T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

İDRAR YOLU ENFEKSİYONUNDAN İZOLE EDİLEN PATOJENİK *Escherichia coli* BAKTERİ SUŞLARININ ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN VE GENETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Osamah Faisal Kokaz ALZUBAIDI

DOKTORA TEZİ

DOÇ. DR. NEJDET GÜLTEPE

MART - 2023
KASTAMONU

TEZ ONAYI

Osamah Faisal Kokaz ALZUBAIDI tarafından hazırlanan "**İDRAR YOLU ENFEKSİYONUNDAN İZOLE EDİLEN PATOJENİK *Escherichia coli* BAKTERİ SUŞLARININ ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN VE GENETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı **13.03.2023** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir

Danışman	Doç. Dr. Nejdet GÜLTEPE Atatürk Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Savaş CANBULAT Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Fırat SEFAOĞLU Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Musa BULUT Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Selçuk BERBER Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitüsü Müdürü Doç.Dr. Osman ÇİÇEK .....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Osamah Faisal Kokaz ALZUBAIDI

ÖZET

DOKTORA TEZİ

İDRAR YOLU ENFEKSİYONUNDAN İZOLE EDİLEN PATOJENİK *Escherichia coli* BAKTERİ SUŞLARININ ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN VE GENETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

OSAMAH FAİSAL KOKAZ ALZUBAIDI

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI
DANIŞMAN: DOÇ. DR. NEJDET GÜLTEPE

İdrar yolu enfeksiyonunda patojenik *Escherichia coli* suşlarının antibiyotik direnci ve genetik özelliklerinin belirlenmesinde toplanan 30 idrar örneğinin %66,66 oranında kadınlardan, %33,33 oranında ise erkeklerden üro-patojenik *E. coli* izole edilmiştir. Örneklerden elde edilen 30 izolatın %73,30 oranındaki kısmı iki ila on üç antibiyotiğe karşı direnç göstermiştir. Yapılan antibiyogram tesitinde izolatların sırasıyla trimetoprim+sülfametoksazole (17) %56,66 oranında, siprofloksasin ve gentamisine (14) %46,66 oranında ve ampisilin/sulbaktam ve sefiksimin (9) %30,00 oranında direnç gösterdiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra ertapeneme 93,33 oranında, imipeneme %96,33 oanında ve meropeneme ise %100 oranında hassas oldukları belirlenmiştir. Resistans geliştirdiği tespit edilen 5 suşun tüm genom dizileme (WGS) düzeneği, izolat 1 için 5,24 Gbp, izolat 2 için 5,20 Gbp izolat 3 için 5,25 Gbp, izolat 4 için 5,25 Gbp ve izolat 5 için 5,36 Gbp olarak bulunmuştur. Seçilen bu 5 dirençli suş içindeki direnç genlerini araştırmak için, web tabanlı platform verileri birden çok sınıfa ait 19 direnç geni göstermiştir. Bunlardan β-laktamaz (*blaTEM-1B, blaCTX-M-15* ve *blaOXA-1*) çeşitli nesillerde sefalosporinlere karşı dayanıklı bulunmuştur. *sul1, sul2, dfrA17* ve *dfrA14* genleri trimetoprim+sülfametoksazole karşı, *aph(3")-Ib*, *aph(3")-Ia*, *aph(6)-Id*, *aac(3)IId*, *aac(3)IIe*, *aac(6)-Ib-cr*, *aadA5* genleri aminoglikozidlere karşı, *tet(B)* ve *tet(A)* genleri tetrasiklinlere karşı, *catA1* geni kloramfenkole karşı, *qnrS1* florokinolonlara karşı ve *mph(A)* geni makroliglere karşı dirence sahip bulunmuştur. Florokinolonlar, *gyrA, parC* ve *parE* genlerindeki nokta mutasyonlarını kaçırmışlardır. Bu çalışmaya dahil edilen virülans faktör genleri (*VF*) bakımından izolat 1, %17,85 oranında, izolat 2 %15,47 oranında ve izolat 3 %14,28 oranında insidansa saip bulunmuştur. İzolat 4 %25 oranında, izolat 5 ise en yüksek insidans oranı ile %27,38 olarak bulunmuştur. İzolatların *VF* kategorisi; adhesins 12, demir alım sistemi 9, koruma ve istila, toksin 4 ve muhtelif protein 7 olarak dağıtılmıştır. Filogruplar dört ana türde sınıflanmış olup; izolat 1 ve izolat 4 *B1* ve *B2* olurken izolat 2, izolat 3 ve izolat 5 grup D'de aynı filogenetik grupta yer almışlardır.

ANAHTAR KELİMELER:*Escherichia coli*, antibiyotik direnci, genetik varyasyon, genom analizi

Mart 2023,97 Sayfa

ABSTRACT

Ph.D THESIS

DETERMINATION OF ANTIBİOTIC RESISTANCE AND GENETIC PROPERTIES OF PATHOGENIC *Escherichia coli* BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM URINARY TRACT INFECTION

OSAMAH FAİSAL KOKAZ ALZUBAIDI

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF GENETICS AND BIOENGINEERING
SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. NEJDET GÜLTEPE

In collecting 30 urine samples, women (66,66%) were a major source of Uro-Pathogenic E. coli, while men (33,33%) existed. 73,3% of 30 isolates had resistance to two up to thirteenth antibiotics of many classes (even though belonging to the same class). The sensitivity test discloses resistance against trimethoprim+sulphamethoxazole (17) 56,66%, then ciprofloxacin and gentamicin (14) 46,66%. However, (9) 30,00% of ampicillin/sulbactam and cefixime witnessed resistance in 16 antibiotics of different classes. Ertapenem, imipenem, and meropenem all demonstrated little or no resistance, but great sensitivity arose at 93,33; 96,33, and 100%, respectively. Whole genome sequencing (WGS) assembly of five strains incriminated genome length start with 5,24 Gbp for isolate 1; 5,20 Gbp for 2; 5,25 Gbp for 3; 5,25 Gbp for 4 and 5,36 Gbp for 5. For investigating the resistance genes within 5 chosen resistant strains, web-based platform data showed 19 resistance genes belonging to multiple classes: β-Lactamase (*blaTEM-1B*, *blaCTX-M-15*, and *blaOXA-1*) withstand to cephalosporins in assorted generations. *sul1*, *sul2*, and *dfrA17*, *dfrA14* donate to trimethoprim+sulphamethoxazole resistance. Aminoglycosides (*aph(3")-Ib*, *aph(3")-Ia*, *aph(6)-Id*, *aac(3)IId*, *aac(3)IIe*, *aac(6)-Ib-cr*, *aadA5*), tetracyclines (*tet(B)*, *tet(A)*), chloramphenicol (*catA1*), fluoroquinolones (*qnrS1*) and macrolides (*mph(A)*). Fluoroquinolones overlooked point mutations inwards *gyrA*, *parC*, and *parE*. Virulence factor genes (*VFs*) were included in this study, isolate 1; 2 and 3 represent (15;13;12) (17,85; 15,47; 14,28%) respectively. Isolate 4 (21) (25%) finally isolate 5 as the highest incidence strain (23) (27,38%). VFs category distributed within our isolates as adhesins 12 genes, iron acquisition system 9, protection and invasion, toxins four, and other miscellaneous proteins 7. Phylogroups were located in four main sorts, isolates one and four located in *B1* and *B2*, respectively, and isolate two, three, and five in the same phylogenetic group D.

KEYWORDS:*Escherichia coli*, antibiotic resistances, genetic variation, genome analysis

March 2023, 97 Page

TEŞEKKÜR

Öncelikle hocam Doç. Dr. Nejdet GÜLTEPE'ye doktora çalışmam ve araştırmamdaki sürekli desteği, araştırmaya ve hayata karşı sabrı, mizahı ve aktif tavrı ve doktora kariyerim boyunca bana çok ilham verdiği için çok teşekkür ederim. Beni her zaman eleştirel düşünmeye, gözlerimi açmaya, topluma ve dünyaya katkıda bulunmaya teşvik etmiş ve gergin veya endişeli hissettiğimde beni yatıştırıp motivasyonumu artırmıştır. O sadece doktora danışmanı değil, aynı zamanda hayatımdaki manevi danışmanım olmuştur.

Tezim özel bir dönemde bitti, benim çalışmalarım sırasında tüm dünya pandemik COVID-19'a karşı mücadele ediyordu. Başta Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyloji Laboratuvarı'nda çalışanlar olmak üzere virüsü durdurmak ve hayat kurtarmak için ön saflarda yer alan insanlara özel şükranlarımı sunmak istiyorum.

Son olarak, bu tezi yazarken ve genel olarak tüm hayatım boyunca beni manevi olarak destekleyen aileme, ebeveynlerime ve eşime ve ayrıca çocuklarım Zaid ve Muamal'e teşekkür ederim.

Osamah Faisal Kokaz ALZUBAIDI

Kastamonu, 2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI ..... **ii**
TAAHHÜTNAME ..... **iii**
ÖZET…. ..... **iv**
ABSTRACT ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **x**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xii**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR DEĞERLENDİRMESİ **4**
2.1 *Escherichia coli* 4
2.2 İdrar Yolu Enfeksiyonu (İYE) 6
2.3 Virülens Faktörleri (VF) 8
2.4 Serotipler 13
2.5 Genom 14
2.6 Filogrup ve Çok Odaklı Dizi Yazma (MLST) 15
2.7 Antibiyotikler 16
2.8 Antimikrobiyal Direnç (AMR) 24
2.9 Tüm Genom Dizileme (WGS) 32
3. MATERYAL VE METOT **37**
3.1 Örneklerin Alınması 37
3.2 Bakterilerin İdentifikasyonu 37
3.3 Antibiyogram Testi 37
3.4 Tüm Genom Dizileme (WGS) 38
3.5 Antibiyotik Direnç Genleri 38
3.6 Virülens Faktörü (VF) 39
3.7 Filogruplar 39
3.8 Çoklu Odaklı Dizi Tiplemesi (MLST) ve Dizi Tiplemesi (ST) 40
3.9 Varyant Çağrı Formatı (VCF) 41
3.10 Veri Kullanılabilirliği ve Ulaşımı 41
3.11 İstatsitiksel Analiz 41
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA **43**
4.1 Hastaların Özellikleri 43
4.2 Fenotipik Antibiyotik Direnci 44
4.3 Tüm Genom Dizileme (WGS) 46
4.4 Direnç Genleri 48
4.5 Kromozomal Nokta Mutasyonları 54
4.6 Virülens Faktörleri (VF) 55
4.7 Flogenetik Gruplar 58
4.8 Çok Odaklı Sekans Tiplemesi (MLST) 60
4.9 Varyant Çağrı Tabanları (VCB) 62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **64**
KAYNAKLAR **66**

ÖZGEÇMİŞ.....96

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Patojenik *E. coli* kolonizasyon bölgeleri 6
Şekil 2.2 Bakterilere karşı antibiyotik hedef bölgeleri..... 18
Şekil 2.3 β-laktam antibiyotiklerin ana kimyasal yapısı 19
Şekil 2.4 β-laktam antibiyotiklerin terapötik sınıfları 21
Şekil 2.5 β-laktamazlar arasındaki moleküler ve fonksiyonel ilişkiler 29
Şekil 3.1 Genomik Epidemiyoloji Merkezi ResFinder 4.1 veritabanı arayüzü..... 38
Şekil 3.2 Filogrup spesifikasyonu için Clermont platformu 40
Şekil 4.1 Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı 43
Şekil 4.2 *E.coli* bakterisinin antibiyogram test sonuçları..... 44
Şekil 4.3 *E.coli* bakterisinin Türkiye'deki direç durumu 45
Şekil 4.4 *E.coli* bakterisinin sınıflandırmasının şematik gösterimi 47

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 ExPEC virülans faktörleri 10
Tablo 4.1 Tüm genom dizileme (WGS) 46
Tablo 4.2 İzolat 1'in direnç genleri 49
Tablo 4.3 İzolat 2'nin direnç genleri 50
Tablo 4.4 İzolat 3'ün direnç genleri 51
Tablo 4.5 İzolat 4'ün direnç genleri 52
Tablo 4.6 İzolat 5'in direnç genleri 53
Tablo 4.7 *E. coli* izolatlarında mutasyonlar ve buna bağlı değişiklikler 55
Tablo 4.8 Gen dağılımını kodlayan virülans faktörleri 56
Tablo 4.9 *E. coli* izolatlarının filogenetik grupları 59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	**:** Yüzde
&	**:** Ve
°C	**:** Santigrat derece
Gbp	**:** Giga baz çifti
µm	**:** mikrometre

