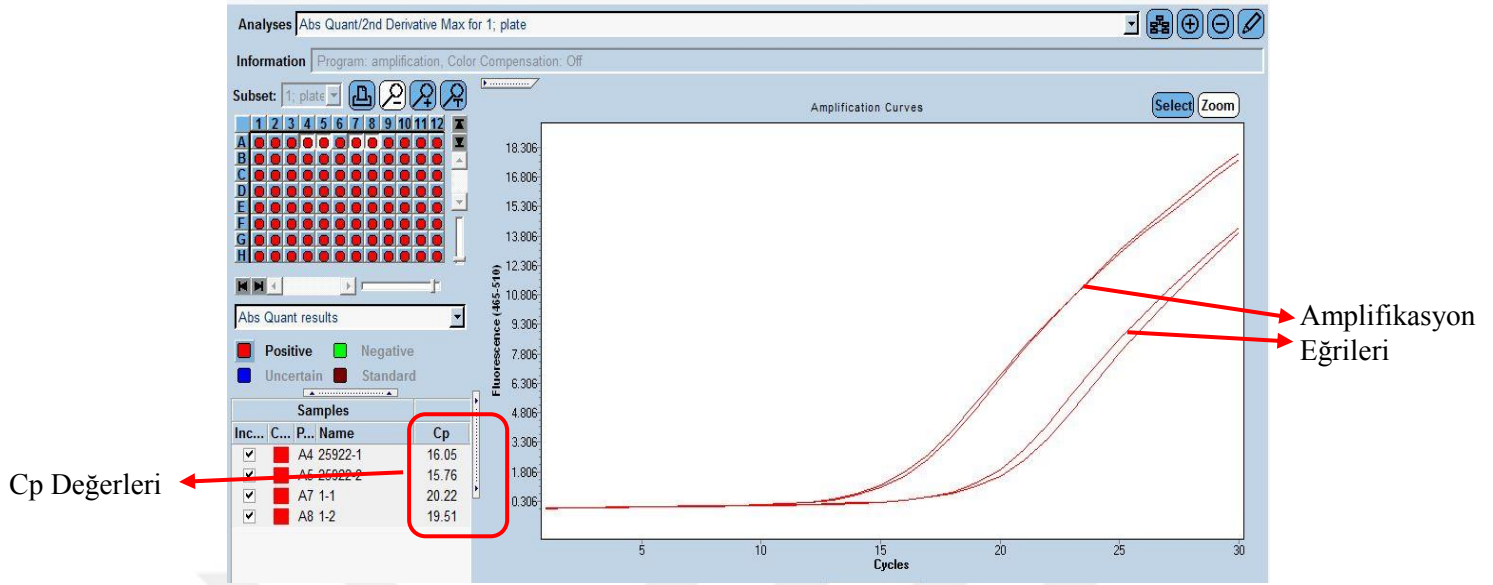


Şekil 10. *bcsA* primerleri ile PZR işlemi sonucu elde edilen ampliconların agaroz jel elektroforez görüntüsü

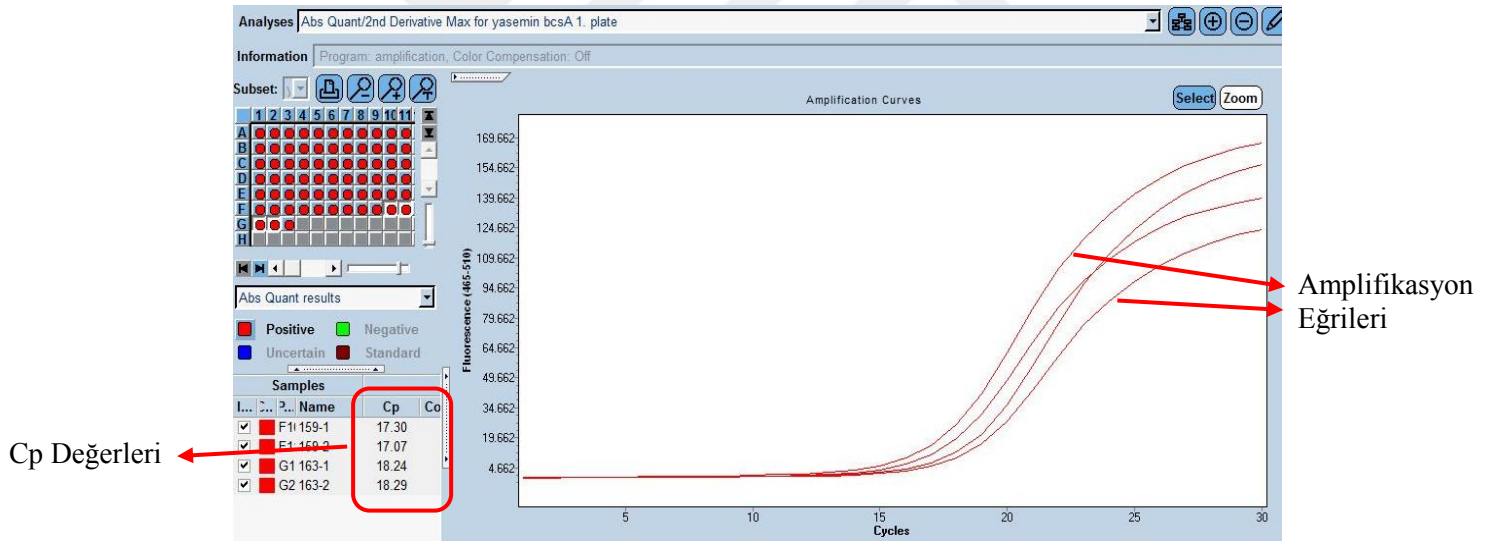
(1:100 bp DNA marker, 2: TEC 5, 3: TEC 23, 4: TEC 25, 5: TEC 31, 6: TEC 35, 7: TEC 37, 8: TEC 39, 9: TEC 41, 10: TEC 43, 11: TEC 54, 12: TEC 55, 13: TEC 61, 14: TEC 75, 15: TEC 111, 16: TEC 119, 17: TEC 133)

4.6. Ekzopolisakkarit Genlerinin mRNA Düzeylerinin Belirlenmesi

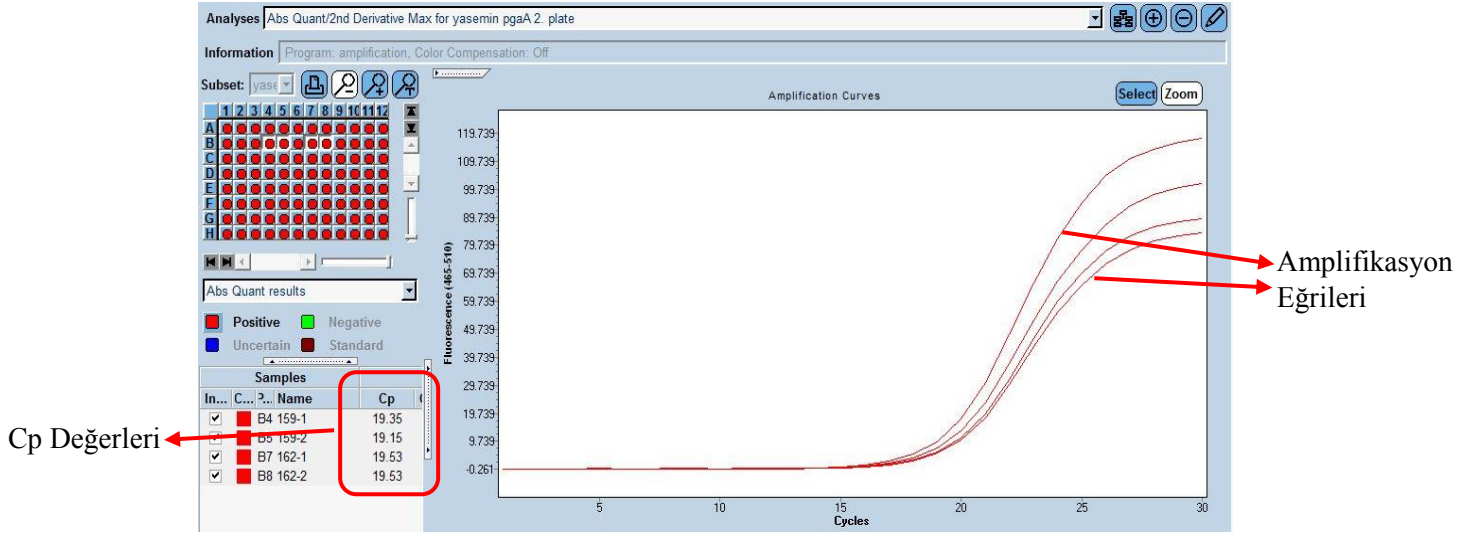
RT-PCR işlemi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrilerinin ve Cp değerlerinin birer örneği Şekil 11, Şekil 12 ve Şekil 13'te gösterilmiştir.