Kısaltmalar

AIEC	**:** Yapışkan invaziv *E. coli*
AME	**:** Aminoglikozit değiştirici enzimler
AMR	**:** Antimikrobiyal direnç
APEC	**:** Kuş patojeni *E. coli*
BCF	**:** Baz arama biçimi araçları
CDC	**:** Hastalık kontrol ve önleme merkezi
CDDEP	**:** Dinamik, ekonomik ve politika hastalık merkezi
CGE	**:** Genomik epidemiyoloji merkezi
CNF1	**:** Sitotoksik nekrotizan faktör 1
DAEC	**:** Yaygın yapışık *E. coli*
DEC	**:** İshal yapan *E. coli*
DHP	**:** Dihidropteroat sentetaz
EAEC	**:** Enteroagregatif *E. coli*
ECDC	**:** Avrupa Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi
EHEC	**:** Enterohemorajik *E. coli*
EIEC	**:** Enteroinvaziv *E. coli*
EPEC	**:** Enteropatojenik *E. coli*
ESBL	**:** Genişletilmiş spektrumlu β-laktamaz
ETEC	**:** Enterotoksijenik *E. coli*
ExPEC	**:** Ekstraintestinal patojenik *E. coli*
FIM	**:** Floransa imipenemaz
GIM	**:** Almanya imipenemaz
GIT	**:** Gastrointestinal sistem
HGT	**:** Yatay gen transferi
IMP	**:** İmipenemaz
IMViC	**:** Metil kırmızısı, Voges-Proskauer ve sitrat reaksiyonu
IPEC	**:** Bağırsak patojenik *E. coli*
İYE/UTE	**:** İdrar yolu enfeksiyonları
KMA	**:** K-mer hizalaması
LPS	**:** Lipopolisakkaritler
MBL	**:** Metallo-β-laktamazlar
MDR	**:** Çoklu ilaca dirençli
MLST	**:** Multilokus dizisi tiplemesi

NCBI : Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NDM : Yeni Delhi MBL
NGS : Yeni nesil dizileme
NMEC : Neonatal menenjitle ilişkili *E. coli*
OMV : Dış zar vezikülleri
PABA : Para-amino benzoik asit
PBP : Penisilin bağlayıcı proteinler
PDR : Pan ilaca dirençli
PMQR : Plazmid aracılı kinolon direnci
PTC : Peptidil transferaz merkezi
QIR : Hareketsiz hücre içi rezervuarlar
RNAP : RNA-polimeraz
RND : Direnç-nodülasyon bölümü
SEPEC : Sepsis ile ilişkili *E. coli*
SNP : Tek nükleotid polimorfizmi
SPM : Sao Paulo MBL
ST : Dizi tipemesi
TB : Tüberküloz
UPEC : Üropatojenik *E. coli*
VCF : Varyant arama formatı
VF : Virulans faktörü
VIM : Verona entegre kodlu MBL
WGS : Tam genom dizileme
XDR : Geniş ölçüde ilaca dirençli

1. GİRİŞ

Yeni bir konakçı niş içinde kommensal bakteri oluşturmak, genellikle kommensalizmden patojeniteye geçişi destekler. Ekstraintestinal patojenik *Escherichia coli* (ExPEC), iki fazlı yaşam tarzlarına sahip farklı patovarları temsil eder. Bunlar, kommensal olarak bağırsakta kalabilirler veya kaçıp insan vücudunun başka yerlerinde hastalıklara neden olabilirler. ExPEC, bağlantılı oldukları hastalığa bağlı olarak üropatojenik *E. coli* (UPEC), neonatal menenjitle ilişkili *E. coli* (NMEC) ve sepsis ile ilişkili *E. coli* (SEPEC) olarak ayrılabilir (Zlatkov, 2019).

Birkaç patojenik bakteri idrar yolu enfeksiyonlarına (İYE) neden olabilir, ancak İYE'nin birincil nedensel maddesi, gastrointestinal sistemdeki (GIT) gram-negatif, çubuk şeklindeki bakteri *Escherichia coli*'den ayrılan patojenik bir serotip olan UPEC'dir. *E. coli*'nin, konakçısıyla faydalı bir simbiyotik ilişki oluşturan kommensal bir bağırsak bakterisi olduğu bilinmesine rağmen, bazı suşlar kommensal kohortlarından ayrılarak daha patojenik bir doğaya bürünebilir (Wiles vd., 2008). Bu nedenle, UPEC'in hastanın İYE'sinin GI kanallarından kaynaklandığı ancak periüretral alanı kolonize ederek üriner sisteme translokasyonuna neden olduğuna inanılır. Çeşitli virülans faktörleri (VF), bakterilerin benzersiz bileşenleri veya ürünleri, idrar yollarında bu kolonizasyonu mümkün kılar. Bu VF, UPEC enfeksiyonuna bir yanıt olarak indüklenen doğuştan gelen katı bağışıklık savunmasıyla savaşmak ve insan idrar yolunun zayıf ortamında bakterinin hayatta kalmasını desteklemek için ihtiyaç vardır (Meerman, 2016). Fonksiyonel kategoriler, UPEC VF adezinler, toksinler, demir alma sistemleri ve koruyucular olarak gruplandırır. VF genlerini kodlayan kromozomlar veya plazmitler dikey veya yatay olabilir, bu da spesifik VF genlerinin İYE patogenezinde oynadığı rolü anlamanın karmaşıklığına katkıda bulunur (Kudinha, 2017). Ayrıca, bu virülans faktörlerinin ve ilişkili kodlayıcı genlerin araştırılması, enterik *E. coli* patotiplerindeki bu faktörler ile konakçı proteinler arasındaki etkileşim hakkında moleküler düzeyde açık bilgi sağlayarak, bunların hastalıklara nasıl yol açtığını gösterebilir ve bunlara karşı önleyici stratejiler ortaya koyabilir (Kaper vd., 2004).

Antimikrobiyal direnç (AMR), hastanelerde, çiftlik hayvanlarında ve vahşi yaşamda gözlemlenen hızla artan AMR seviyeleri, bakteriyel enfeksiyonun bir kez daha tedavi edilemez hale geldiği bir senaryo yaratma tehdidiyle, günümüzün ciddi bir halk sağlığı sorunudur (WHO, 2014). Klinikte veya laboratuvarda yaygın olarak bulunan en iyi bilinen antibiyotik direnci mekanizmaları arasında antibiyotik parçalayıcı enzimler, ilaç hedef modifikasyonu, dışa akış ve ilaç alımının önlenmesi yer alır (Blair vd., 2015; Holmes vd., 2016; Khameneh vd., 2016). Bu mekanizmalar, 'resistome' veritabanlarında (direnç veren bilinen tüm genlerin toplanması) sonuçlanan, onlarca yıllık verimli çalışmalarda çok ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmiştir (Winkler vd., 2016).

Bir dizi yeni nesil dizileme (NGS) platformu şu anda mevcuttur ve bu tür dizileme platformlarının azalan maliyeti ve artan hızı ile tüm genom dizilemenin (WGS) kullanımı muhtemelen artacaktır. Her sıralama platformunun avantajları ve sınırlamaları vardır. Pacific Biosciences dizileme, genom montajı için faydalı olan diğer teknolojilere göre daha uzun okumalar sağlar; ancak bu platformun hata oranı daha yüksektir (~%13). Ion Torrent, nispeten düşük bir ham hata oranına (%1,78) sahiptir, ancak homopolimerleri saptamak ve yorumlamak için daha iyi olabilir (Buermans ve den Dunnen, 2014; Quail vd., 2012). Illumine dizileme platformları, NGS için rutin olarak kullanılır ve düşük hata oranına (<%0,4) sahiptir; bu durum, bu platformların önemli bir avantajıdır, ancak kısa okuma verilerinin kullanımı ve artan sayıda bitişik, genom montajı için zor olabilir. Tam sekanslanmış genomların sayısının düşük olduğu ve maliyet ve gerekli teknik beceriler nedeniyle birçok genomun hala tamamlanması gerektiği tahmin edilmektedir (Mavromatis vd., 2012).

Patojenlerin genotipleme yöntemleri, bulaşmasını anlamak, salgın yönetimi için önemli bir araçtır. Son zamanlarda, patojenlerin WGS'si, bir genotipleme aracı olarak daha erişilebilir ve uygun fiyatlı hale gelmiştir. Tüm patojen genomunun WGS yoluyla analizi, yüksek oranda ilişkili bakteri soylarını bile ayırt etmede benzeri görülmemiş bir çözünürlük sağlayabilir ve hastanelerde salgın analizinde çığır açabilecek durumdadır. Bun rağmen klinisyenler, erken dizileme platformlarının pahalı ve külfetli doğası nedeniyle WGS'yi salgın analizlerinde uygulamak konusunda uzun süredir tereddüt etmektedirler. Sıralama teknolojilerindeki ve analiz araçlarındaki son

gelişmeler, çıktı ve analiz hızını önemli düzeyde artırmış ve WGS'nin genel maliyetlerini düşürmüştür (Quainoo vd., 2017).

Çoklu odak sekans tiplemesi (MLST), *E. coli* ve diğer birçok bakteri türünün klonal bir yapıya sahip olduğunu ve bazı klonların yaygın olduğunu ortaya koymuştur (Woodford vd., 2011). Türleri tanımlamak için birkaç temizlik genindeki dizi varyasyonunu kullanan MLST, evrimsel çalışmalar için mükemmeldir ve izolatları kolayca karşılaştırır, ancak salgın analizi için daha fazla ayrım gerektirebilir (Diancourt vd., 2010). Farklı soylar, tüm *E. coli*'nin ortak bir atasından ayrılarak dört ana filogenetik grup A, B1, B2 ve D'ye yol açmıştır (Clermont vd., 2000). Türlerin daha yeni sekans tabanlı filogenisi, bunların birden çok alt soya bölünebilen çeşitli klonal gruplara nasıl ayrıldığını göstermiştir (Banerjee ve Johnson, 2014; Nicolas-Chanoine vd., 2014). ExPEC'e ait bazı alt soylar, idrar yolu enfeksiyonları, kan dolaşımı enfeksiyonları, neonatal menenjit ve peritonit gibi bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olur. Diğer soylar ishal yapan *E. coli*'yi (DEC) temsil ederken, diğerleri kommensaldir.

Bu çalışma, idrar yolu enfeksiyonlarına (İYE) neden olan *E. coli* bakterisini izole ve identifiye etmek ve ayrıca cinsiyet ve yaş grupları arasındaki dağılımı araştırmak üzere planlanmıştır. Temel olarak, morfolojik ve seçici kültür ortamın kullanılarak izole edilen *Escherichia coli* suşları farklı kuşaklardan antibiyotiklere karşı antibiyogram testine tabi tutulmuş ve bilinen antibiyotiklere karşı dirence neden olan işlevsel genler incelenmiştir. Genlerin incelenmesinde tüm genom dizileme (WGS) uygulamıştır. Öncelikli olarak hedef genler arasındaki ilişkiyi bulmanın yanı sıra virülans faktör genleri, filogenetik grupları, çoklu odak sekans tiplemesi ve tek nüleotid polimorfizmi (SNP) araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR DEĞERLENDİRMESİ

2.1. *Escherichia coli*

Bakterilerin doğa ve özellikle insanlar için önemini Gould (1996) "*mümkün olan, makul veya adil herhangi bir kritere göre, bakteriler dünyadaki baskın yaşam biçimidir ve her zaman da öyle olmuştur*" şeklinde ifade etmektedir. Son 20 yılda, biyoloji biliminde yaşanan gelişmeler ve teknoloji ile birlikte organizmaların biyolojik özelliklerinden birçoğunu öğrenme imkanımız doğmuştur. Bu bakımdan *Escherihia coli* bakterisi mevcut tüm model organizmalar ve genetik modifikasyon araçları arasında moleküler biyolojinin en öncelikli kullanım aracı olarak tercih edilmektedir (Idalia ve Bernardo, 2017).

Enterobacteriaceae, genetik olarak ilişkili ancak ekolojileri, konukçu aralıkları ve patojenik potansiyelleri açısından oldukça değişken olan bir Gram-negatif çubuk ailesidir. Bu aile 44 cins ve 107 türden oluşur, bazıları memelilerin gastrointestinal sisteminde kolonize olur ve kommensal mikrobiyomun bir parçasını oluşturur (Fam vd., 2015). *Salmonella* ve *Shigella* gibi bazı cinsler ve *Klebsiella pneumoniae, Yersinia pestis, Y. enterocolitica* gibi türler ve *Escherichia coli* bakterisinin bazı serotipleri normal koşullarda bile patojenken, diğer *Enterobacteriaceae* oportünistik patojenlerdir (Mukerji vd., 2017).

Tipik *E. coli* ilk olarak bebek dışkısından 1885 yılında Theodor Escherich tarafından izole ve karakterize edilmiştir (Escobar-Páramo vd., 2003). Gram-negatif bir basil çubuk şeklindedir, sadece yaklaşık bir μm uzunluğunda ve 0,35 μm genişliğindedir. Boyutları, suşa ve koşullarına bağlı olarak önemli ölçüde değişebilse de, büyüklüğünü ve uzunluğunu önemli ölçüde etkileyen farklı mutasyonlarla ilgili çalışmalar vardır. El-hajj ve Newman (2015), rastgele Tn10 yerleştirme yoluyla, işlevi belirsiz kalan ve başka bir mutasyonun tanımlanmayı bekleyen ybdN ve ybdM genlerinde bir eklemeye sahip olduğunu bulmuş ve bu özel mutantın 750 μm uzunluğa kadar büyüyebileceğini göstermişlerdir.