Şekil 11. 16S rRNA genine ait amplifikasyon eğrileri ve Cp değerleri

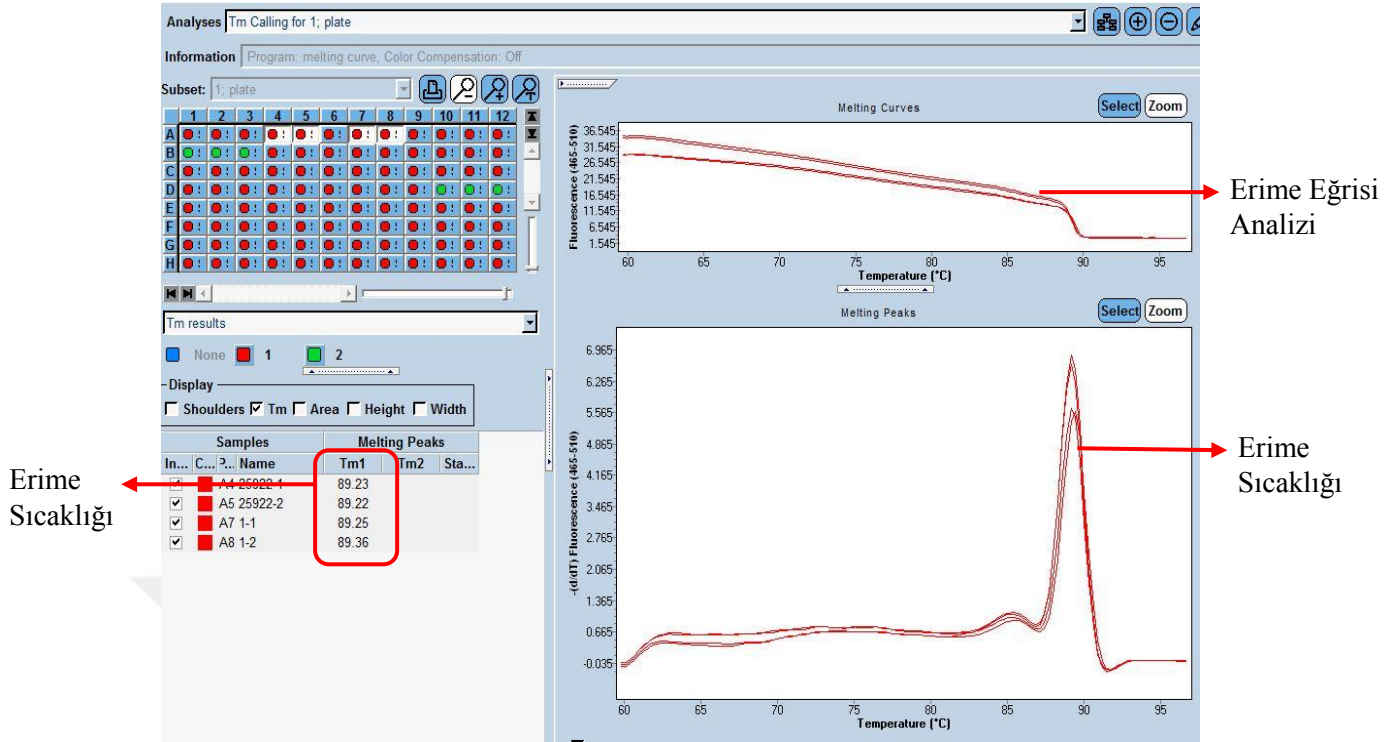


Şekil 12. *bcsA* genine ait amplifikasyon eğrileri ve Cp değerleri

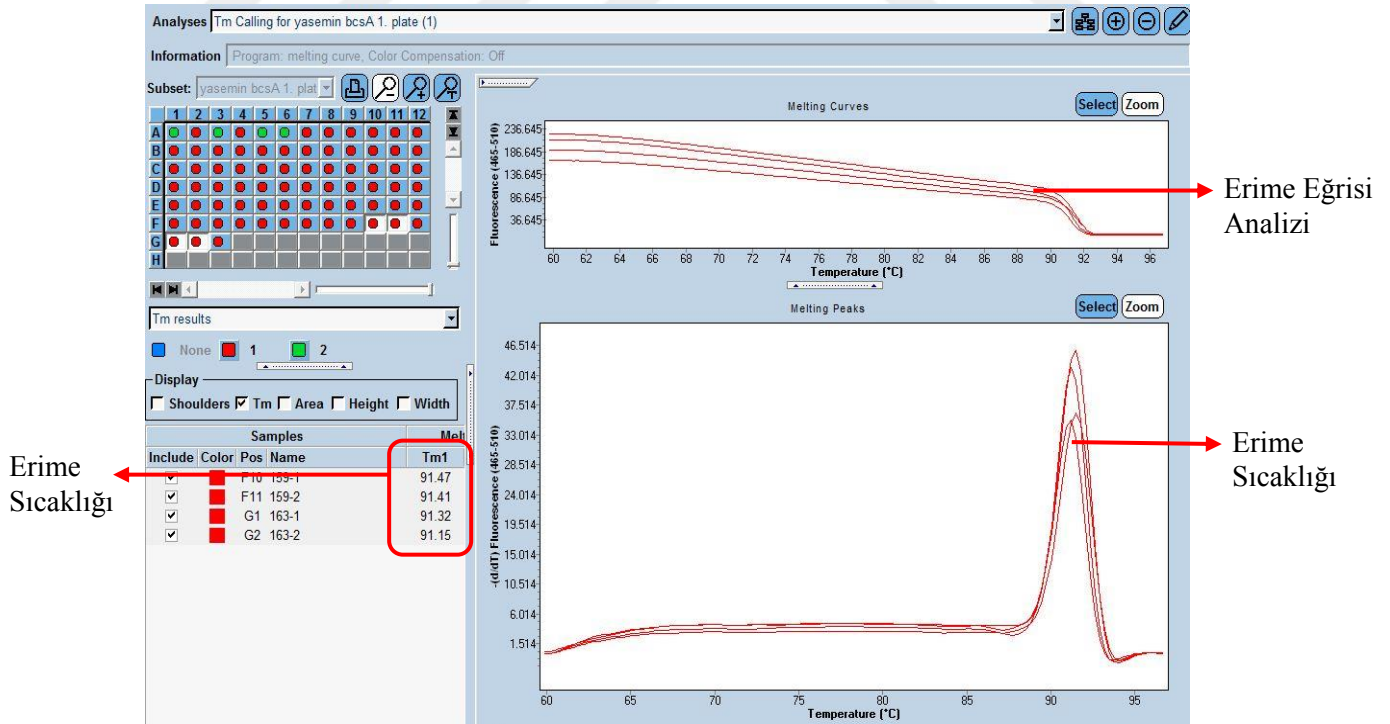


Şekil 13. *pgaA* genine ait amplifikasyon eğrileri ve Cp değerleri

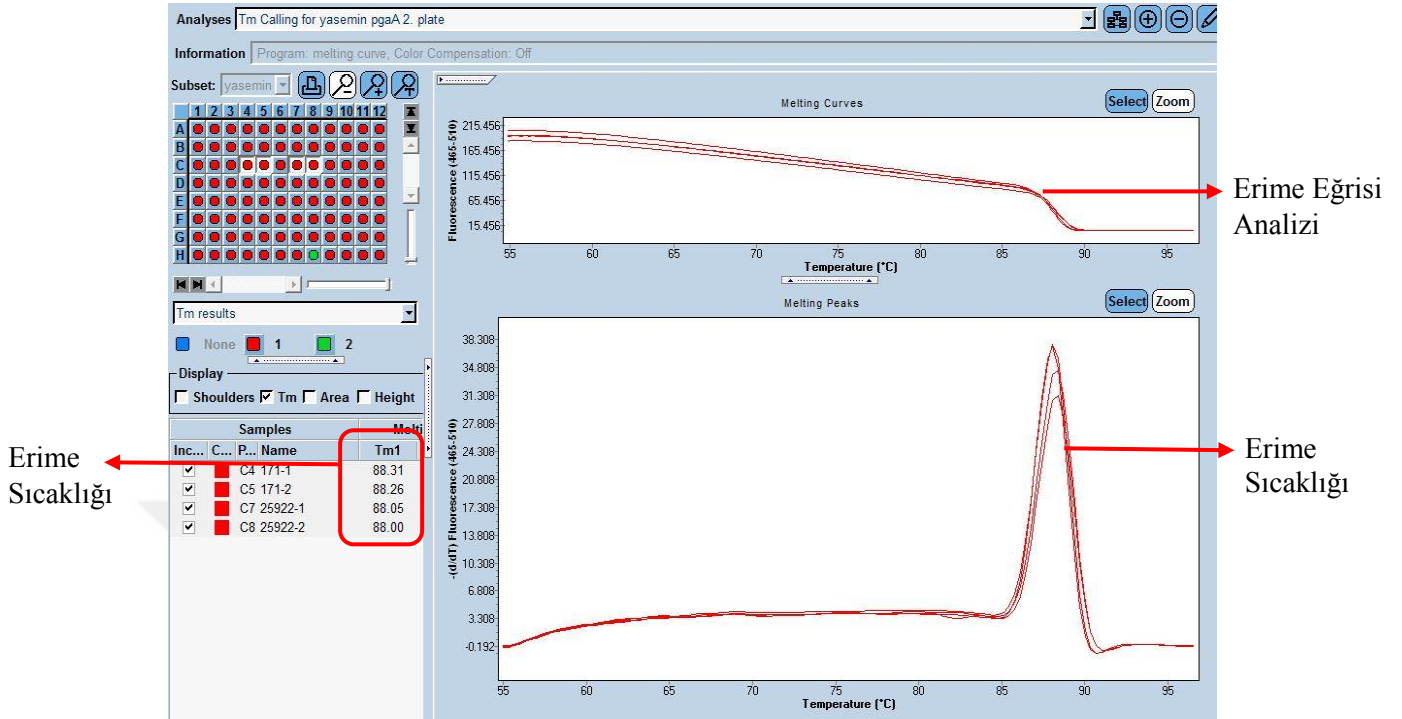
Çalışmamızda elde edilen amplifikasyon eğrilerinin özgülüğünün değerlendirilebilmesi için erime eğrisi analizi ve erime sıcaklığı ölçümü yapıldı. Ölçümler sonucunda *bcsA* 'nın erime sıcaklığı ortalama $91,45 \pm 0,13$ °C, *pgaA* 'nın erime sıcaklığı ortalama $88,1 \pm 0,28$ °C ve 16S rRNA'nın erime sıcaklığı $89,23 \pm 0,14$ °C olarak tespit edildi.