Ekoloji açısından, *E. coli*, oksijen varlığı için bir sensör (kinon havuzunda redoks durumu) taşıyan ve aktif hale getirebilen veya baskılayabilen oksijen seviyelerine bağlı olarak gerekli metabolik enzimler aracılığıyla fakültatif bir aerob bakteridir (ya oksijen varlığında solunum ya da yokluğunda fermantasyon gerçekleşir) (Liebert vd., 2006). Ayrıca *E. coli* ve diğer *Enterobacteriaceae*, oksijeni veya fermenti metabolize etme kapasiteleri nedeniyle bebek bağırsağında kolonize olan ilk organizmalar olabileceği düşünülmektedir. Bu fakültatif bakteri bu ortamda kalan oksijeni tüketeceğinden, diğer sıkı anaerobik bakteriler bağırsakta kolonize olabilir, insanlarda bulunan normal mikrobiyotayı oluşturur ve normal mikrobiyotanın bir parçası olarak gelişirler. Genellikle hareketlidirler, aside dirençli değildirler, spor oluşturmazlar, oksidaz negatif ve katalaz pozitiftirler ve nitratı nitrite indirgeyebilirler (Palmer vd., 2007).

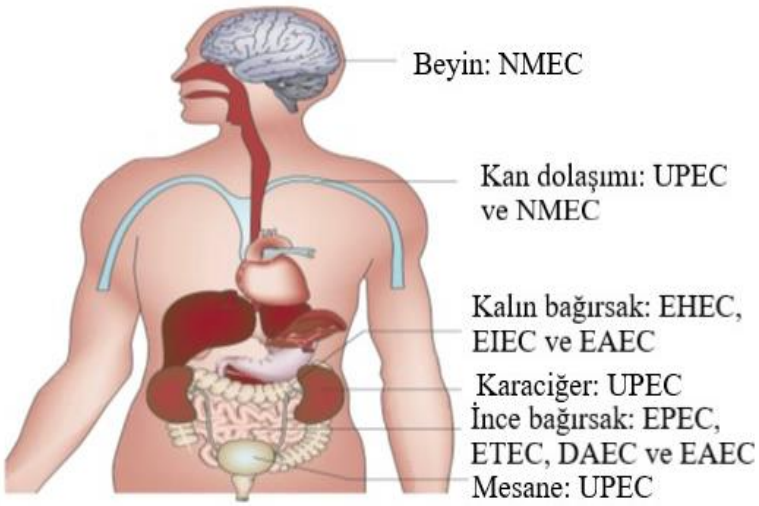
E. coli bakterisi, yaklaşık %55 protein, %25 nükleik asit, %9 lipid, %6 hücre duvarı, %2,5 glikojen ve %3 diğer metabolitlerden olumaktadır (Drews ve Schlegel, 1999). Bakterilerin vücutlarını oluşturan yapı taşları ve bunların düzeylerinin bilinmesi biyoteknolojik uygulamalar için önemlidir, çünkü karbon akışı, yeni bir metabolik yol oluşturmak veya mevcut işleyen bir yolu geliştirmek için sıklıkla ele alınması gereken sorunlu bir konudur. Ayrıca, karbon akışı, onları manipüle etmek ve istenen hedeflere ulaşmak için modelleme ve düzenleyici mekanizmaların temel olarak anlaşılmasını gerektiren karmaşık düzenleyici ağlar tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir (Machado, 2015; Romeo vd., 2013).

E. coli, hastalığa neden olma kabiliyetine göre üç ana gruba ayrılabilen oldukça çeşitli bir bakteri türüdür (Şekil 2.1). Bunlar:

- ✓ Kommensal veya patojenik olmayan *E. coli*,
- ✓ İshale neden olan bağırsak patojenik *E. coli* (IPEC),
- ✓ Bağırsak dışı patojenik *E. coli* (ExPEC),

şeklinde tanımlanmaktadır. ExPEC terimi, Johnson ve Stell (2000) tarafından tanımlanmıştır. Ayrıca bu bakteri, üropatojenik *E. coli* (UPEC), sepsisle ilişkili *E. coli*

(SEPEC), neonatal menenjitle ilişkili *E. coli* (NMEC) ve kuş patojeni *E. coli* (APEC) olarak alt sınıflara ayrılır (Horner vd., 2014). Patotip sınıflandırması, hastalığın klinik tezahürüne, dahil olan virülans faktörlerine (VF) ve filogenetik arka planına dayanır. En belirgin IPEC patotipleri, enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), diffüz yapışık *E. coli* (DAEC) ve yapışık invaziv *E. coli* (AIEC) şeklindedir (Crossman vd., 2010; Croxen ve Finlay, 2010; Kaper vd., 2004).



Şekil 2.1 Patojenik *E. coli* kolonizasyon bölgeleri (Croxen ve Finlay, 2010)

2.2. İdrar Yolu Enfeksiyonu (İYE)

İdrar yolu enfeksiyonu (İYE), kadınlarda ve yaşlı bireylerde en sık görülen bakteriyel enfeksiyonlardan biridir. Bu tür bir enfeksiyon, hayatı tehdit eden daha az ciddi enfeksiyonlara neden olabilir fakat hastaya önemli bir sıkıntılar yaşatır (Sheerin ve Glover, 2019). Enfeksiyon, dizüri ve idrara çıkma sıklığı gibi semptomlarla birlikte alt üriner sistemle sınırlı olduğunda akut sistit olarak adlandırılır. Enfeksiyon yan ağrısı, ateş, halsizlik gibi semptomlarla üst üriner sisteme yayılırsa enfeksiyon akut piyelonefrit olarak tanımlanır (Moreno vd., 2006). Bebekler ve yaşlılar dışında, enfeksiyon kadınlarda erkeklerden daha yaygın olarak görülür ve kadınların yaklaşık %40-50'sinin hayatlarında bir epizot geçirdiği ve %20-30'unun başka epizotlara sahip olduğu tahmin edilmektedir (Huang ve Lev, 2018). UPEC suşları, toplum kökenli

İYE'lerin (%70-95) ve nozokomiyal İYE'lerin büyük bir bölümünün birincil nedenidir (Kudinha vd., 2012). İYE asemptomatik, akut, kronik, komplike veya komplike olmayabilir. İYE'lerin klinik belirtileri, üriner sistemin ilgili kısmına, etiyolojik organizmalara, enfeksiyonun ciddiyetine ve hastanın buna karşı bir bağışıklık tepkisi oluşturma yeteneğine bağlıdır. Hem asemptomatik hem de semptomatik İYE, halk sağlığı hizmetleri için ciddi bir tehdit oluşturarak yaşam kalitesini düşürür ve çalışma hayatında aksaklıklara neden olabilir (Olowe vd., 2015).

İYE'nin esas nedeni bakterilerdir, ancak mantarlar ve bazı virüsler de buna sebep olarak görülmüştür. Bakteriler arasında; *E. coli, Klebsiella, Enterobacter, Proteus* sp. vb. dahil olmak üzere *Enterobacteriaceae* ailesinden Gram-negatif bakteriler öncelikli olarak yer alır. Ancak başta *Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus* ve *Streptococcus agalactiae* olmak üzere bazı Gram-pozitif organizmalar da özellikle genç kadınlar arasında bu hastalığa neden olabilmektedir. *E. coli*, tüm hasta gruplarında baskın nedensel ajandır ve tüm İYE'lerin %80-90'ına neden olur. Sonuç olarak, *E. coli* İYE patogenezini incelemek için bir model patojendir (Foxman, 2003). Riskli olmayan bireylerin çoğunda idrar yolu normalde sterildir ve eksojen mikroorganizmaların girişi idrar akışı, salgılanan ve dokuyla ilişkili antibakteriyel faktörler ve efektör bağışıklık hücrelerinin bakterisidal aktiviteleri ile engellenir. Çoğu durumda, konakçı dışkı florası, enfekte edici *E. coli* suşunun kaynağıdır. Perineal, vajinal ve periüretral alanlar yoluyla kolonizasyon oluşturabilecekleri alt üriner sisteme (yani üretra ve mesane) yayılır (Moreno vd., 2006). İYE patogenezi karmaşıktır. Periüretral boşluğun bir barsak üropatojeni ile kontamine olması ilk adım olarak kabul edilir, ardından üretra ve mesane kolonizasyonu gelir. Kolonizasyon adımlarını aydınlatan çalışmalar, İYE gelişimi sırasında üropatojenlerin başarılı bir şekilde yayılmasında pili ve flagellanın rolünü açıklamaktadır (Flores-Mireles vd., 2015). Terlizzi vd. (2017), patojeniteyi:

- ✓ Üretra kolonizasyonu ile periüretral ve vajinal alanların UPEC kolonizasyonu,
- ✓ Mesane lümenine yükselme ve idrarda planktonik hücreler olarak büyüme,
- ✓ Yüzeye yapışma ve mesane epitel savunma sistemi ile etkileşim,
- ✓ Biyofilm oluşumu,

- ✓ Hareketsiz hücre içi rezervuarların (QIR) oluştuğu ve altta yatan ürotelyumda bulunduğu mesane hücre içi bakteriyel toplulukları (IBC) oluşturarak istila ve replikasyon,
- ✓ Artan bakteriyemi/septisemi riski ile birlikte böbrek kolonizasyonu ve konakçı doku hasarı,

şeklinde açıklamaktadır.

UPEC idrar yoluna girdikten sonra konağın bağışıklık tepkisini ortaya çıkarır. UPEC'in ürotelyuma bağlanmasını azaltabilecek ana karşı faktörler, idrar akışı, düşük pH ve yüksek ozmolaritesi ve laktoferrin, lipokalin, tamm-horsfall proteini ve salgı IgA gibi birkaç çözünür faktördür. Bu birinci basamak savunmadan kaçınan UPEC, ürotelyuma yapışır ve istila eder, bu da bir dizi savunma mekanizmasına neden olan farklı toll benzeri reseptörleri aktive eder. Ardından, katelisidin veya defensinler (alfa ve beta-defensinler) gibi antimikrobiyal moleküllerin salınması, interlökin 6'nın salınması ve 8, istilacı UPEC'yi ortadan kaldırmak için nötrofiller ve dendritik hücreler gibi ek bağışıklık sağlayan hücreleri çeker, daha fazla istilayı önleyen hücre iskeleti yeniden düzenlemelerinin inhibisyonu ve faset hücrelerinde pul pul dökülmeye yol açan apoptotik yolların aktivasyonu şeklinde sistem çalışır (Weichhart vd., 2008).

2.3. Virülens Faktörleri (VF)

UPEC suşları, sistit ve piyelonefrit dahil olmak üzere İYE'lerin birincil nedenidir. Bu bakteriler, konakçı idrar yolunun olumsuz ortamlarında bakteriyel büyümeyi ve kalıcılığı kolaylaştıran çok sayıda virülans faktörü ve stratejisi geliştirmiştir (Wiles vd., 2008). Gram-negatif ve bazı Gram-pozitif bakterilerde, virülans genleri, genomlarının patojenite adaları olarak adlandırılan genomun diğer bölümlerinden farklı G + C içeriğine sahip belirli segmentlerinde (yaklaşık 10-200 kilobaz boyutunda PAI'ler) tahsis edilir. Virülant suşlarda bulunurlar, ancak nadiren aynı türün patojenik olmayan suşlarında bulunurlar. Bu sekanslar, yatay gen transferi (HGT) yoluyla türden türe yatay olarak aktarılabilir (Gal-mor ve Finlay, 2006; Hacker vd., 1997). Virülans faktörleri, başta bakteri, mantar, protozoa ve virüsler tarafından üretilen ve salınan proteinler olmak üzere spesifik moleküllerdir. Bakteriyel patojenlerde bu faktörler,

kromozom üzerinde bulunan spesifik genler veya mobil genetik elementler (plazmitler veya transpozonlar) tarafından kodlanır (Oluwaseun vd., 2018). Virülans faktörlerini kodlayan birçok genin ekspresyonu, İYE sırasında hastalığın şiddetine katkıda bulunur (López-Banda vd., 2014). *E. coli* patotiplerinin dört virülans sınıfı kolonizasyon, uygunluk, toksinler ve efektörler, her biri belirli bir işleve ve aktiviteye sahip birkaç spesifik virülans faktörü şeklinde Tablo 2.1'de verilmiştir (Pakbin vd., 2021). Şiddetli İYE'lerle ilişkili UPEC suşlarının en önemli virülans genlerinden bazı adezinler ve fimbrialar; aerobaktin (*aer*), P fimbriae (*pap*), tip 1 fimbria (*fimH*), fimbrial adezin I (*afaI*), hemolizin (*hly*), S fimbriadır (*sfa*). Ancak *kpsMT*, *traT*, *iutA*, *cvaC*, *ibe*, *fyuA* ve *usp* gibi diğer virülans genlerinin bu organizmanın patojenitesinde rol oynadığı bilinmektedir (Rashki, 2014).