Şekil 14. 16S rRNA genine ait erime sıcaklığı ve erime eğrisi analizi



Şekil 15. *bcsA* genine ait erime sıcaklığı ve erime eğrisi analizi



Şekil 16. *pgaA* genine ait erime sıcaklığı ve erime eğrisi analizi

Hedef genlerin (*bcsA*, *pgaA*) ekspresyon ölçümleri ile 16S rRNA geninin ekspresyon ölçümü oranlanarak normalizasyon işlemi gerçekleştirildi. *pgaA* geninin normalizasyonu için *E. coli* ATCC 25922 suşu referans örnek seçildi ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanıldı. *E. coli* ATCC 25922 suşu *bcsA* geni içermediği için aynı formül bu gen için uygulanamadı. *bcsA* geninin ekspresyon düzeyi değerlendirilirken yalnızca ΔCT kullanıldı.

Mevcut primerlerle *bcsA* ve *pgaA* genlerinin tespit edilemediği izolatlar için RT-PCR işlemi gerçekleştirilmedi ve mRNA düzeyi hesaplanmadı. İlgili genlerin mRNA düzeylerinin normalizasyonunda 16S rRNA geninin mRNA düzeyi kullanıldı. 16S rRNA geni için yeterli mRNA düzeyi bulunmayan izolatlar (C_p değeri ≥ 20) hesaplamalara dahil edilmedi.

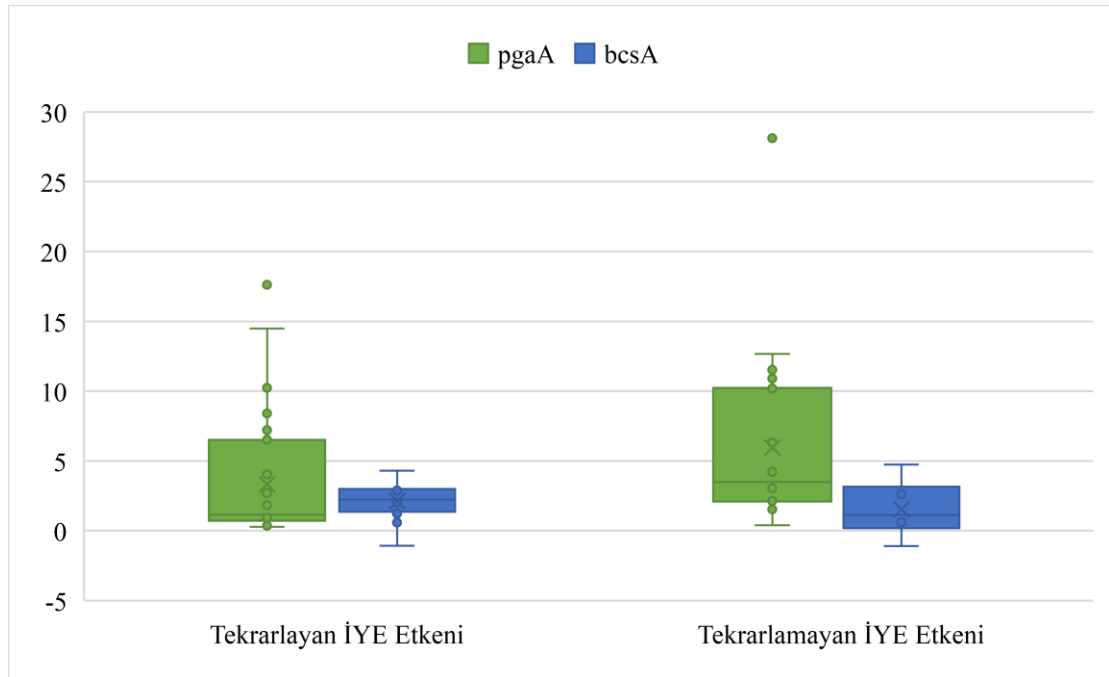
bcsA ve *pgaA* genlerinin mRNA düzeyleri istatistiksel olarak değerlendirildi. Hesaplamalar sonucu elde edilen değerler Tablo 12’de gösterildi. Gruplar arasında,

pgaA geninin mRNA düzeyinde anlamlı fark tespit edilirken (p değeri=0,002) *bcsA* geninin mRNA düzeyinde anlamlı fark bulunamadı. *pgaA* geninin ekspresyon seviyesi tekrarlamayan İYE etkeni grubunda daha yüksek olarak saptandı.

Tablo 12. *bcsA* ve *pgaA* genlerinin mRNA düzeyleri hesaplamasında elde edilen değerler

Genler	Tekrarlayan İYE Etkeni (n=54)		Tekrarlamayan İYE Etkeni (n=54)		P değeri
	Dahil edilen (n)	Sonuç	Dahil edilen (n)	Sonuç	
<i>bcsA</i> [†]	18	2,13 ± 1,23	6	1,53 ± 1,97	0,392*
<i>pgaA</i> [‡]	39	1,16 (0,71-6,51)	26	3,50 (2,11-10,24)	0,002**

*Student T testi, **Mann-Whitney U testi, [†]Ortalama±Standart Sapma, [‡]Medyan (Q1-Q3)



Şekil 17. *bcsA* ve *pgaA* genlerinin mRNA düzeyleri hesaplamasında elde edilen değerler

4.7. İzolatların Fenotipik Biyofilm Üretimi

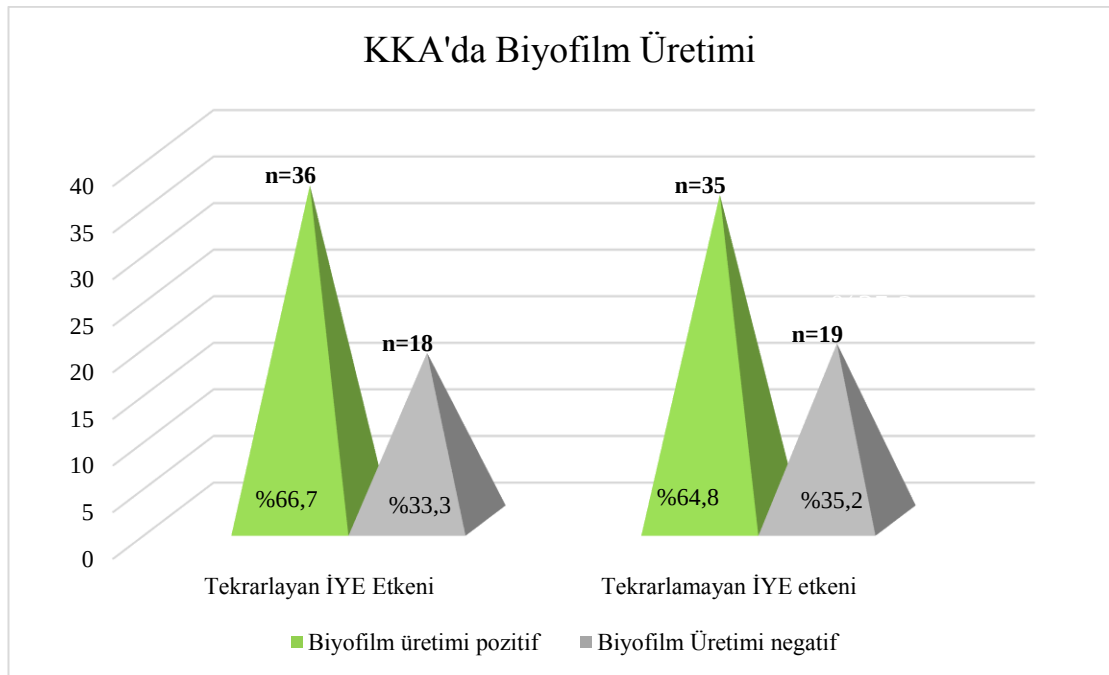
Çalışmaya alınan her iki gruptaki toplam 108 suşun fenotipik biyofilm üretimi hem Kongo kırmızılı agarda hem de mikrotitre plak yöntemiyle değerlendirildi.

4.7.1. Kongo Kırmızılı Agarda Biyofilm Üretimi

Kuru kristal kıvamında siyah koloniler biyofilm üretimi pozitif, pembe – kırmızı renkte koloniler biyofilm üretimi negatif olarak yorumlandı (63).

KKK'da tekrarlayan İYE etkeni grubunda suşların 36'sında (%66,7), tekrarlamayan İYE etkeni grubunda ise 35 suşta (%64,8) biyofilm üretimi gözlemlendi (Şekil 18). İki grup arasında KKK'da biyofilm üretimi açısından anlamlı fark bulunamadı (p değeri: 0,839).

Şekil 18. Kongo kırmızılı agarda biyofilm üretimi



4.7.2. Mikrotitre Plak Yöntemiyle Biyofilm Üretimi

Biyofilm deneyi U tabanlı 96 kuyucuklu plakta referans yöntem modifiye edilerek gerçekleştirildi (64). Kuyucuklarda oluşan biyofilm % 0.1 kristal viyole ile boyandı ve %30 asetik asit çözeltisi ile boya çözüldü. Kuyucukların optik dansitesi (OD) 550 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, CA, ABD) ölçüldü. Negatif kontrol olarak steril LB sıvı besiyeri kullanıldı. Sonuçlar, Stepanovic ve arkadaşları (65) tarafından kullanılan kriterlere göre değerlendirildi (Tablo 5). Sonuçlar biyofilm üretimi yok (0), zayıf biyofilm üretimi (I), orta derecede biyofilm üretimi (II) ve güçlü biyofilm üretimi (III) şeklinde sınıflandırıldı. Sonuçlar tablo 13'te gösterildi.

Tekrarlayan İYE etkeni grubunda suşların %74,1'i zayıf, %1,9'u orta derecede biyofilm üretirken %24'ünde biyofilm üretimi gözlenmedi. Bu grupta yüksek derecede biyofilm üreten suş tespit edilmedi. Tekrarlamayan İYE etkeni grubunda suşların %63'ünde zayıf, %5,6'sında orta ve %5,6'sında yüksek derecede biyofilm üretimi saptandı. Suşların %25,9'unda ise biyofilm üretimi gerçekleşmedi. İki grup arasında MPY ile biyofilm üretimi açısından fark bulunamadı.

Tablo 13. Her iki grupta mikrotitre plak yöntemiyle biyofilm üretiminin değerlendirilmesi

		MPY ile Biyofilm Üretimi Derecesi				
		0	I	II	III	Toplam
Tekrarlayan	n	13	40	1	0	54
İYE etkeni	%	%24	%74,1	%1,9	%0,0	%100,0
Tekrarlamayan	n	14	34	3	3	54
İYE etkeni	%	%25,9	%63,0	%5,6	%5,6	%100,0

4.8. Biyofilm Üretiminin Diğer Parametrelerle İlişkisi

4.8.1. Antibiyotik Direnci ve Biyofilm Üretimi İlişkisi

Çalışmamızda yer alan tüm izolatlardan (n=108) test edilen antibiyotiklere dirençli olan ve GSBL üreten izolatların KKA'da biyofilm oluşumu ile ilişkisi değerlendirildiğinde; trimethoprim-sulfametoksazol, siprofloksasin, levofloksasin, seftriakson, sefiksime direnç ve GSBL sentezi ile biyofilm üretimi arasında anlamlı ilişki saptandı. P değerleri Tablo 14'te gösterildi. Aynı zamanda bu izolatların mikrotitre plak yöntemiyle biyofilm oluşumu ile ilişkisi de değerlendirildi. Fosfomisin ve nitrofurantoin haricinde diğer antibiyotiklere dirençli olan izolatların ve GSBL sentezleyen izolatların büyük çoğunluğunun MPY ile düşük düzeyde biyofilm üreticisi olduğu tespit edildi. Bulgular Tablo 15'te gösterildi.

Tablo 14. Antibiyotik direnci ve GSBL sentezinin KKA'da biyofilm üretimi ile ilişkisi

		KKA'da Biyofilm Üretimi (n,%)			P değeri
		Pozitif	Negatif	Toplam	
FF	Duyarlı	69 (65,1)	37 (34,9)	106 (100)	0,545
	Dirençli	2 (100)	0 (0)	2 (100)	
F	Duyarlı	69 (65,1)	37 (34,9)	106 (100)	0,545
	Dirençli	2 (100)	0 (0)	2 (100)	
SXT	Duyarlı	30 (51,7)	28 (48,3)	58 (100)	0,001
	Dirençli	41 (82)	9 (18)	50 (100)	
AMC	Duyarlı	35 (58,3)	25 (41,7)	60 (100)	0,07
	Dirençli	36 (75)	12 (25)	48 (100)	
CIP	Duyarlı	34 (54,8)	28 (45,2)	62 (100)	0,02
	Dirençli	31 (81,6)	7 (18,4)	38 (100)	
LEV	Duyarlı	37 (56,1)	29 (43,9)	66 (100)	0,024
	Dirençli	31 (81,6)	7 (18,4)	38 (100)	
CRO	Duyarlı	41 (56,2)	32 (43,8)	73 (100)	0,002
	Dirençli	30 (85,7)	5 (14,3)	35 (100)	
CFM	Duyarlı	32 (53,3)	28 (46,7)	60 (100)	0,002

	Dirençli	39 (81,3)	9 (18,7)	48 (100)	
GSBL	Negatif	44 (57,1)	33 (42,9)	77 (100)	0,003
	Pozitif	27 (87,1)	4 (12,9)	31 (100)	

KKA: Kongo Kırmızılı Agar, FF: Fosfomisin, F: Nitrofurantoin, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, CRO: Seftriakson, CFM: Sefiksime. GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz

Tablo 15. Antibiyotik direnci ve GSBL sentezinin MPY ile biyofilm üretimi ile ilişkisi

	MPY ile Biyofilm Üretimi Derecesi (n,%)				Toplam
	0	I	II	III	
FF	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)
F	1 (50)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	2 (100)
SXT	8 (16)	38 (76)	1 (2)	3 (6)	50 (100)
AMC	12 (25)	34 (70,8)	0 (0)	2 (4,2)	48 (100)
CIP	10 (26,3)	27 (71,1)	0 (0)	1 (2,6)	38 (100)
LEV	10 (26,3)	27 (71,1)	0 (0)	1 (2,6)	38 (100)
CRO	9 (25,7)	25 (71,4)	0 (0)	1 (2,9)	35 (100)
CFM	11 (22,9)	36 (75)	0 (0)	1 (2,1)	48 (100)
GSBL	7 (22,6)	23 (74,2)	0 (0)	1 (3,2)	31 (100)

MPY: Mikrotitre Plak Yöntemi, FF: Fosfomisin, F: Nitrofurantoin, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, CRO: Seftriakson, CFM: Sefiksime, GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz

4.8.2. Filogenetik Gruplar ve Biyofilm Üretimi İlişkisi

Çalışmamızda yer alan suşların (n=108) büyük çoğunluğunun B2 ve D filogenetik gruplarına ait olduğu tespit edildi. B2 ve D filogenetik gruplarında sınıflandırılan izolatların çoğunluğunun Kongo kırmızılı agar yöntemiyle biyofilm üretiminin pozitif olduğu ve MPY ile de düşük düzeyde biyofilm üreticisi olduğu tespit edildi. Veriler Tablo 16 ve Tablo 17’de gösterildi.

Tablo 16. Filogenetik grup dağılımının KKA'da biyofilm üretimi ile ilişkisi

KKA'da Biyofilm Üretimi (n,%)			
Filogenetik Grup	Pozitif	Negatif	Toplam
A	3 (42,9)	4 (57,1)	7 (100)
B1	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (100)
B2	55 (67)	27 (33)	82 (100)
D	8 (72,7)	3 (27,3)	11 (100)
Sınıflandırılmayan	3 (60)	2 (40)	5 (100)

Tablo 17. Filogenetik grup dağılımının MPY ile biyofilm üretimi ile ilişkisi

MPY ile Biyofilm Üretimi Derecesi					
Filogenetik Grup	0 (n,%)	I (n,%)	II (n,%)	III (n,%)	Toplam (n,%)
A	3 (42,9)	4 (57,1)	0 (0)	0 (0)	7 (100)
B1	0 (0)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	3 (100)
B2	22 (26,8)	53 (64,6)	4 (4,9)	3 (3,7)	82 (100)
D	2 (18,2)	9 (81,8)	0 (0)	0 (0)	11 (100)
Sınıflandırılmayan	0 (0)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	5 (100)

4.8.3. Virülans Genlerinin Varlığı ve Biyofilm Üretimi İlişkisi

Çalışmamızda yer alan tüm izolatlarda (n=108) virülans genlerinin varlığı ile Kongo kırmızılı agarda biyofilm üretiminin ilişkisi incelendiğinde *fimH*, *papC*, *csgA*, *csgD*, *flu*, *pgaA*, *sfa*, *afa*, *bcsA*, *pgaC*, *fliC* genleri varlığında izolatların çoğunluğunun biyofilm ürettiği gözlemlendi. Hiçbir virülans geninin varlığı ile biyofilm üretimi arasında anlamlı ilişki bulunamadı.

Tablo 18. Virölans genlerinin varlığının KKA’da biyofilm üretimi ile ilişkisi

KKA’da Biyofilm Üretimi (n,%)					
Virölans Genleri		Pozitif	Negatif	Toplam	P değeri
<i>fimH</i>	Pozitif	71 (65,7)	37 (34,3)	108 (100)	-
	Negatif	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<i>papC</i>	Pozitif	33 (61,1)	21 (38,9)	54 (100)	0,311
	Negatif	38 (70,4)	16 (29,6)	54 (100)	
<i>sfa</i>	Pozitif	25 (55,6)	20 (44,4)	45 (100)	0,059
	Negatif	46 (73)	17 (27)	63 (100)	
<i>csgA</i>	Pozitif	71 (65,7)	37 (34,3)	108 (100)	-
	Negatif	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<i>csgD</i>	Pozitif	71 (65,7)	37 (34,3)	108 (100)	-
	Negatif	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<i>afa</i>	Pozitif	9 (81,8)	2 (18,2)	11 (100)	0,325
	Negatif	62 (63,9)	35 (36,1)	97 (100)	
<i>flu</i>	Pozitif	60 (67,4)	29 (32,6)	89 (100)	0,427
	Negatif	11 (57,9)	8 (42,1)	19 (100)	
<i>bcsA</i>	Pozitif	19 (54,3)	16 (45,7)	35 (100)	0,082
	Negatif	52 (71,2)	21 (28,8)	73 (100)	
<i>pgaA</i>	Pozitif	53 (63,9)	30 (36,1)	83 (100)	0,452
	Negatif	18 (72)	7 (28)	25 (100)	
<i>pgaC</i>	Pozitif	17 (73,9)	6 (26,1)	23 (100)	0,352
	Negatif	54 (63,5)	31 (36,5)	85 (100)	
<i>fliC</i>	Pozitif	20 (71,4)	8 (28,6)	28 (100)	0,461
	Negatif	51 (63,7)	29 (36,3)	80 (100)	

Çalışmamızda yer alan *fimH*, *papC*, *csgA*, *csgD*, *flu*, *pgaA*, *sfa*, *afa*, *bcsA*, *pgaC* ve *fliC* virülans genlerinin varlığında izolatların çoğunun MPY ile düşük düzeyde biyofilm üreticisi olduğu gözlemlendi.