Patojenik bakteriler ve konakçıları arasında demir için sürekli devam eden bir savaş vardır. Demir, prokaryotik ve ökaryotik hücresel aktiviteler için gerekli bir faktördür (Andrews vd.,, 2003). ExPEC ve daha spesifik olarak UPEC dahil olmak üzere patojenik bakteriler, konakçıdan demiri kaydırmak için çok sayıda strateji geliştirmiştir. Bunlar, çevreden demiri temizlemek ve onu bakteriyel sitozolde yoğunlaştırmak için yanroforları kullanan demir alım sistemlerinin ifadesini içerir. Sideroforlar, serbest bir katyon olarak çözünmeyen ferrik (Fe^{+3}) demire yüksek afiniteye sahip, düşük moleküler ağırlıklı moleküller salgılar. Bakteriler, siderofor-demir komplekslerinin bakteri zarı boyunca ve demirin salındığı sitozol içine taşınmasını kolaylaştıran reseptörler yoluyla demire bağlı sideroforları alır. Bununla birlikte, hem patojenik hem de K_{12}, *E. coli* suşları tarafından eksprese edilen ortak bir siderofor (enterobaktin), demiri ~10-49'luk daha da düşük bir Kd ile bağlar ve enterobaktinin demir bağlama için transferrini geride bırakmasına izin verir. Enterobaktin kullanımı, UPEC gibi bakterilerin idrar yolu gibi demirden fakir nişleri kolonize etmesine izin verebilir (Wiles vd., 2008). ExPEC patotipleri tipik olarak enterobaktin dışında birden çok demir alma sistemini kodlar. Özellikle UPEC, sideroforlar salmochelin, yersiniabactin ve aerobactin dahil olmak üzere, görünüşte gereksiz görünen çok sayıda demir toplama sistemini ifade eder. İlginç bir şekilde, salmochelinler, iroA gen kümesinde kodlanan bir glukosiltransferazın etkisi yoluyla glikosilasyonla modifiye edilmiş enterobaktin varyantlarıdır (Bister vd., 2004; Smith, 2007).

Tablo 2.1 ExPEC virülans faktörleri (Dale ve Woodford, 2015; Ejrnæs, 2011)

Virülans faktörü	Genler	Fonksiyon
Adezinler		
Adhezyon siderofor	iha	Siderofor fonksiyonu
Dr bağlayıcı adezinler	afa/draBC	Sistit ve piyelonefrit ile ürotelyumun invazyonu
E. coli ortak pilus	ecpA	Adezin
F1C fimbria	Foc gen kümesi	Adezin
Isıya dayanıklı hemaglutinin	hra	Adezin
M fimbria	bmaE	Adezin
N-asetil D-glukozamin-spesifik fimbria	Gaf	Adezin
P fimbria	papACEFG	Piyelonefrit ile ürotelyuma bağlanma
S fimbria	sfa/sfaS	Sistit ve piyelonefrit ile bağlanma
Isıya hassas hemaglutinin	Tsh	Ana kolonizasyon proteini
Tip 1 fimbria	fimH	Ürotelyuma bağlanma ve invazyona aracılık eder, IBC oluşumunda rol oynar
Demir toplama sistemleri		
Aerobaktin reseptörü	iutA	Ferrik demir alımı
Peri-plazmik demir bağlayıcı protein	SitA	Ferrik demir alımı
Salmoçelin reseptörü	iroN	Ferrik demir alımı
Siderofor reseptörü	ireA	Ferrik demir alımı
Yersiniabaktin reseptörü	fyuA	Ferrik demir alımı
Koruyucular ve istilacılar		
Kolisin V	Cva	ATP'den cAMP'nin oluşumunu katalize eder
Konjugal transfer yüzey dışlama proteini	traT	Dış zar proteini, serum bakterisit aktivitesine direnç
Grup 3 kapsül	kpsMT II	Fagositoz, opsonizasyon ve lizise karşı koruma
Artan serum sağkalımı	iss	Dış zar proteini, serum bakterisit aktivitesine direnç
Beyin endoteli invazyonu	ibeA	Neonatal menenjit, endotel invazyonu
K1/K2/K5 grup 2 kapsül çeşitleri	K1/K2/K5	Fagositoz ve kompleman aracılı öldürme, ekstraintestinal virülansa katkıda bulunma

Tablo 2.1'nin devamı

Koruyucular ve istilacılar		
kpsM II grup 2 kapsül	kpsM II	Fagositoz, opsonizasyon ve lizise karşı koruma
Dış zar proteaz T	ompT	Bakterilerin karşılaştığı yabancı peptit materyalini parçalayan temizlik proteazı
Toksinler		
α-hemolizin	hylD	Hücre parçalanması, konakçı sinyal yolaklarının modülasyonu, doku yaralanması, ürotelyumun pul pul dökülmesi
Sitoletal distansiyon toksini	cdtB	Konak hücre işlevinde veya morfolojisinde, hücre döngüsü durmasında veya parçalanmasında anormallikler
Sitotoksik nekrotizan faktör	Cnf1	Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, sinyal yollarının modülasyonu
Enteroagregatif *E. coli* toksini	astA	
Salgılanan otomatik taşıyıcı toksin	Sat	Konak hücre işlevinde veya morfolojisinde, hücre döngüsü durması veya parçalanması
Serin proteaz	Pic	Protein substratlarındaki peptit bağlarını ayırmak
Vakumlama toksini	vat	Mesane epitel hücrelerinde hücre iskeletinde değişikliklere neden olur ve lizozomal olmayan vakuol oluşumunu sağlar
Diğerleri		
β-glukoronidaz	uidA	Glukuronik asit ve toksinler arasındaki sıkı bağı koparır
Kolibaktin sentezi	Clb & clbB	Epitel hücrelerinin yaşlanmasına ve bağışıklık hücrelerinin apoptozuna yol açan ökaryotik hücrelerde kromozomal dengesizlik ve DNA hasarı

Tablo 2.1'nin devamı

Koruyucular ve istilacılar		
Üropatojenik spesifik protein	Usp	Bilinmeyen, önerilen bakteriyosin işlevi
Flagellin varyantı	H7 fliC	Flagella teşhis ve epidemiyolojik saptama proteini
Maltoz ve glikoza özgü PTS taşıyıcı alt birim IICBx	manXYZ	Sayısız şeker substratının sitoplazmik zar boyunca fosforilasyonu ve translokasyonu
Patojenite ada belirteci	malX	PAI belirteci olan farklı VF kodlama
D-serin deaminaz	DsdA	Detoksifiye edici enzim

UPEC ve diğer birçok mikrop tarafından kodlanan birincil yapışma faktörleri, pili veya fimbria olarak bilinen supramoleküler, filamentli yapışkan organellerdir. UPEC tarafından geliştirilen tipik yapışkan organeller, fim, pap, sfa ve foc operonları tarafından kodlanan tip 1, P, S ve F1C pilidir. Bireysel UPEC genomları, ayırt edilmesi zor olan UPEC virülansına her bir pilus tipine katkıda bulunan üstünkörü ayrıntılarla karakterize edilen N10 saçaklı gen kümelerini taşıyabilir (Snyder vd., 2005; 2006). Prototip tip 1 salgılanan toksin, α-hemolizin (HlyA), UPEC izolatlarının ~%50'si tarafından kodlanır ve ekspresyonu, İYE hastalarında artan klinik şiddet ile ilişkilidir (Henderson vd., 2004). Prototipik tip 1 salgılanan toksin, α-hemolizin (HlyA), UPEC izolatlarının ~%50'si tarafından kodlanır ve ekspresyonu, İYE hastalarında artan klinik şiddet ile ilişkilidir (Marrs vd., 2005). ExPEC ayrıca, toplu olarak oto-taşıyıcılar olarak bilinen çeşitli tipte V-salgılanmış toksinleri kodlar (Henderson vd., 2004). Bunlardan ikisi, vakumlanan oto-taşıyıcı toksini (Vat) ve salgılanan oto-taşıyıcı toksini (Sat), genellikle UPEC izolatları tarafından ifade edilir. Vat ve Sat başlangıçta hedef konakçı hücrelerde vakuolasyon ve şişme dahil olmak üzere çeşitli sitopatik etkileri indükleme yetenekleriyle karakterize edilirler (Ewers vd., 2007; Restieri vd., 2007).

UPEC tarafından eksprese edilen toksinler mutlaka çıplak proteinler olarak salgılanmaz, bunun yerine bakteri yüzeyinden taşan dış zar vezikülleri (OMV) ile ilişkilendirilebilir. Pek çok bakteri türü, tür içi ve türler arası iletişimi kolaylaştırmak, genetik materyal alışverişi yapmak, konakçı hücrelere bakteri yapışması ve istilası ve

toksinlerin taşınmasını kolaylaştırmak için OMV kullanır (Mashburn-Warren ve Whiteley, 2006). OMV'lerin patojenik bakteriler tarafından salınmasının, hedef konakçı hücrelere geçişte toksik kargoları koruduğu ve aynı zamanda konakçı aktiviteleri modüle edebilen konsantre efektör molekül patlamaları sağlamanın etkili bir yolunu sağladığı düşünülmektedir. HlyA ve sitotoksik nekrotize edici faktör 1 (CNF1), birincil olarak OMV yoluyla hedef konakçı hücrelere verildiği görülen, UPEC ile ilişkili iki toksindir (Balsalobre vd., 2006). Bu 113 kDa proteinin toksisitesi, Rho ailesi GTPazlar RhoA, Rac ve/veya Cdc42'yi aktive etme kabiliyetine bağlanır (Lemonnier vd., 2007). Rho GTPazların aktivasyonu, aktin stres liflerinin oluşumu, lamellipodia, filopodia, membran dalgalanmasının indüklenmesi ve enflamatuar sinyal yollarının modülasyonu dahil olmak üzere çok sayıda ökaryotik hücresel işlevi etkiler (Davis vd., 2006).

2.4. Serotipler

O:H:K serotipleme, spesifik bakterinin ifade ettiği lipopolisakkaritlerin (O), flagellanın (H) ve kapsüler yüzey antijenlerinin (K) tipine bağlı olarak farklı *E. coli* suşlarını karakterize etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. O, H ve K gibi belirli antijenlerin spesifik kombinasyonuna serotip denir ve birçok çalışma bazı serotiplerin belirli bir hastalıkla diğerlerinden daha fazla ilişkili olduğunu zaten göstermiştir (Orskov ve Orskov, 1983). *E. coli*'nin serotiplendirmesi, O (somatik) (lipopolisakkaritler yerine) esas alınarak modifiye edilmiş Kauffman şemasına göre yapılır ve H, K ve F antijenlerinin diğer dalları ile birlikte, antijenlerin spesifik bir kombinasyonu ile devam eder (Kai vd., 2010). 1976'dan beri, *E. coli* için O-serogrupları tanımlanmıştır (Wiles vd., 2008). UPEC'de O-serogrupları, her suşun virülans faktörü profili ile ilişkilidir. Önceki çalışmalar, O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25, O75 ve O83 serogruplarının tercihen UPEC suşları ile ilişkili olduğunu bildirmiş ve bir çalışmada, üç serogrup O4, O6 ve O75 UPEC'in %50'sini oluşturduğu bulunmuştur (Abe vd., 2008; Yamamoto, 2007). Spesifik K ve H antijenleri daha az tanımlanmış paternlere sahiptir (Johnson vd., 2005; Vosti, 2007). Her bir *E. coli*, İYE'nin klinik sunumunda hayati bir role sahiptir ve farklı serotiplerin prevalansı, farklı bölgelerde değişiklik gösterir. Son yıllarda, İYE vakaları arasında sefalosporinler, florokinolonlar ve trimetoprim direncinde bir artış olmuştur ve bu

artan bir endişe nedenidir. Hastanede yatan hastalarda, genişletilmiş spektrumlu β-laktamaz, Amp C ve Metallo-β-laktamaz üreten *E. coli* suşlarının prevalansında artış vardır ve bu da klinik yönetimi daha da zorlaştırır (Sharma vd., 2016; Stamm ve Norrby, 2001).

2.5. Genom

Genel olarak *E. coli* genomunun çeşitli, dinamik olduğu ve kromozomal plastisite sergilediği yaygın olarak kabul edilmektedir. Yanal gen transfer oranı yüksektir ve gen yerleşimi nispeten kısadır, bu da *E. coli* genomlarında yüksek bir gen akışına neden olur (Touchon vd., 2009). Bir türün genomu iki kategoriye ayrılabilir. Bir yandan çekirdek genom, bir bakteri türünün tüm suşlarında bulunan genler olarak tanımlanır. Replikasyon, transkripsiyon ve translasyonda yer alan temel temizlik genlerini içerir. Çekirdek genom, temel metabolik fonksiyonları tanımlayan bir bakteri türünün genomik omurgasını oluşturur (Rousset vd., 2021). Öte yandan, esnek/vazgeçilebilir genom, yalnızca birkaç suşta bulunan veya tekil izolatlar olarak adlandırılan tek izolatlara özgü genleri içerir. Bu genler, bir popülasyon veya türdeki çeşitli fenotiplerden ve belirli çevresel koşullara adaptasyonlardan sorumludur (Masignani vd., 2005).

Blattner vd. (1997), *E. coli* K-12 türü MG1655'in genom dizisinin tamamının 4,6-Mbp'lik tek bir kromozom halinde düzenlendiğini göstermiştir. 4.500 geni (303 temel), yani 4.300 ORF'yi, yedi rRNA operonunu, 86 tRNA'yı ve 74 psödojeni kodlar (Baba vd., 2006). Genel olarak, *E. coli* genomu genellikle yanal gen aktarımıyla şekillenir (Jarocki vd., 2020). *E. coli* pangenomu 18.000'den fazla farklı gen içerirken, tek bir hücre tipik olarak 4.000 ila 5.000 gen taşır ve farklı izolatlar arasında yalnızca yaklaşık 3.000 ortak gen bulunur. Bu, *E. coli* arasında yüksek genetik çeşitlilikle sonuçlanır (Stokes ve Gillings, 2011; Poirel vd., 2018), bu da fenotipik çeşitliliğe ve *E. coli* konakçılarına çeşitli düzeylerde ve şekillerde zarar vermesine yol açar. Bakteriyel pangenomların "açık" olduğunu ve bakteriler geliştikçe artmaya devam edeceği tahmin edilmektedir (Lapierre ve Gogarten, 2009). Farklı *E. coli* suşları arasında gözlemlenen genom boyutu farklılıkları, temel olarak, farklı suşlar arasında

korunan genel gen düzeni ile birkaç büyük kromozomal bölgenin eklenmesi veya silinmesinden kaynaklanmaktadır (Rode vd., 1999).

Genom dizileme projeleri, ExPEC arasında geniş genom çeşitliliği ortaya çıkarmıştır ancak aynı zamanda toksinler, demir alım sistemleri, adezinler, lipopolisakkaritler (LPS), polisakarit kapsülleri, proteazlar ve istilacılar dahil olmak üzere bazı patotipe özgü genleri de tanımlamış ve bu faktörler sıklıkla mobil öğeler üzerinde kodlanmaktadır (Gomes vd., 2010; Lu vd., 2011).

2.6. Filogrup ve Çok Odaklı Dizi Yazma (MLST)

Van Belkum (2007), bazı tanımlamalar yapmıştır. Bunların başında "suş" ve "izolat" gelir ve bunların bu tip çalışmalarda karıştırılmaması gerekir. Çünkü tiplendirme ile ayırt edilemeyen izolatlar aynı suşun sonraki nesilleri olabilir. Oysa "suşlar" tipleme yöntemleri ile ayırt edilebilir özellükte olmalıdır. "Klon" kelimesi, bir orijinden doğrudan türeyen izolatları tanımlamak için kullanılırken, bu kelime genellikle "suş" kelimesinin alternatifi olarak kullanılır. Farklı yerlerde ve belki de farklı zamanlarda farklı kaynaklardan bağımsız olarak kültürlenmiş olabilirler, yine de o kadar çok aynı fenotipik ve genotipik benzerliğe sahiptirler ki en olası açıklama ortak bir köken olabilir (Orskov ve Orskov, 1983).

Farklı soylar, tüm *E. coli*'nin ortak bir atasından çıkarak dört ana filogenetik grup A, B1, B2 ve D'ye yol açmıştır (Clermont vd., 2000). Ayrıca iki aksesuar grubu tanımlanmıştır (C ve E) (Tenaillon vd., 2010) ve daha sonra D'nin bir alt grubu "F" grubu tanımlanmıştır (Jaureguy vd., 2008). Türlerin daha yeni dizi tabanlı filogenisi, bunların birden çok alt soya bölünebilen çeşitli klonal gruplara nasıl ayrıldığını göstermiştir (Banerjee ve Johnson, 2014).

MLST ilk olarak *Neisseria meningitides* için 1998'de eski moleküler tipleme şemalarının laboratuvarları arasındaki zayıf tekrarlanabilirliğin üstesinden gelmek için geliştirilmiştir (Maiden vd., 1998). Sekans tipi (ST), bakteri kromozomu boyunca yayılmış yedi korunmuş temizlik geninin alelik varyantlarının MLST tarafından sınıflandırılan bakteri suşlarını tanımlar. Standartlaştırılmış bir şemaya dayalıdır,

dolayısıyla küresel olarak karşılaştırılabilir (Lane vd., 2007; Larsen vd., 2012). Bu ayırma yararlıdır, ancak klonal yayılımı saptamak için yine de yetersizdir. Bu nedenle, epidemiyolojik bağlantıyı araştırmak için genellikle daha ayrıntılı bir filogenetik karşılaştırmaya ihtiyaç duyulur (Pightling vd., 2018; Rantsiou vd., 2018). *E. coli*'nin belirli dizi türlerinin, tercih edilen bir konakçı ile sınırlı olmayıp insanlardan hayvanlara veya tam tersine aktarılabildiği için, ciddi enfeksiyonlar açısından daha yaygın olduğu ve zoonotik potansiyel sergilediği kabul edilmiştir. Bu uluslararası olarak mevcut yüksek riskli soylar arasında *E. coli* ST10, ST38, ST58, ST117, ST93, ST95, ST354, ST405, ST410, ST457, ST648, ST744, ST1158 ve ST1251 bulunur (Hayer vd., 2020; de Carvalho vd., 2020; Soncini vd., 2021).

Geleneksel olarak MLST, MLST şemasının lokuslarına özgü primerleri kullanan bir PCR amplifikasyon adımıyla başlar, ardından Sanger sekanslaması gelir. Prosedür hem maliyetli hem de zaman alıcıdır. Bu yeni yüksek verimli dizileme çağında, yazmak için WGS verilerini kullanmak daha mantıklı olabilir. DNA dizileme maliyetleri, her beş yılda bir düzenli olarak yaklaşık 10 kat azalmıştır. Takip eden ve üçüncü nesil sıralama yöntemlerinin geliştirilmesi, ekipman yatırımlarında eşit derecede önemli azalmalar sağlayarak, teknolojiyi bireysel araştırmacılar ve rutin klinik ve mikrobiyal laboratuvarlar için erişilebilir hale getirmiştir (Service, 2006).

2.7. Antibiyotikler

Antimikrobiyallerin klinik kullanımının modern çağı, 1907'de Paul Ehrlich ve Salvarsan aracılığıyla arsfenamin ajanlarıyla başlamış (Jacoby, 2017) ve 1930'larda Sir Alexander Fleming tarafından penisilin ve sülfonamidlerin keşfi, antimikrobiyallerin klinik kullanımını daha da hızlandırmıştır. 1935 yılında yayımlanan sülfonamidlerin keşfi, vücuttaki bakteriyel enfeksiyonları tedavi eden ilk ilaç olarak literatüre girmiştir (Stokstad ve Jukes, 1987). 1960'lardan sonra, bazı yeni antimikrobiyal sınıfları keşfedilmiştir. Bunlardan biri hücre zarını hedefleyen daptomisin, bir diğeri ise tüberküloza karşı dar bir spektrum olan bedakilindir (Lewis, 2013). Antibiyotikler tıp tarihindeki en önemli keşiflerden birini temsil etmektedir. Antibiyotik terimi "hayata karşı" anlamına gelse de, terapötik ajan olarak kullanımları ilk kez 20. yüzyılın ilk yarısından itibaren karmaşık, yaşamı tehdit eden bakteriyel

enfeksiyonların tedavisi için gerekli araçlardan birini temsil etmektedir. Böylece, antibiyotikler sadece bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu mortalite ve morbiditeyi azaltmakla kalmamış; insan yaşam kalitesini artırmaya yardımcı olmak için tıbbi müdahaleye ilişkin olasılıklarda da etkili olmuşlardır (Sass, 2017).

Bileşiğe ve hedef bölgesine bağlı olarak, bazı antibiyotikler, sırasıyla çoklu bakteri türlerini veya yalnızca seçilmiş küçük bir tür grubunu hedef alan geniş veya dar bir aktivite spektrumuna sahiptir. Bazı antimikrobiyal ajanlar, konsantrasyona bağlı bir şekilde çok çeşitli mikroorganizmalara karşı etki gösteren çok hedefli bileşiklerdir. Bu tür kimyasallar, bakteri hücre zarına nüfuz ederek ve bütünlüğünü bozarak, DNA çapraz bağı üreterek veya spor büyümesini ortadan kaldırarak oldukça spesifik olmayan etki modlarına sahiptir (Russell, 2003).

Antimikrobiyallerin ortaya çıkışı, potansiyel olarak ölümcül enfeksiyonların etkili bir şekilde tedavi edilmesini sağlamış ve insan klinik tedavi prosedürlerinde devrim yaratmıştır (El-Salabi vd., 2013). Antibiyotikler modern tıbbın temelini oluşturur ve kullanımları çocuk ölümlerini azaltmış ve yaşam beklentisini artırmıştır ve ayrıca invaziv cerrahi ve kemoterapi gibi tedaviler için çok önemlidir (Blair vd., 2015). Bununla birlikte, adından da anlaşılacağı gibi, antibakteriyel aktivite antibiyotiklerin tek işlevi değildir ve antibiyotik sınıflarının bazı üyelerinin alan içi iletişim için bakteriyel araçlar olarak geliştiği giderek daha fazla kabul görmektedir (Aminov, 2009). Örneğin, antimikrobiyal peptitler, yüksek organizmalarda doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin modülatörleri olarak işlev görmektedir (Bowdish vd., 2005).

Genel olarak, antimikrobiyallerin büyümeyi engellemek ve hatta bakteriyel hücre ölümüne neden olmak için başlıca beş mekanizması vardır. Bunlar:

1. DNA sentezini (florokinolonlar) inhibe ederek çift DNA oluşumunun inhibisyonu,

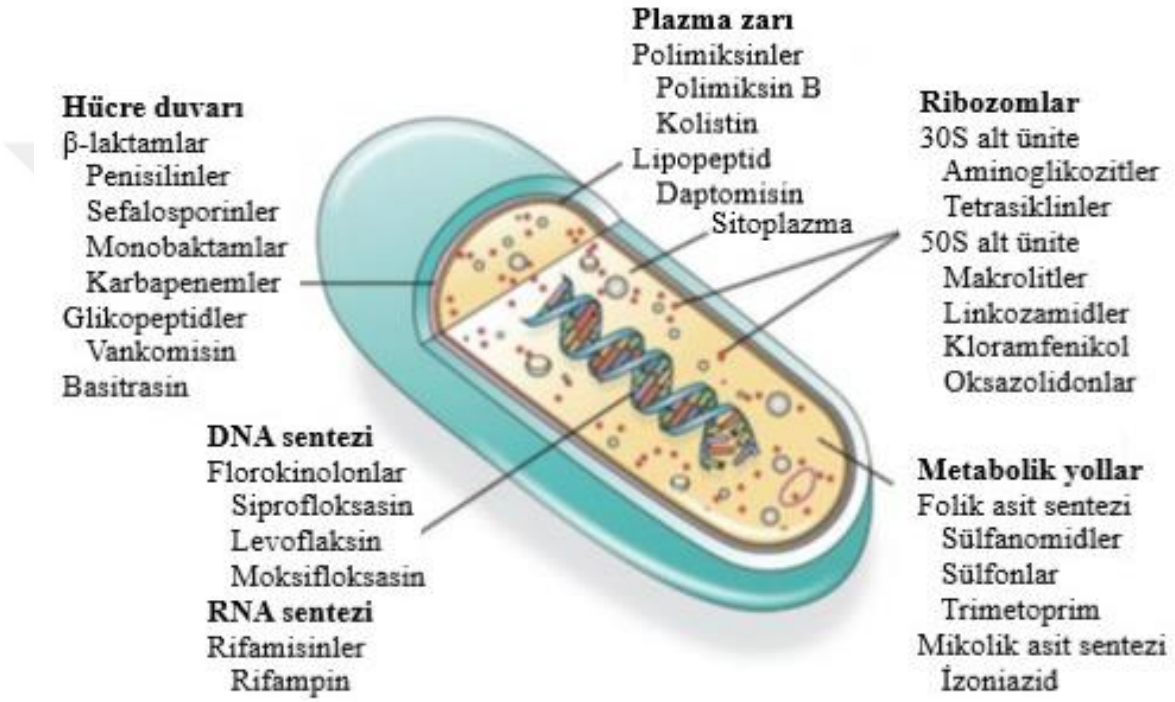
2. RNA sentezinin inhibisyonu (rifamisinler),

3. 50S veya 30S ribozomu inhibe ederek protein sentezinin inhibisyonu (makrolidler, aminoglikositler, tetrasiklinler),

4. Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu (β-laktamlar, glikopeptitler, lipopeptitler),

5. Rekabetçi yol antimikrobiyalleri olarak metabolik ilaçlar (sülfonamidler, trimetoprim).

Ayrıca ilaca bağlı strese karşı dezavantajlı bakteriyel hücre tepkisi gibi başka mekanizmalar da bildirilmiştir (Kohanski vd., 2010).