Tablo 19. Virülans genlerinin varlığının MPY ile biyofilm üretimi ile ilişkisi

MPY ile Biyofilm Üretimi Derecesi					
Virülans Genleri	0 (n,%)	I (n,%)	II (n,%)	III (n,%)	Toplam (n,%)
<i>fimH</i>	27 (25)	74 (68,5)	4 (3,7)	3 (2,8)	108 (100)
<i>papC</i>	15 (27,8)	35 (64,8)	3 (5,6)	1 (1,8)	54 (100)
<i>sfa</i>	13 (28,9)	27 (60)	3 (6,7)	2 (4,4)	45 (100)
<i>csgA</i>	27 (25)	74 (68,5)	4 (3,7)	3 (2,8)	108 (100)
<i>csgD</i>	27 (25)	74 (68,5)	4 (3,7)	3 (2,8)	108 (100)
<i>afa</i>	5 (45,4)	6 (54,6)	0 (0)	0 (0)	11 (100)
<i>flu</i>	22 (24,7)	61 (68,5)	3 (3,4)	3 (3,4)	89 (100)
<i>bcsA</i>	7 (20)	26 (74,2)	1 (2,9)	1 (2,9)	35 (100)
<i>pgaA</i>	22 (26,5)	55 (66,3)	3 (3,6)	3 (3,6)	83 (100)
<i>pgaC</i>	9 (39,1)	13 (56,6)	1 (4,3)	0 (0)	23 (100)
<i>fliC</i>	8 (28,6)	20 (71,4)	0 (0)	0 (0)	28 (100)

5. TARTIŞMA

Toplum kaynaklı komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonları en sık görülen enfeksiyonlardan biridir ve özellikle premenapozal dönemdeki genç kadınları etkilemektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 11 milyon kişi İYE nedeniyle tedavi edilmekte, bu da yıllık yaklaşık 6 milyar dolar maliyete neden olmaktadır. İYE; böbrek hasarı, sepsis, tekrarlayan antibiyotik kullanımı sonucu mikrobiyatanın bozulması ve dirençli bakterilerin seçilmesi gibi komplikasyonlara neden olabilir (2, 66).

İYE geçiren kadınların yaklaşık 1/3'ünde tekrarlayan İYE atakları izlenir. Tekrarlayan İYE; 6 ay içinde 2 kez veya daha fazla ya da 1 yıl içinde 3 kez veya daha fazla İYE kliniğinin ortaya çıkmasıdır. Tekrarlayan İYE ortaya çıkan iş gücü kaybı, artan tedavi maliyeti ve hastanın sosyal hayatına olumsuz etkisiyle önemli bir sağlık sorunudur (23).

İYE genellikle toplum kaynaklı bir enfeksiyon olarak ortaya çıktığı için hastaların çoğunluğu polikliniklere başvuran hastalardır. Yüksek ve arkadaşlarının (67) 1594 hastanın idrar kültüründe üreyen *E. coli* izolatları ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada örneklerin %83'ünün polikliniklere başvuran hastalardan gönderildiği görülmektedir. Aral ve arkadaşlarının (68) idrar kültüründe üreyen 485 *E. coli* izolatıyla yaptıkları çalışmada ise örneklerin %86,39'u polikliniğe başvuran hastalardan alınmıştır. Benzer şekilde Öcal ve arkadaşlarının (69) çalışmasında ise örneklerin %98'i poliklinik başvurularından elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda da tekrarlayan İYE etkeni grubundaki izolatların %83,3'ü, tekrarlamayan İYE etkeni grubundaki izolatların % 87'si polikliniklerden gönderilen idrar örneklerinden izole edilmiştir.

İdrar yolu enfeksiyonlarında sorumlu etken sıklıkla *E. coli*'dir. İYE'ler çoğunlukla yatış gerektirmeden, oral antibiyotiklerle ampirik olarak tedavi edilmektedir. Bununla birlikte *E. coli*'de varolan antibiyotik direnç mekanizmaları ve virülans faktörleri enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmakta ve ciddi bir halk sağlığı problemine neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar *E. coli*'de çoğu majör antibiyotik sınıfına karşı direnç gelişebildiğini göstermiştir. Uygun ve etkili antimikrobiyal tedavi

sağlanabilmesi, tekrarlayan atakların önlenmesi için bu direnç mekanizmaları ve virölans faktörleri iyi anlaşılmalı, *E. coli*'nin bölgesel direnç profili iyi bilinmelidir (40, 70, 71).

Komplike olmayan İYE'lerin tedavisinde ilk seçenek olarak fosfomisin, nitrofurantoin veya pivmesilinam kullanımı önerilmektedir. Etken mikroorganizmada trimetoprim-sulfametoksazole karşı bölgesel direnç %20'nin altındaysa tedavide o da tercih edilebilir. Florokinolonlar akut sistit dışındaki enfeksiyonların tedavisindeki önemli rollerinden ötürü akut sistit tedavisinde alternatif seçenek olarak yer almalıdır. Alternatif seçeneklerden diğeri ise sefalosporinler gibi beta laktamların kullanımıdır fakat beta laktam grubu antibiyotiklerde etkinliğin düşük olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Ampisilin ya da amoksisilin kullanımı ise yüksek direnç oranları nedeniyle önerilmemektedir (72).

Çalışmamızdaki antibiyotik direnç oranları değerlendirildiğinde; İYE tedavisinde ilk seçeneklerden olan fosfomisin ve nitrofurantoin direncin düşük olduğu ve bu sonucun hem ülkemizle hem de dünya verileriyle uyumlu olduğu gözlemlenmektedir (69, 70, 73-79).

İYE etkeni *E. coli* izolatlarında trimetoprim-sulfametoksazole karşı hem dünyanın çeşitli bölgelerinde hem de ülkemizde yüksek oranda direnç mevcuttur (80-82). Bizim çalışmamızda da her iki grupta trimetoprim-sulfametoksazol direnci yüksek bulunmuştur. Bu durum İYE'lerin ampirik tedavisinde bölgemizde artık bu antibiyotiğin tercih edilmemesi gerektiğini düşündürmektedir.

Antibiyotiklere karşı direncin ortaya çıkmasında en önemli mekanizmalardan biri antibiyotiklere artmış maruziyettir. Sefalosporinler ve florokinolonlar geniş spektrumlu antibiyotikler olmaları sebebiyle pek çok enfeksiyonun tedavisinde tercih edilir. Bunun sonucunda bu grup antibiyotiklere dirençte önemli bir artış yaşanmıştır (70). Bizim çalışmamızda da tekrarlayan İYE etkeni grubunda hem sefalosporin (seftriakson, sefiksim) direnci hem de florokinolon (siprofloksasin, levofloksasin) direnci anlamlı derece yüksek bulunmuştur. Bu durumdan hareketle, tekrarlayan İYE oluşumunda daha dirençli etkenler yer aldığından ampirik tedaviden kaçınılmalı,

mümkünse idrar kültürü yapıp etkenin antimikrobiyal direnç paternine göre kullanılacak antibiyotiğe karar verilmelidir.

Gram negatif bakterilerle gelişen enfeksiyonların tedavisini zorlaştıran en önemli etkenlerden biri GSBL üretimidir. GSBL üretimi çoğu plazmitlerde kodlanan genlerin aktivitesi sonucu ortaya çıkmakta ve bu genler bakteriler arasında kolayca aktarılabilmektedir. GSBL üreten bakterilerin prevalansı coğrafi bölgeye, hasta popülasyonuna ve risk faktörlerine bağlı olarak değişmektedir. GSBL üreten *E. coli* prevalansı Kuzey Amerika’da yaklaşık %8, Avrupa’da yaklaşık %17 civarındadır (83). Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda ise GSBL prevalansı %11,8-%40 aralığında bulunmuştur (69, 74, 77, 84, 85). Bizim çalışmamızda bulunun GSBL oranı Türkiye verileriyle uyumludur. Bununla birlikte bu oran tekrarlayan İYE etkeni grubunda daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu durum İYE’de antibiyotiklerin yanlış ya da aşırı kullanımından kaynaklanmış olabilir.

Bakteri tiplendirmesi, suşların ayrıntılı olarak analiz edilerek genetik çeşitliliğin ve benzerlik düzeyinin belirlenmesini sağlar. PFGE ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği açısından bakteri tiplendirme yöntemlerinin altın standardı olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde kalıp DNA restriksiyon enzimleriyle belli bölgelerden parçalara ayrılır. Daha sonra bu DNA molekülleri agaroz jelde farklı yönlerden uygulanan ve voltajı belirli aralıklarla değişen elektrik akımıyla elektroforez edilir, böylece suşa özgü bant paterni oluşturulur. Fakat bu karmaşık yöntemin uygulanması için 3-4 günlük bir süre ve deneyimli laboratuvar personeli gereklidir. Bu yöntemin uygulanabilmesi için yüksek kalitede ve çok miktarda DNA gereklidir. Ayrıca gerekli malzemeler bakımından nispeten pahalı bir yöntemdir (86-88).