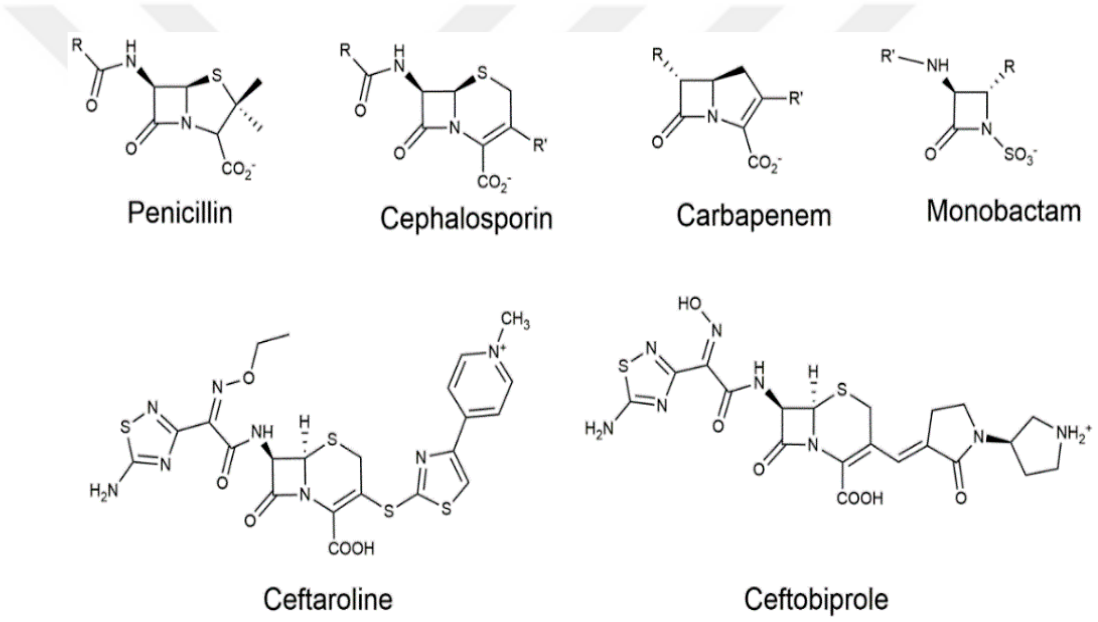


Şekil 2.2 Bakterilere karşı antibiyotik hedef bölgeleri

β -laktam antimikrobiyaller, aynı yapı özelliği olan beta-laktam halkasına sahip geniş bir antimikrobiyal grubudur. Penisilin G'nin keşfinden başlayarak tarihte tanımlanan ilk antimikrobiyal grubudur (Essack, 2001). Yapısal olarak, bakterilerin hücre zarfı, bir veya iki lipit zardan ve hücre duvarının glikopeptid yapı iskelesinden (peptidoglikan) oluşur. Genel olarak bakterilerde iki tip hücre zarfı vardır: Gram-pozitif ve Gram-negatif. Gram pozitif bakterilerin hücre zarfı, bakteriyel plazma zarının dışında kalın bir hücre duvarı tabakasından oluşur ve hücreyi tamamen kaplar (Sass, 2017).

Gram-negatif bakteriler, yapısal olarak Gram-pozitif türlerin peptidoglikanına benzeyen ek bir dış lipit membrana ve çok daha ince bir peptidoglikan tabakasına sahip

olduklarından, önemli ölçüde farklı bir hücre zarı mimarisine sahiptir. Antibiyotik araştırması ile ilgili olarak, dış lipid membran, antimikrobiyal maddeler dahil olmak üzere birçok bileşik için bir difüzyon bariyeri görevi gören ve böylece bakterileri birçok antibiyotiğin potansiyel olarak öldürücü etkilerinden koruyan içsel bir antibiyotik direnç faktörünü temsil eder. İç ve dış zarlar arasındaki boşluk olan periplazma, peptidoglikan biyosentezi, besin alımı, elektron transfer sistemleri ve detoksifikasyon gibi farklı fizyolojik yollardaki çeşitli enzimleri barındırır (Pagès vd., 2008). Antibiyotikler, peptidoglikan sentezinin hemen hemen her aşamasına, ya sentez reaksiyonunun temel bir substratını ayırarak ya da spesifik bir enzimatik reaksiyonu doğrudan inhibe ederek müdahale eder (Schneider ve Sahl, 2010).



Şekil 2.3 β-laktam antibiyotiklerin ana kimyasal yapısı (Sauvage ve Terrak, 2016)

β-laktam antibiyotikler, bakteriyel transpeptidazların katalitik aktivitesini peptidoglikan tabakasını çapraz bağlayarak ve büyüme ve bölünme sırasında hücre duvarını yeniden şekillendirerek hücre duvarının birleştirilmesinin son aşamalarında yer alacak şeklide etkili bir biçimde inhibe eder. Bu nedenle, bu enzimlere penisilin bağlayıcı proteinler de (PBP) denir. Genel olarak, çoğu bakteri türünde en az dört PBP vardır. Örneğin *E. coli*'de, yüksek moleküler ağırlıklı 1-3 PBP'nin transpeptidazlar ve transglikosilazlar olarak çalıştığı ve düşük moleküler ağırlıklı 4-6 PBP'nin D-alanin karboksilpeptidaz olarak çalıştığı gözlenir. Penisilin ve diğer β-laktam antibiyotiklerin PBP inhibe edici aktivitesi, penisilinin amid bağları ile enzim substratı (D-Ala-D-Ala

dipeptid - 2) arasındaki yapısal, geometrik ve stereokimyasal benzerliklere dayanır (Sauvage ve Terrak, 2016; Cochrane ve Lohans, 2020). Bu nedenle, düşük moleküler ağırlıklı β-laktam antibiyotik molekülleri, sitoplazmik zarın dış tabakasına kolayca nüfuz edebilir ve PBP'lere veya transpeptidazlara ulaşabilir (Lima vd., 2020). Genellikle penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, penemler (tiopenemler olarak da bilinirler) ve monobaktamlar olarak sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırma, β-laktam farmakofor birimine kaynaşmış halkanın kimyasal yapısına bağlıdır ve eş düzlemli olmayan bir bisiklik iskelet oluşturur (Şekil 2.3) (Selwyn, 1979).

Başka bir sınıflandırma, laktam halkası türevlerinde daha fazla ayrıntı ortaya çıkarmıştır (Sahoo ve Banik, 2020). Buna göre β-laktamlar çekirdek halka yapılarına göre:

1) Doymuş beş üyeli halkalara kaynaşmış β-laktamlar:

    a) Tiazolidin halkaları içeren β-laktamlar (penemler),

    b) Pirolidin halkaları içeren β-laktamlar (karbapenemlar),

    c) Oksazolidin halkalarına kaynaşmış β-laktamlar (oksapenemlar, klavamlar),

2) Doymamış beş üyeli halkalara kaynaşmış β-laktamlar:

    a) 2,3-dihidrotiyazol halkaları içeren β-laktamlar (penemler),

    b) 2,3-dihidro-lH-pirol halkaları içeren β-laktamlar (karbapenemler),

3) Doymamış altı üyeli halkalara kaynaşmış β-laktamlar:

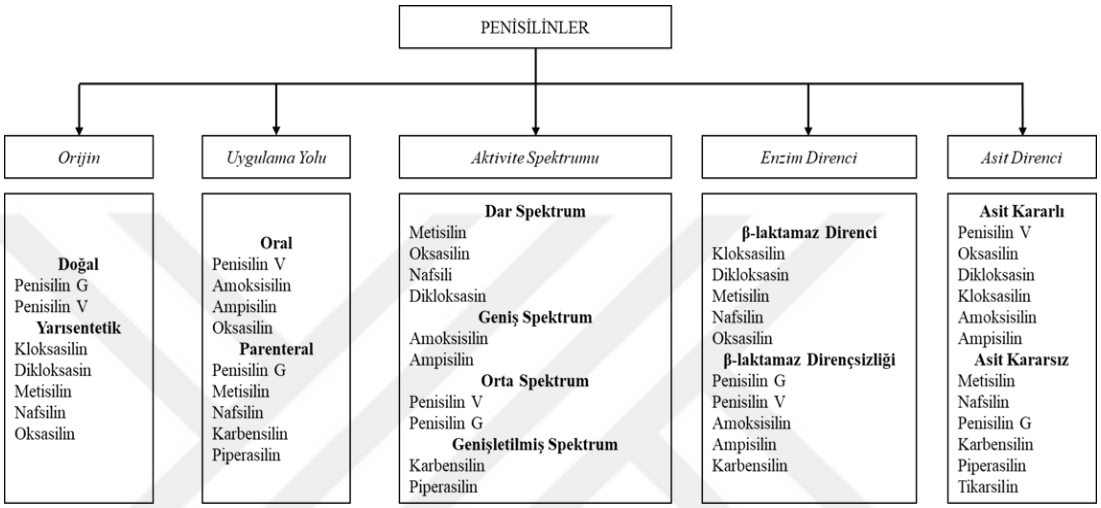
    a) 3,6-dihidro-2H-1,3-tiazin halkaları içeren β-laktamlar (sephemler),

    b) 1,2,3,4-tetrahidropiridin halkaları içeren β-laktamlar (karbakefemler),

c) 3,6-dihidro-2H-1,3-oksazin halkaları içeren β-laktamlar (oksafem).

4) Herhangi bir başka halka ile kaynaşmamış β-laktamlar (monobaktamlar),

β-Laktamlar ayrıca Şekil 2.4'te gösterildiği gibi aktivite spektrumlarına göre sınıflandırılırlar.



Şekil 2.4 β-laktam antibiyotiklerin terapötik sınıfları

Kinolon grubu antibiyotikler DNA replikasyonu ve döngüsünde yer alan temel bakteriyel süreçlere başarıyla etki ederler. Burada, klinik olarak ilgili florokinolonlar da dahil olmak üzere kinolonlar, muhtemelen en ünlü DNA sentezi inhibitörleri sınıfı, pertürb giraz (topoizomeraz II), topoizomeraz IV aktiviteleri ve DNA'nın kıvrılması ve çözülmesiyle kromozom işlevinde temel roller oynayan enzimlerdir. Örneğin giraz, DNA'dan düğümleri kaldırır, DNA'nın bükülmesine ve katlanmasına yardımcı olur, iplikçik ayrılmasını içeren tüm işlemler için kromozomu etkinleştirir ve hatta DNA boyunca kompleksin önünde negatif süper sargılar ekleyerek replikasyon ve transkripsiyon komplekslerinin hareketini kolaylaştırarak çevresel değişikliklere yanıt verir (Drlica ve Zhao, 1997).

Kinolonlar, klorokin (kinin) sentezinin bir yan ürünü olarak keşfedilen ve 1962'de George Lesher tarafından İYE tedavisi için tanıtılan nalidiksik asidin türevleridir (Hooper ve Jacoby, 2016). Nalidiksik asit ve diğer birinci nesil kinolonlar (oksalinik asit), toksisiteleri nedeniyle günümüzde nadiren kullanılmaktadır (Rubinstein, 2001).

İkinci (siprofloksasin), üçüncü (levofloksasin) ve dördüncü (gemifloksasin) kuşak kinolon antibiyotikler, kimyasal yapılarına ve kullandıkları öldürme mekanizmaları arasındaki niteliksel farklılıklara göre sınıflandırılabilir (Lu vd., 2001).

Birkaç çalışma, SOS yanıtının *E. coli*'de indüksiyon tepkisini önlediğini göstermiştir. Bu sistem, DNA'nın bütünlüğünü destekleyen çoklu faktörlerden ve yüksek mutagenez pahasına kapsamlı DNA hasarı üzerine hayatta kalmaya ve sürekli replikasyona izin veren hataya eğilimli faktörlerden oluşan küresel bir düzenleyici ağdır (Maslowska vd., 2019), kinolonlar (nalidiksik asit hariç) öldürmeyi artırır (Kohanski vd., 2007). SOS yanıtının aktivasyonunun önlenmesinin, hataya yatkın DNA polimerazların indüksiyonunu, homolog rekombinasyonu ve ilaca dirençli elementlerin yatay transferini bloke ederek ilaca dirençli mutantların oluşumunu azalttığı da gösterilmiştir (Beaber vd., 2004; Guerin vd., 2009).

Rifamisinler, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı güçlü antibiyotik aktivitesi olan geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. İlk olarak 1957'de keşfedilmiş ve tüberküloz (TB) tedavisinde kullanılmışlardır (Adams vd., 2021). DNA replikasyonunun kinolonlar tarafından inhibisyonuna benzer şekilde, rifamisin sınıfı yarı sentetik bakterisidal antibiyotikler tarafından RNA sentezinin inhibisyonu, prokaryotik nükleik asit metabolizması üzerinde yıkıcı bir etkiye sahiptir ve bakteriyel hücre ölümünü tetiklemektedirler (Floss ve Yu, 2005). Eylemlerine göre üç rifamisin grubu vardır. Bir inhibitör grubu, transkripsiyonu bloke etmek için DNA'ya bağımlı RNA-polimeraz (RNAP) ile etkileşime girer. Başka bir grup, çeviri başlangıcını ve uzamasını engellemek veya çeviri doğruluğunu etkilemek için 30S veya 50S ribozomal alt birimlerine bağlanır. Bazı antibiyotikler, yüklü tRNA moleküllerinin hücresel konsantrasyonunu veya tRNA moleküllerinin ribozoma teslim edilmesini ve salınmasını bozmak için tRNA moleküllerine ve uzama faktörlerine müdahale eder (Sass, 2017). Bunların yarı sentetik türevi antibiyotik rifampisin (rifampin olarak da bilinir), muhtemelen RNAP aktif merkezine bitişik bir bölgede RNAP'a bağlanan ve fosfodiester oluşumunu fiziksel olarak bloke ederek RNA sentezinin başlamasını engelleyen RNAP inhibitörlerinin en iyi bilinen temsilcisidir. RNA omurgasında bir "sterik oklüzyon" mekanizması ile bağlanır (Cavalleri vd., 1990; Bae vd., 2015). RNA ve RIF çarpışması, RNA 3-4 nükleotitlik bir uzunluğa ulaştığında meydana gelir ve

ardından RNA, promotör kompleksinden abortif bir transkript olarak salınır. Abortif RNA ürününün uzunluğu, bireysel yarı sentetik rifamisinin C3 sübstitüentinin doğasından etkilenebilir. Reaksiyon 50-fosforile olmayan bir dinükleotid primeri ile başlatıldığında, rifabutin bir trinükleotidin sentezini bile inhibe eder, oysa RIF buna izin verir (Artsimovitch vd., 2005).

mRNA translasyonu süreci, üç sıralı aşamadan (başlangıç, uzama ve sonlandırma) oluşur. Ribozom, bir mRNA transkripti, N-formilmetionin yüklü aminoasil tRNA, birkaç başlatma faktörü ve serbest bir 30S arasındaki bir kompleksin oluşumunu takiben (başlangıç fazı sırasında) bir araya gelen iki ribonükleoprotein alt biriminden, 50S ve 30S alt birimden oluşur. Protein sentezini inhibe eden ilaçlar, en geniş antibiyotik sınıfları arasındadır ve 50S inhibitörleri ve 30S inhibitörleri olarak iki alt sınıfa ayrılabilir (Sohmen vd., 2009).