PZR ile tiplendirme yöntemleri, DNA bant paternine dayalı genotipik bakteri tiplendirme yöntemlerindendir. ERIC PCR yönteminde ERIC primerleri ile enterik bakterilerin çoğunun genomunda bulunan, 126 bp büyüklüğündeki tekrarlayan ve korunmuş ERIC dizileri çoğaltılır. Genomda bulunan bu dizilerin sayısına ve bulundukları bölgelere bağlı olarak suşa özgü DNA bant paterni oluşturulur AP-PCR yönteminde ise kısa zincirli bir oligonükleotid primer kullanılarak, düşük bağlanma

sıcaklığında kalıp DNA pek çok farklı noktadan çoğaltılır ve agaroz elektroforez sonucu suşa özgü DNA parmak izi oluşturulur. (89)

PZR ile tiplendirme yöntemleri hızlı, ucuz ve hassas oldukları için ve analizde az miktarda bakteriyel DNA yeterli olduğu için tiplendirmede sıklıkla tercih edilmektedir. Bununla birlikte bu yöntemlerin tekrarlanabilirliğinin düşük olması; tekrarlanabilirliğin deney ekipmanı, primer dizilimi, bağlanma sıcaklığı gibi faktörlerden etkilenmesi önemli dezavantajlarındanır. Ayrıca bu yöntemlerin ayırım gücü PFGE'nin ayırım gücü kadar yüksek değildir (86, 88, 89). Bizim çalışmamızda ERIC PCR ve AP-PCR sadece aynı hastaya ait suşların benzerliğinin değerlendirilmesinde kullanılmış olup, her değerlendirme aynı koşullarda çalışılan ve aynı jel üzerinde elektroforez edilen suşlar arasında gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle bizim çalışmamızda bu yöntemlerin tekrarlanabilirliği sorun oluşturmamaktadır. Ayrıca PZR ile tiplendirme yöntemlerinin ayırım gücünün PFGE'ye kıyasla düşük olması nedeniyle çalışmamızda iki farklı PZR yöntemi sırayla kullanılmıştır. İlk yöntemle aynı olduğu tespit edilen izolatlar tekrardan ikinci yöntemle değerlendirilmeye tabi tutulmuş ve bu problemin üstesinden gelmemiz sağlanmıştır.

Filogenetik sınıflandırma *E.coli* suşlarının hastalıklarla ilişkisini ortaya koymak açısından önemlidir. *E.coli* temel olarak A, B1, B2 ve D olmak üzere 4 ana filogruba ayrılır. Genellikle ekstraintestinal enfeksiyon etkeni *E.coli* suşları en çok filogrup B2 ve daha sonra filogrup D'de bulunurken, intestinal enfeksiyon etkeni olan veya kommensal suşlar filogrup A ve B1'de yer alır. (90). Bu durum üriner sistem enfeksiyonu etkeni UPEC için de geçerlidir. Literatürde UPEC suşlarının çoğunlukla filogrup B2'ye ve filogrup D'ye ait olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur (91-94). Bizim araştırmamızda elde edilen veriler de literatür ile uyumludur. Tekrarlayan İYE etkeni grubunda suşların %63'ü B2, %13'ü D filogenetik grubunda; tekrarlamayan İYE etkeni grubunda ise suşların %89'u B2, %7'si D filogenetik grubunda yer almaktadır.

UPEC suşları, üriner sistemde tutunmayı, invazyonu, kolonizasyonu ve enfeksiyon oluşumunu sağlayan çeşitli virülans faktörlerinin varlığıyla kommensal *E.coli*'lerden ayrılır (95). UPEC izolatları her ne kadar birbirlerine benzer özellikler

taşıyıcılar da bazı virülans faktörlerinin varlığı ve ekspresyonu açısından farklılık gösterirler. Ayrıca izolatlarının hepsinde bulunan ve üriner sistem enfeksiyonu oluşumunda varlığı tek başına yeterli olan bir virülans faktörü henüz tanımlanmamıştır (9).

Bu çalışmada *fimH*, *csgA* ve *csgD* genleri tüm suşlarda pozitif bulunmuştur. Yapılan pek çok çalışmada UPEC suşlarında prevalansı en yüksek virülans geni *fimH* olarak tespit edilmiştir (31, 92, 94, 96). Diğer fimbrial adezyon genlerinin (*papC* ve *sfa*) prevalansı da çalışmamızda yüksek (%50, %41,7) bulunurken afimbrial adezin kodlayan *afa* geninin prevalansı daha düşük (%10,2) bulunmuştur. Yapılan başka çalışmalarda da fimbrial adezyon moleküllerini kodlayan genler genellikle afimbrial adezin genlerinden daha yüksek oranda tespit edilmiştir (31, 96, 97). Fimbrial adezyon moleküllerini kodlayan genlerin yüksek prevalansı, tip 1 fimbria gibi adezyon moleküllerinin varlığının *E. coli* suşlarının ürotelyal epitele tutunmasında, biyofilm oluşumunun başlamasında ve üriner sistem enfeksiyonunun ortaya çıkmasında çok önemli rol oynadığını göstermektedir (92).

Poli-N-asetil glukozamin ve selüloz gibi ekzopolisakkaritlerin UPEC suşlarının üriner sistemde kolonizasyonunu ve kalıcılığını desteklediğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu durumun selülozun bakteri membranındaki immünojen yapıları gizleyerek konak immün yanıtından kaçışı sağlamasıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir (98). Çalışmamızda *bcsA* ve *pgaC* genlerinin prevalansı tekrarlayan İYE etkeni grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte *bcsA* ve *pgaA* genlerinin ekspresyonu mRNA miktarı ölçülerek değerlendirildiğinde; *pgaA* mRNA düzeyi tekrarlamayan İYE etkeni grubunda anlamlı düzeyde daha yüksek bulunurken, iki grup arasında *bcsA* mRNA düzeyi açısından anlamlı fark tespit edilmemiştir. Böylece, bakterilerde var olan genlerin ekspresyonunun çevresel faktörlere veya konakla ilişkili durumlara bağlı olarak değişebileceği ve UPEC suşlarının neden olduğu tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonu patojenezinde ekzopolisakkarit üretiminin tek başına etkili olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızdaki suşların %65,7'sinde Kongo kırmızılı agar yönetimiyle biyofilm üretimi pozitif bulunmuştur. Buna ek olarak suşların %68,5'nin mikrotitre

plak yöntemiyle düşük düzeyde biyofilm ürettiği tespit edilmiştir. Zhao ve arkadaşlarının (1) meta-analiz çalışmasında, UPEC suşlarının %84,6'sının biyofilm üreticisi olduğu, %44,6'sının ise düşük düzeyde biyofilm ürettiği saptanmıştır. Tajbakhsh ve arkadaşlarının (31) çalışmasında suşların %61,53'ünün Kongo kırmızılı agarda biyofilm ürettiği, Naziri ve arkadaşlarının (32) çalışmasında UPEC suşlarının %72'sinin mikrotitre plak yöntemiyle düşük düzeyde biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir.

Bizim çalışmamızda tekrarlayan İYE etkeni grubu ile tekrarlamayan İYE etkeni grubu arasında hem Kongo kırmızılı agarda biyofilm üretimi hem de mikrotitre plak yöntemiyle biyofilm üretimi açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Literatürde bizim sonucumuza benzer şekilde bu iki durum arasında anlamlı ilişki tespit etmeyen çalışmalar mevcuttur (99, 100). Bu durumda UPEC suşlarının *in vitro* ortamda biyofilm üretiminin her zaman *in vivo* ortamdaki biyofilm üretme yeteneğini yansıtmayabileceği unutulmamalıdır. Ayrıca UPEC suşlarının hücre içi biyofilm benzeri topluluklar oluşturduğu ve bu durumun ürotelyal epitelde kalıcılığı ve rekürren enfeksiyon oluşumunu desteklediği bilinmektedir (98). Hücre içi biyofilm benzeri toplulukların varlığı kolayca tespit edilemediği için çalışmamızdaki suşların tekrarlayan İYE oluşturma yeteneğine bu durumun katkısı olup olmadığı aydınlatılamamıştır.

Biyofilm üretimi tüm enfeksiyonların yarısından fazlasında gözlenebilen bir durumdur. Biyofilm içindeki bakterilerin planktonik bakterilere göre çevresel koşullara ve antibiyotik etkisine daha dirençli hale gelmesi tedavi açısından temel bir sorun oluşturmaktadır (101). Bu çalışmada da, test edilen antibiyotiklere dirençli olan ve GSBL üreten izolatların KKA'da biyofilm oluşumu ile ilişkisi değerlendirildiğinde; trimethoprim-sulfametoksazol, siprofloksasin, levofloksasin, seftriakson, sefiksime direnç ve GSBL sentezi ile biyofilm üretimi arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Aynı zamanda fosfomisin ve nitrofurantoin haricinde diğer antibiyotiklere dirençli olan izolatların ve GSBL sentezleyen izolatların büyük çoğunluğunun MPY ile düşük düzeyde biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Tabasi ve arkadaşlarının (102) İran'da gerçekleştirdikleri bir çalışmada da GSBL üretimi ile suşların biyofilm

oluşturma yeteneği arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir. Garousi ve arkadaşlarının 2022 yılında geręekleřtirdikleri bir sistematik derlemede 17 çalışmanın 14'ünde (%82,35) biyofilm oluşumu ile antimikrobiyal direnç arasında pozitif korelasyon belirlenmiştir (103).

Çalışmamızda *fimH*, *papC*, *csgA*, *csgD*, *flu*, *pgaA*, *sfa*, *afa*, *bcsA*, *pgaC*, *fliC* genlerinin prevalansı ile biyofilm üretimi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Bu genlerin varlığından bağımsız olarak suşların büyük çoğunluğunun biyofilm üreticisi olduğu göz önünde bulundurulduğunda suşların biyofilm üretebilme yeteneğinde bu genlerin tek başına etkili olmadığı; biyofilm üretiminde konakla ilişkili durumların, bakterinin diğer genetik özelliklerinin ve bulunduğu ortamın da etkili olabileceği dşnlmştir. Benzer şekilde, Naziri ve arkadaşlarının (32) alışmasında *fimH*, *papC*, *csgA*, *flu*, *afa*, *bcsA* ve *sfa/focDE* genlerinin varlığı ile suşların biyofilm oluşturma durumunun ilişkisi değerlendirilmiş, yalnızca *sfa/focDE* geninin varlığıyla biyofilm üretimi arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Buna rağmen, bu çalışmada da suşların büyük bir kısmında biyofilm üretimi saptanmıştır. Katongole ve arkadaşlarının (81) alışmasında da suşların %64'nde biyofilm üretimi gözlenirken; *fimH*, *papC*, *sfa* ve *afa* genlerinin varlığı ile suşların biyofilm oluşturma durumu arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.