Bakteriyel ribozomun kritik rolü, onu antibakteriyel ajanlar için önemli bir hedef haline getirir. Aslında, klinik olarak değerli birçok antibiyotik, bu karmaşık translasyonel ribonükleoprotein mekanizmasını hedefler. Çoğunlukla doğal kaynaklı olan bu bileşiklerin çoğu, 30S'de kod çözme (veya A bölgesi), 50S'de peptidil transferaz merkezi (PTC) ve ribozomalda peptid çıkış tüneli olarak üç bağlanma ribozomal bölgesinden birine bağlanır (Mccoy vd., 2011).

30S ribozom inhibitörleri arasında tetrasiklinler ve aminosiklitoller bulunur. Tetrasiklinler, aminoasil tRNA'ların ribozoma erişimini engelleyerek çalışır (Krause vd., 2016)). Aminosiklitol sınıfı, spektinomisin ve aminoglikozitleri (streptomisin, kanamisin ve gentamisin) içerir. 30S ribozom alt biriminin 16S rRNA bileşenini bağlar. Spektinomisin, uzama faktörü katalizli translokasyonu inhibe ederek peptidil tRNA'nın ribozoma bağlanmasının stabilitesine müdahale eder ancak protein yanlış translasyonuna neden olmaz (Davis, 1987; Pioletti vd., 2001). Aksine, aminoglikozidler ve 16S rRNA arasındaki etkileşim, ribozomda bir mRNA kodonu ile onun aynı kökenli yüklü aminoasil tRNA'sı arasında oluşan kompleksin konformasyonunu değiştirebilir. tRNA yanlış eşleşmesini teşvik ederek proteinin yanlış translasyonuna neden olur (Pape vd., 2000).

50S ribozom inhibitörleri arasında makrolidler (eritromisin), linkozamidler (klindamisin), streptograminler (dalfopristin-kinupristin), amfenikoller (kloramfenikol) ve oksazolidinonlar (linezolid) bulunur (Katz ve Ashley, 2005). 50S ribozom inhibitörleri, yeni oluşan peptit zincirini uzatan peptidiltransferaz reaksiyonunu inhibe eden protein translasyon başlangıcını veya peptidil tRNA'ların translokasyonunu oksazolidinonlar için olduğu gibi fiziksel olarak bloke ederek çalışır (Patel ve diğerleri, 2001). Makrolidler, linkozamidler ve streptograminler üzerine yapılan çalışmalar, bu ilaçların etki mekanizması için bir model formüle etmiştir. Model, peptidil tRNA'ların ribozoma erişiminin bloke edilmesini (değişen derecelerde), ardından peptidiltransferaz uzama reaksiyonunun sterik inhibisyon tarafından bloke edilmesini ve sonunda peptidil tRNA'nın ayrışmasının tetiklenmesini içerir (Vannuffel ve Cocito, 1996). Model aynı zamanda bu ilaç sınıflarının, uzama çok önemli bir uzunluğun ötesine geçtiğinde antibakteriyel aktivitelerini kaybetme olgusunu da açıklamaktadır (Tenson vd., 2003).

Sülfonamidler, dihidropteroat sentetaz aktivitesini rekabetçi bir şekilde inhibe eden para-aminobenzoik asit (PABA) yapısal analoglarıdır. Dihidrofolat redüktazın (trimetoprim) sülfonamidlerle eşzamanlı reçetesi, bakteriyel enfeksiyonlarda sinerjistik bir antimikrobiyal aktivite yaratır. Trimetoprim ve sülfametoksazol ile kotrimoksazol kombinasyonu, idrar yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan ilk antibiyotiktir (Suzuki ve Hoa, 2012). Sülfonamidler, folik asit biyosentez yolundaki bir katalitik enzim olan dihidropteroat sentaza (DHPS) bağlanmak için yapısal analog ρ-aminobenzoik asit ile rekabet eder, böylece dihidrofolik asit oluşumunu engeller (Sköld, 2000) ve sonunda dihidrofolat, tetrahidrofolat oluşumunu inhibe eder ve ayrıca daha sonra bakteriyel DNA büyümesini ve hücre bölünmesini veya replikasyonunu inhibe eder (Nemeth vd., 2015).

2.8. Antimikrobiyal Direnç (AMR)

Antimikrobiyal dirence atfedilebilen sağlık hizmetlerine yönelik artan zorluk ve ardından etkili antimikrobiyallere erişimin olmaması dünya çapında bir endişe kaynağıdır. Gerçek bir tehdit, çocuklukta hayatta kalmadaki gelişmeler de dahil olmak üzere antimikrobiyallere gelişmiş erişimden elde edilen halk sağlığı kazanımlarının

sekteye uğramasıdır (Laxminarayan vd., 2016). Antimikrobiyal direncin bilimsel temelini anlamak, antimikrobiyal direnç tehdidiyle mücadele etmek için çok önemlidir. Bu anlayış, uygun müdahale politikaları geliştirmek için gerekli olan toplum ve çevredeki antimikrobiyal direncin itici güçlerine kadar teşhis ve terapötiklere yeni yaklaşımlar sağlayan direnç mekanizmalarını kapsamalıdır (Mendelson vd., 2016). Bakteriler, en az bir antibiyotik sınıfına duyarlı olmadıklarında antibiyotiğe dirençli olarak sınıflandırılır. Dirençli enfeksiyonların 2050 yılına kadar her 3 saniyede bir kişiyi öldürebileceği ve dünya çapında ölü sayısını yılda 10 milyona çıkarabileceği tahmin edilmektedir (Kauser, 2020). Bu mikroorganizmaları direnç derecesine ve kazanılmış direnç profillerine göre sınıflandırmak için, antimikrobiyal direnç alanında uzman bir grup, Avrupa Hastalıkları ve Kontrolü Önleme Merkezi (ECDC) ve hastalık kontrol ve önleme merkezleri (CDC) ile ortak çalışma yaparak dirençli bakteriler arasındaki tanımları ve özellikleri belirlemiştir: Bunlar:

- ✓ Çoklu ilaca dirençli (MDR) (üç veya daha fazla kategorideki en az bir antibiyotiğe karşı kazanılmış dirence sahiptir),

- ✓ Yaygın ilaca dirençli (XDR) (en az bir antibiyotiğe karşı dirençlidir),

- ✓ Pan ilaca dirençli (PDR) bakteriler (tüm antimikrobiyal kategorilerindeki tüm ajanlara dirençlidir) (Vázquez-López vd., 2019),

şeklindedir.

Aşırı antibiyotik kullanımı ve yetersiz tedavi, AMR'yi daha uzun hastanede kalış sürelerine, çok maliyetli tedavilere ve daha yüksek ölüm oranlarına yol açan küresel bir sorun haline getirmenin ana nedenleridir (Elbadawi vd., 2022). Antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç iki tipe ayrılabilir:

1. İçsel veya doğuştan gelen direnç,

2. Kazanılmış direnç.

İlki, belirli bir bakterinin özelliğidir ve biyolojik özelliklerine bağlıdır (*E. coli,* vankomisine içsel direnç gösterir). Kazanılmış direnç:

1. Direnç genlerinin bakteriler tarafından edinilmesi,

2. Kromozomal DNA'nın mutasyonu,

3. Her iki mekanizmanın bir kombinasyonundan kaynaklanır (Khameneh vd., 2016).

Direnç genlerinin kazanılmasına plazmidler, transpozonlar ve integronlar gibi aktarılabilir genetik elementler aracılık edebilir. Özellikle, aktarılabilir plazmitler, konjugasyon yoluyla HGT için oldukça verimli bir araçtır. Bu prosedür sırasında, hem donör hem de alıcı bakterinin hücre yüzeyi, donör bakteriden alıcıya konjugatif plazmitleri aktarmak için bir köprü oluşturmak üzere temas eder (Llosa vd., 2002). Gram-negatif bakteriler, özellikle *Enterobacteriaceae* familyasına ait olanlar, antibiyotiklerin etkilerine karşı çeşitli savunmalar geliştirmiştir. Ek olarak, bazı suşların birden fazla ilaca direnç göstermelerine neden olan çok sayıda yolu vardır. Bunlar sırasıyla:

- ✓ *Enzimatik bozunma veya modifikasyon:* Bu mekanizma, antimikrobiyallerin, β-laktam halkasını hidrolize eden β-laktamaz enzimleri gibi bakteriler tarafından salgılanan spesifik enzimlerle inaktivasyonunu, dolayısıyla penisilin ve sefalosporinleri inaktive etmesini içerir (Livermore ve Woodford, 2006). Sefalosporinlerin enzimatik bozunmasına yol açan enzim örnekleri, AmpC β-laktamazlar, genişletilmiş spektrumlu β-laktamazlar (ESBL'ler) ve karbapenemazlardır (Verraes vd., 2013).

- ✓ *Hedef modifikasyonu:* Bu direnç mekanizması, antimikrobiyalin hedef bölgesinin değiştirilmesiyle oluşur ve bu da antimikrobiyalin bakteri hücresine bağlanmasını engeller ve böylece antimikrobiyal aktiviteyi devre dışı bırakır. Antimikrobiyalin iki ana hedefi olan DNA giraz ve DNA topoizomeraz IV enzimlerini kodlayan genin modifikasyonu sonucu florokinolon direnci, hedef modifikasyonu ve yapısal gen mutasyonuna (nokta mutasyon) bir örnektir (Drlica ve Zhao, 1997; Verraes vd., 2013).

- ✓ *Hücre geçirgenliğinde azalma ve dışa akış pompalarının ekspresyonu:* Hücre geçirgenliğini değiştirmek veya dışa akış etkisini artırmak, Gram negatif bakterilerde gözlenen bir başka direnç mekanizmasıdır. Antimikrobiyaller porin özgüllüğüne sahiptir ve hedef bölgelere girmek için su dolu kanallardan geçmelidir (Briceño vd., 2012). Dışa akış aktivitesindeki bir artış, bakteri hücresi içindeki direnç-nodülasyon bölümü (RND) akış pompaları gibi kromozomal olarak kodlanmış akış pompalarından veya tetrasiklin direncine bir örnek olan spesifik genlerin (genellikle plazmit kodlu) edinilmesinden kaynaklanabilir (Puzari ve Chetia, 2017). RND akış sistemleri *E. coli*'nin ArcAB-TolC'si geniş çapta incelenmiştir ve bunların sefalosporinler, florokinolonlar, penisilinler ve kloramfenikol dahil çok çeşitli antimikrobiyallere karşı etkili olduğu bilinmektedir (Puzari ve Chetia, 2017).

- ✓ *Metabolik yolun modifikasyonu:* Bakteri hücresindeki metabolik yollardaki (modifiye enzimler salgılayarak) değişiklikler veya değişiklikler de bir antimikrobiyal maddeye karşı dirençle sonuçlanabilir. Bu tür enzimleri kodlayan genler genellikle plazmitlerde bulunur. Trimetoprim direnci, plazmit aracılı ek trimetoprim dirençli DHFR'nin senteziyle trimetoprimin hedef bölgesinin değiştirildiği ve baypas edildiği bu mekanizmanın bir örneğidir (Young ve Amyes, 1986).

β-laktam antibiyotikler gibi önemli sayıda antimikrobiyal ilaca ve son zamanlarda bazı β-laktamaz inhibitörlerine karşı bakteriyel direnç, antibiyotik kemoterapisinin temelini oluşturan ilaçların terapötik kullanımını tehdit eden büyüyen bir klinik problemdir. β-laktamaz enzimleri penisilinlerin, sefalosporinlerin, monobaktamların ve karbapenemlerin β-laktam halkasını asilasyon/deasilasyon bazlı bir süreçte hidrolize eder (Drawz vd., 2014; Odoki vd., 2019).