6. SONUÇ

6.1. Sonuç

- Siprofloksasin, levofloksasin, seftriakson, sefiksim direnci ve GSBL üretimi tekrarlayan İYE etkeni grubunda daha yüksek olarak belirlendi.
- Çalışmamızdaki izolatlarda en etkili antibiyotikler fosfomisin, nitrofurantoin ve karbapenem grubu (ertapenem, imipenem, meropenem) olarak tespit edildi.
- Hem tekrarlayan İYE etkeni hem de tekrarlamayan İYE etkeni grubunda izolatların çoğunluğu filogenetik grup B2’de, ikinci sırada ise filogenetik grup D’de yer aldı.
- Çalışmamızdaki tüm izolatlarda *fimH*, *csgA* ve *csgD* genleri pozitif bulundu.
- *bcsA* ve *pgaC* genlerinin prevalansı tekrarlayan İYE etkeni grubunda daha yüksek bulundu.
- *pgaA* geninin ekspresyon düzeyi tekrarlamayan İYE etkeni grubunda daha yüksek bulundu.
- İzolatların büyük bir kısmında her iki yöntemle de biyofilm üretimi pozitif olarak belirlendi.
- Biyofilm üretimi açısından iki grup arasında fark tespit edilmedi.
- Trimethoprim-sulfametoksazol, siprofloksasin, levofloksasin, seftriakson, sefiksim direnç ve GSBL sentezi ile biyofilm üretimi arasında anlamlı ilişki saptandı.
- Hiçbir virülans geninin varlığı ile biyofilm üretimi arasında anlamlı ilişki bulunamadı.

6.2. Öneriler

- Çalışmamızda gruplar oluşturulurken hasta ile ilgili, İYE rekürrensine neden olabilecek potansiyel risk faktörlerinin bilinmemesi çalışmamızın kısıtlılıklarından biridir. Hasta dosyalarının incelenerek hasta ile ilgili risk faktörlerinin İYE tekrarlama ile ilişkisinin de ortaya koyulduğu daha geniş çaplı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

- Hastanemizde tekrarlayan İYE etkeni *E. coli* suşlarında yüksek oranda antibiyotik direnci mevcuttur. Bu enfeksiyonlarda kür sağlanabilmesi için antibiyotik dışı alternatif tedavi yöntemlerinin denenmesi akılda tutulmalıdır.
- Biyofilm üretimi, üriner sistem enfeksiyonlarının patogeneğinde ciddi rol oynamakta ve etkenleri antibiyotiklere daha dirençli hale getirmektedir. Tedavisi zor enfeksiyonların önüne geçebilmek adına özellikle üriner katater kullanımı gibi biyofilm oluşumunu kolaylaştıracak uygulamalar mümkün olduğunca kısıtlanmalıdır.
- UPEC suşlarının etken olduğu İYE'lerin tekrarlamasında virölans genleri ve biyofilm oluşumuna ek olarak etkili olan diğer mekanizmaların aydınlatılması gelecekte tedavi açısından büyük kolaylık sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Zhao F, Yang H, Bi D, Khaledi A, Qiao M. A systematic review and meta-analysis of antibiotic resistance patterns, and the correlation between biofilm formation with virulence factors in uropathogenic *E. coli* isolated from urinary tract infections. *Microb Pathog*. 2020;144:104196.
2. KOT B. Antibiotic Resistance Among Uropathogenic. *Polish Journal of Microbiology*. 2019;68(4):403-15.
3. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front Microbiol*. 2017;8:1566.
4. Totsika M, Moriel DG, Idris A, Rogers BA, Wurpel DJ, Phan MD, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* mediated urinary tract infection. *Curr Drug Targets*. 2012;13(11):1386-99.
5. Zamani H, Salehzadeh A. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes. *TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*. 2018;48:162-7.
6. Soto SM. Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches. *Advances in Biology*. 2014;2014:543974.
7. Kaur R, Kaur R. Symptoms, risk factors, diagnosis and treatment of urinary tract infections. *Postgrad Med J*. 2021;97(1154):803-12.
8. Bettcher CM, Campbell E, Petty LA, Rew KT, Zelnik JC, Lane GI, et al. Michigan Medicine Clinical Care Guidelines. Urinary Tract Infection. Ann Arbor (MI): Michigan Medicine University of Michigan© Regents of the University of Michigan.; 2021.
9. Ejrnæs K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull*. 2011;58(4):B4187.
10. Kwok M, McGeorge S, Mayer-Coverdale J, Graves B, Paterson DL, Harris PNA, et al. Guideline of guidelines: management of recurrent urinary tract infections in women. *BJU Int*. 2022;130 Suppl 3(Suppl 3):11-22.
11. Li R, Leslie SW. Cystitis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.
12. Bono MJ, Leslie SW, Reygaert WC. Uncomplicated Urinary Tract Infections. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.
13. Storme O, Tirán Saucedo J, Garcia-Mora A, Dehesa-Dávila M, Naber KG. Risk factors and predisposing conditions for urinary tract infection. *Ther Adv Urol*. 2019;11:1756287218814382.
14. Peck J, Shepherd JP. Recurrent Urinary Tract Infections: Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2021;48(3):501-13.
15. Aggarwal N, Leslie SW, Lotfollahzadeh S. Recurrent Urinary Tract Infections. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.

16. Mueller M, Tainter CR. *Escherichia coli* Infection. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.
17. Falk KN, Satola SW, Chassagne F, Northington GM, Quave CL. Biofilm Production by Uropathogens in Postmenopausal Women with Recurrent and Isolated Urinary Tract Infection. *Female Pelvic Med Reconstr Surg*. 2022;28(4):e127-e32.
18. Martinson JNV, Walk ST. *Escherichia coli* Residency in the Gut of Healthy Human Adults. *EcoSal Plus*. 2020;9(1).
19. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol*. 2017;123(3):570-81.
20. Berthe T, Ratajczak M, Clermont O, Denamur E, Petit F. Evidence for Coexistence of Distinct *Escherichia coli* Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(15):4684-93.
21. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(10):4555-8.
22. Josephs-Spaulling J, Krogh TJ, Rettig HC, Lyng M, Chkonia M, Waschina S, et al. Recurrent Urinary Tract Infections: Unraveling the Complicated Environment of Uncomplicated rUTIs. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021 2021; 11:[562525 p.].
23. Zare M, Vehreschild MJGT, Wagenlehner F. Management of uncomplicated recurrent urinary tract infections. *BJU International*. 2022;129(6):668-78.
24. Whelan S, Lucey B, Finn K. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)-Associated Urinary Tract Infections: The Molecular Basis for Challenges to Effective Treatment. *Microorganisms*. 2023;11(9).
25. Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics*. 2020;9(2):59.
26. Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol*. 2016;121(2):309-19.
27. Ballén V, Cepas V, Ratia C, Gabasa Y, Soto SM. Clinical *Escherichia coli*: From Biofilm Formation to New Antibiofilm Strategies. *Microorganisms*. 2022;10(6).
28. ÇAli A. Bacterial Biofilm: Prevention of Biofilm-Associated Infections. *Journal of Social and Analytical Health*. 2021;1(1):22-8.
29. Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:249-89.
30. Öztürk FY, Darcan C, Kariptaş E. The Determination, Monitoring, Molecular Mechanisms and Formation of Biofilm in *E. coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2023;54(1):259-77.
31. Tajbakhsh E, Ahmadi P, Abedpour-Dehkordi E, Arbab-Soleimani N, Khamesipour F. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2016;5:11.

32. Naziri Z, Kilegolan JA, Moezzi MS, Derakhshandeh A. Biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*: a complicating factor for treatment and recurrence of urinary tract infections. *Journal of Hospital Infection*. 2021;117:9-16.
33. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology (Reading)*. 2001;147(Pt 1):3-9.
34. Hobley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev*. 2015;39(5):649-69.
35. Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi TT, Vidal O, Lejeune P, Dorel C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol*. 2000;2(4):450-64.
36. Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2018;6(4).
37. Asadi Karam MR, Habibi M, Bouzari S. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Immunology*. 2019;108:56-67.
38. Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC Antimicrob Resist*. 2021;3(3):dlab092.
39. Zhou Y, Zhou Z, Zheng L, Gong Z, Li Y, Jin Y, et al. Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic *Escherichia coli*: Mechanisms of Infection and Treatment Options. *Int J Mol Sci*. 2023;24(13).
40. Paitan Y. Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2018;416:181-211.
41. Baron EJ. Classification. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston Copyright © 1996, The University of Texas Medical Branch at Galveston.; 1996.
42. Ramadan AA. Bacterial typing methods from past to present: A comprehensive overview. *Gene Reports*. 2022;29:101675.
43. Foxman B, Zhang L, Koopman JS, Manning SD, Marrs CF. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol Perspect Innov*. 2005;2:10.
44. Daxboeck F, Mustafa S, Assadian O, Heinzl H, Stadler M, Hirschl AM, et al. Accuracy of antibiotyping using standard antibiograms compared with 16S-23S ribosomal spacer PCR for diagnosis of MRSA. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24(9):640-2.
45. Ranjbar R, Tabatabaee A, Behzadi P, Kheiri R. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) Genotyping of *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Animal Stool Specimens. *Iran J Pathol*. 2017;12(1):25-34.
46. Wilson LA, Sharp PM. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. *Molecular Biology and Evolution*. 2006;23(6):1156-68.
47. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(24):6823-31.

48. Arribas R, Tòrtola S, Welsh J, McClelland M, Peinado MA. Arbitrarily Primed PCR and RAPDs. In: Micheli MR, Bova R, editors. Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1997. p. 47-53.
49. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(24):7213-8.
50. Kıran F, Osmanağaoğlu Ö. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi. 2011;27(1):62-74.
51. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST. 2022;Version 12.0.
52. Madico G, Akopyants NS, Berg DE. Arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by using templates from boiled cultures. *J Clin Microbiol.* 1995;33(6):1534-6.
53. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.* 2000;181(1):261-72.
54. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1995;12(2):85-90.
55. Crémet L, Corvec S, Batard E, Auger M, Lopez I, Pagniez F, et al. Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2013;75(3):252-5.
56. Ulett GC, Valle J, Beloin C, Sherlock O, Ghigo JM, Schembri MA. Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infect Immun.* 2007;75(7):3233-44.
57. Schiebel J, Böhm A, Nitschke J, Burdukiewicz M, Weinreich J, Ali A, et al. Genotypic and Phenotypic Characteristics Associated with Biofilm Formation by Human Clinical *Escherichia coli* Isolates of Different Pathotypes. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(24).
58. Cabal A, Gómez-Barrero S, Porrero C, Bárcena C, López G, Cantón R, et al. Assessment of Virulence Factors Characteristic of Human *Escherichia coli* Pathotypes and Antimicrobial Resistance in O157:H7 and Non-O157:H7 Isolates from Livestock in Spain. *Applied and Environmental Microbiology.* 2013;79(13):4170-2.
59. Buffet-Bataillon S, Le Jeune A, Le Gall-David S, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. Molecular mechanisms of higher MICs of antibiotics and quaternary ammonium compounds for *Escherichia coli* isolated from bacteraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(12):2837-42.
60. Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 2007;27(5):763-7.
61. Jia Y. Chapter 3 - Real-Time PCR. In: Conn PM, editor. *Methods in Cell Biology.* 112: Academic Press; 2012. p. 55-68.
62. Wittwer CT, Hemmert AC, Kent JO, Rejali NA. DNA melting analysis. *Mol Aspects Med.* 2024;97:101268.
63. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989;42(8):872-4.

64. Das S, Dash HR. Application of Molecular Microbiology. In: Das S, Dash HR, editors. Microbial Biotechnology- A Laboratory Manual for Bacterial Systems. New Delhi: Springer India; 2015. p. 203-36.
65. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*. 2007;115(8):891-9.
66. Bavanandan S, Keita N. Urinary Tract Infection Prevention and Treatment. *Semin Nephrol*. 2023;43(5):151468.
67. Memiş N, Yüksek G, Öksüz Ş. İdrar Örneklerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Kökenlerinin Antibiyotik Duyarlılığı. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2021;11(2):137-42.
68. Aral M. İdrar Örneklerinden İzole Edilen Gram Negatif Bakteriler ve Antibiyotiklere Direnç Oranlarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2011;41(4):139-42.
69. Duygu Ö CAL, Alper T, Iştar D. Çocuklarda Üriner Sistem Enfeksiyonu Etkeni Olan *Escherichia coli* İzolatlarında Virülans Faktörleri, Filogenetik Grup Özellikleri ve ST131 Klonu Varlığının Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2023;57(4):535-52.
70. Lee DS, Lee SJ, Choe HS. Community-Acquired Urinary Tract Infection by *Escherichia coli* in the Era of Antibiotic Resistance. *Biomed Res Int*. 2018;2018:7656752.
71. Lee JH, Subhadra B, Son YJ, Kim DH, Park HS, Kim JM, et al. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Lett Appl Microbiol*. 2016;62(1):84-90.
72. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, et al. International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women: A 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;52(5):e103-e20.
73. Cristea VC, Gheorghe I, Czobor Barbu I, Popa LI, Ispas B, Grigore GA, et al. Snapshot of Phylogenetic Groups, Virulence, and Resistance Markers in *Escherichia coli* Uropathogenic Strains Isolated from Outpatients with Urinary Tract Infections in Bucharest, Romania. *Biomed Res Int*. 2019;2019:5712371.
74. Hülya DURAN NÇ, Tuğba KULA ATİK. İdrar Kültüründen İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının Antibiyotik Direnç Oranları: Dört Yıllık Analiz. *ANKEM Dergisi*. 2020;34(2):41-7.
75. Carter C, Hutchison A, Rudder S, Trotter E, Waters EV, Elumogo N, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* population structure and antimicrobial susceptibility in Norfolk, UK. *J Antimicrob Chemother*. 2023;78(8):2028-36.
76. Bunduki GK, Heinz E, Phiri VS, Noah P, Feasey N, Musaya J. Virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):753.
77. Teker B, Sever N, Garashova D. Yaş ve Cinsiyetin Üriner Sistem Enfeksiyonu Etkeni *Escherichia coli* Kökenlerindeki Antibiyotik Direncine Etkisi. *Online Turkish Journal of Health Sciences*. 2021;6(2):300-9.

78. Tanrıverdi-Çaycı Y, Güne DB, Ertokatlı M, Hacıeminoğlu-Ülker K, Birinci A. Prevalence of Fosfomycin Resistance Among Enterobacterales Isolates in A Tertiary Care Hospital from Turkey. *Infect Dis Clin Microbiol*. 2022;4(4):252-7.
79. Mowlaboccus S, Daley D, Pang S, Gottlieb T, Merlino J, Nimmo GR, et al. Identification and characterisation of fosfomycin resistance in *Escherichia coli* urinary tract infection isolates from Australia. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;56(4):106121.
80. Naziri Z, Derakhshandeh A, Soltani Borchaloe A, Poormaleknia M, Azimzadeh N. Treatment Failure in Urinary Tract Infections: A Warning Witness for Virulent Multi-Drug Resistant ESBL- Producing *Escherichia coli*. *Infect Drug Resist*. 2020;13:1839-50.
81. Katongole P, Nalubega F, Florence NC, Asiimwe B, Andia I. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical isolates in Uganda. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):453.
82. Muratdağı G, Çilburunoğlu M, Kirişçi Ö, Yerlikaya H, Uğurlu H, Aral M. Bir Üniversite Hastanesine Gönderilen İdrar Kültürlerinde Üreyen İzolatların Dağılımı ve Antimikrobiyal Duyarlılık Profiline İncelenmesi. *Sakarya Tıp Dergisi*. 2020;10(4):677-83.
83. Bader MS, Loeb M, Brooks AA. An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. *Postgrad Med*. 2017;129(2):242-58.
84. Şenol A. Toplum Kökenli Üriner Sistem Enfeksiyonlarında Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamaz Üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. ve Antimikrobiyal Dirençleri. *Klinik Dergisi*. 2020;33(2).
85. Uysal A, Bozkır MA, Arslan E. Üropatojenik *Escherichia coli* Suşlarının Antibiyotik Direnç Profilleri ve Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Özelliklerinin Değerlendirilmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*. 2020;46(2):41-65.
86. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13 Suppl 3:1-46.
87. Sharma A, Lee S, Park YS. Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review. *Food Sci Biotechnol*. 2020;29(10):1301-18.
88. Li W, Raoult D, Fournier PE. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33(5):892-916.
89. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect Genet Evol*. 2009;9(4):430-40.
90. Halaji M, Fayyazi A, Rajabnia M, Zare D, Pournajaf A, Ranjbar R. Phylogenetic Group Distribution of Uropathogenic *Escherichia coli* and Related Antimicrobial Resistance Pattern: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:790184.
91. Badger-Emeka LI, Kausar N, Estrella E, Angeles GB. A Three-Year Look at the Phylogenetic Profile, Antimicrobial Resistance, and Associated Virulence Genes of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens*. 2022;11(6).
92. Hyun M, Lee JY, Kim HA. Differences of virulence factors, and antimicrobial susceptibility according to phylogenetic group in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from Korean patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021;20(1):77.

93. Yun KW, Kim DS, Kim W, Lim IS. Molecular typing of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Korean children with urinary tract infection. *Korean J Pediatr*. 2015;58(1):20-7.
94. Er DK, Dundar D, Uzuner H, Osmani A. Relationship between phylogenetic groups, antibiotic resistance and patient characteristics in terms of adhesin genes in cystitis and pyelonephritis isolates of *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*. 2015;89:188-94.
95. Arafa SH, Alshehri WA, Organji SR, Elbanna K, Obaid NA, Aldosari MS, et al. Antimicrobial Resistance, Virulence Factor-Encoding Genes, and Biofilm-Forming Ability of Community-Associated Uropathogenic *Escherichia coli* in Western Saudi Arabia. *Pol J Microbiol*. 2022;71(3):325-39.
96. Najafi A, Hasanpour M, Askary A, Aziemzadeh M, Hashemi N. Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Folia Microbiol (Praha)*. 2018;63(3):335-43.
97. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Genetic diversity and virulence characteristics of biofilm-producing uropathogenic *Escherichia coli*. *Int Microbiol*. 2022;25(2):297-307.
98. Lühje P, Brauner A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv Microb Physiol*. 2014;65:337-72.
99. Ejrnæs K, Stegger M, Reisner A, Ferry S, Monsen T, Holm SE, et al. Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence*. 2011;2(6):528-37.
100. Tapiainen T, Hanni AM, Salo J, Ikäheimo I, Uhari M. *Escherichia coli* biofilm formation and recurrences of urinary tract infections in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(1):111-5.
101. Hancock V, Ferrières L, Klemm P. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;267(1):30-7.
102. Tabasi M, Asadi Karam MR, Habibi M, Yekaninejad MS, Bouzari S. Phenotypic Assays to Determine Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Isolates and their Correlation with Antibiotic Resistance Pattern. *Osong Public Health Res Perspect*. 2015;6(4):261-8.
103. Garousi M, Monazami Tabar S, Mirazi H, Asgari P, Sabeghi P, Salehi A, et al. A global systematic review and meta-analysis on correlation between biofilm producers and non-biofilm producers with antibiotic resistance in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog*. 2022;164:105412.