β-laktamazlar, Ambler'in (Ambler, 1980) moleküler yapı sınıflandırmasına ve Bush-Jacobi-Medeiros'un (Bush ve Jacoby, 2010) fonksiyonel sınıflandırmasına göre sınıflandırılmıştır. 1970'den beri, β-laktamazları ayırt etmek ve sınıflandırmak için;

- ✓ İzoelektrik nokta,

- ✓ Moleküler kütle,
- ✓ Farklı β-laktamlara yönelik nispi aktivite (substrat profili),
- ✓ İnhibitörler ile etkileşim,
- ✓ Aktif bölgenin doğası,
- ✓ Amino asit dizisi,
- ✓ Üç boyutlu yapı,

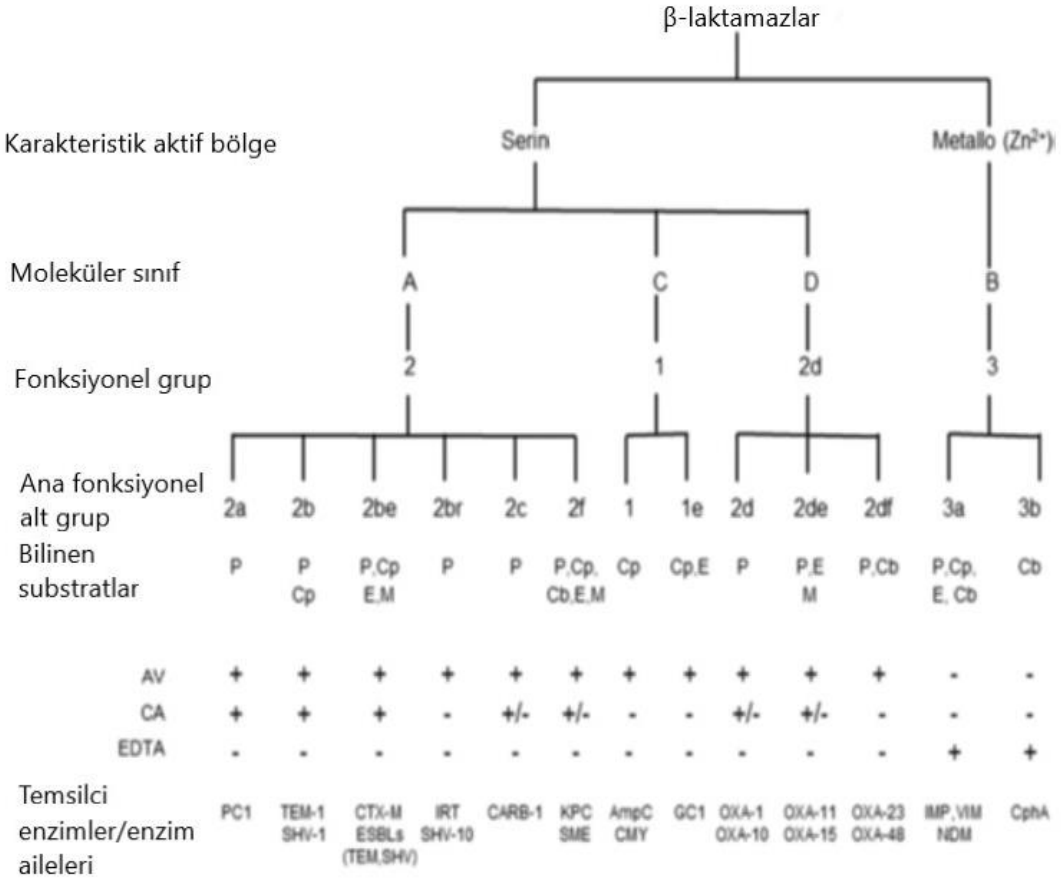
gibi bazı kriterler kullanılmıştır (Ambler, 1980). Bununla birlikte, en yaygın olarak kullanılan sınıflandırma, protein sekans benzerliklerine dayanmaktadır. Dört ana β-laktamaz sınıfı tanımlanmıştır:

A. Penisilinazlar,
B. Çinko metaloenzimler/Metalo- β-laktamazlar (MBL),
C. Sefalosporinazlar,
D. Oksasilinazlar (Şekil 2.5).

Bunlardan A, C ve D sınıfları, reaktif nükleofil olarak katalitik bir serin kalıntısı kullandıkları için serin-β-laktamazlardır ve B sınıfı enzimler ve çinkoya bağımlı hidrolazlardır (Wilke vd., 2005; Rawlings vd., 2010). B Sınıfı, diğerlerinden farklı olarak, β-laktam halkasının hidrolizini katalize etmek için iki değerlikli bir metal katyon, esas olarak Zn^{2+} ihtiyaç duyar.

A sınıfı enzimler, hidrolize edebildikleri substratın türüne göre oldukça çeşitli bir gruptur. En yaygın enzimler, plazmit kodlu β-laktamazlardır: *Enterobacteriaceae*'nın çoğunda bulunan TEM, SHV ve penisilinleri ve sefalosporinleri hidrolize eden *E. coli*'de yaygın olarak bulunan CTX-M enzimleridir (Bush, 2018; Liakopoulos vd., 2016; Walther-Rasmussen ve Høiby, 2007). Plazmid aracılı TEM-1, TEM-2 ve SHV-1, 1970'lerden 1980'lere kadar rapor edilmiştir (Sirot, 1995). Son olarak, 1990'ların sonlarında, A sınıfı olarak sınıflandırılan β-laktamaz, karbapenemleri parçalayan bir karbapenemaz olmak üzere mutasyona uğramıştır (Walther-Rasmussen ve Høiby, 2007).

C Sınıfı enzimler, *Enterobacteriaceae* familyasının *Enterobacteria* cinsinin birçok üyesinin genomunda taşınan ve sefalosporinleri (serin sefalosporinazlar) spesifik olarak hidrolize eden serin-β-laktamazlardır. Bu grubun en temsili örnekleri, genişletilmiş spektrumlu sefalosporinler (seftazidime, sefotaksim ve seftriakson) ve sefamisinler (sefoksitin) dahil olmak üzere çoğu sefalosporini hidrolize eden AmpC tipi β-laktamazlardır (Thomson, 2010).



Şekil 2.5 β-laktamazlar arasındaki moleküler ve fonksiyonel ilişkiler (Bush, 2013). (AV, avibaktam; CA, klavulanik asit; Cb, karbapenem; Cp, sefalosporin; E, geniş spektrumlu sefalosporin; M, monobaktam; P, penisilin)

OXA-1 ve OXA-10'u içeren OXA enzimleri olarak bilinen Ambler D sınıfı β-laktamazlar, A ve C sınıfı β-laktamazlara benzer bir aktif serin bölgesine sahiptir. Bu β-laktamazlar, kloksasilin- ve oksasilin-hidrolize edici aktivite gösterir. OXA-11 ve OXA-15 gibi β-laktamazlarda, bozunma substratı geniş spektrumlu sefalosporinlere (oksiimino-β-laktamlar) kadar uzanır, ancak karbapenemlere yayılmaz (Danel vd., 1995; 1997). Bu tip β-laktamazlar sıklıkla plazmitler ve/veya integronlar üzerinde kodlanır ve bu da geniş yayılmaya olanak tanır (Antunes ve Fisher, 2014).

B sınıfı β-laktamaz, diğer β-laktamaz sınıfları için kesin konumdaki bir serin kalıntısına kıyasla, enzim aktif merkezinde Zn^{2+} metaline sahip bir MBL'dir. MBL geni bir integron, transpozon, plazmit, kromozom veya başka bir genetik molekül üzerinde bulunabilir. MBL'ler, amino asit dizilerine göre üç alt sınıfa (B1, B2, B3) sınıflandırılabilir. Bununla birlikte, gruplar arasındaki amino asit özdeşliği seviyesi %20 kadar düşük veya daha azdır (Palzkill, 2013). Bugüne kadar karbapenem dirençli metallo-β-laktamazlar, imipenemaz (IMP) (Arakawa vd., 1995), Verona entegre kodlu MBL (VIM) (Lauretti vd., 1999), Sao Paulo MBL (SPM) (Toleman vd., 2002), Almanya imipenemazı (GIM) (Castanheira vd., 2004), Yeni Delhi MBL (NDM) (Isozumi vd., 2012) ve Floransa imipenemazı (FIM) (Pollini vd., 2013) araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Aminoglikozit direnci hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde bildirilmiştir. Aminoglikozit ilaçları etkileyen ana mekanizmalar, ilacın bakterilerde alımının ve/veya birikmesinin azalması ve sonunda ilaçları etkisiz hale getiren aminoglikozit modifiye edici enzimlerin (AME) ekspresyonudur (Gad vd., 2011). Asetiltransferazlar, nükleotidiltransferazlar ve fosfotransferazlar sırasıyla asetilasyon, adenilasyon ve fosforilasyon yoluyla aminoglikozit ilaçların enzimatik inaktivasyonuna neden olur. Bu enzimlerin genetik belirleyicileri genellikle çeşitli bakteri popülasyonlarında genlerin hızlı yayılmasını kolaylaştıran hareketli elementler üzerinde bulunur (Ramirez ve Tolmasky, 2010). AME, ilaç iskelesinin çeşitli yerlerinde aminoglikozitleri modifiye edebilir ve enzimler, farklı substrat profillerine göre alt sınıflar ve tipler halinde sınıflandırılır. Örneğin AAC (3), merkezi 4,6-di-ikameli deoksistreptamin halkası II'nin 3. pozisyonundaki amino grubunu asetile eder. AAC (6'), aminoglikozidin I halkasının 6' pozisyonundaki amino grubunu asetiller ve APH (3'), aminoglikozidin I halkasının 3' pozisyonundaki hidroksil grubunu fosforile eder. AME sıklıkla birden fazla aminoglikozidi değiştirir ve aynı aminoglikozit birkaç enzimden etkilenebilir (Mancini vd., 2019). AME ve β-laktamazlar için yapısal genler, genellikle diğer ilaç sınıflarına direnç genleri ile kombinasyon halinde çeşitli plazmitler tarafından taşınan mobil genetik elementlerin bir parçasıdır ve bu da çoklu ilaca dirençli izolatlarla sonuçlanır (Iredell vd., 2016).

Tetrasiklinlerde, bakteriler tetrasiklinlere dirençli hale gelmek için üç strateji geliştirmiştir ki bunlar; tetrasiklinlerin ribozomlara erişimini sınırlamak, ribozomların bağlanma bölgesini değiştirmek ve tetrasiklin inhibitörlerinin üretimidir (Speer vd., 1992). Tetrasiklin direnç genleri genellikle plazmitlerde ve transpozonlarda kodlanır ve konjugasyon yoluyla iletilir. Bununla birlikte, bazı izolatlar kromozomda ilgili genleri de bulur (Oppegaard vd., 2001). Gram negatif bakterilerde en yaygın tetrasiklin direnç mekanizması gnes tetA, tetB, tetC, tetD ve tetG'dir. Bununla birlikte, *Enterobacteriaceae* en sık kullanılan tetrasiklin direnci mekanizmasını kodladıkları için tetA ve tetB genleri en sık mevcuttur; enerjiye bağlı akış (Fluit vd., 2001; Skočková vd., 2012) tet(A), tet(K), tet(M) ve tet(X) tetrasiklin direnç proteinlerindeki mutasyon tigesiklin direncine neden olur. tet(X3) ve tet(X4)'ün tigesiklin ve yeni FDA onaylı eravasiklin ve omadasiklin dahil tüm tetrasiklinleri etkisiz hale getirdiğine dikkat etmek önemlidir (Liu vd., 2019).

Kinolon antibiyotiklere direnç, münhasır olmayan üç mekanizma ile elde edilebilir. Bunlar:

1. Hedeflenen iki tip IIA topoizomeraz, DNA giraz ve DNA topoizomeraz IV'ten birini kodlayan genlerde nokta mutasyonlarının kazanılmasıyla,

2. Etkili konsantrasyonların azaltılmasıyla sitoplazmadaki ilaçlar, ya pasif olarak zar geçirgenliğindeki değişikliklerle ya da aktif olarak dışa akış sistemlerini aşırı ifade ederek,

3. Mobil kinolon direnç belirleyicilerinin (plazmit aracılı kinolon direnci PMQR) edinilmesiyledir (Martínez, 2019; Ruiz, 2003).

Kromozomal mutasyonlarla ilişkili kinolon direnci, DNA girazın GyrA alt birimlerini ve topoizomeraz IV'ün ParC'sini kodlayan genlerin replikasyonundaki hatalar nedeniyle oluşur (Hooper ve Jacoby, 2015). Ayrıca GyrB ve ParE alt birimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak da kinolon direnci oluşabileceği bildirilmiştir fakat çok sık meydana gelmezler ve klinik değerleri çok sınırlı

görünmektedir ve bu fenomen *Enterobacteriaceae* türlerinde kaydedilmiştir (Breines vd., 1997; Hooper ve Jacoby, 2016).

PMQ söz konusu olduğunda, qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS ve qnrVC plazmid genleri, DNA girazı ve topoizomeraz IV'ü kinolon inhibisyonundan koruyan pentapeptit tekrar ailesinden proteinleri kodlar. qnr genleri genellikle plazmitlerdeki mobilize edici veya yer değiştirebilir elementlerle ilişkilidir ve genellikle sul1 tipi integronlara dahil edilir. Plazmitlerin aracılık ettiği ikinci mekanizma, standart aminoglikozit asetiltransferaz AAC (6')-Ib-cr'nin bir varyantı tarafından uygun bir amino nitrojen hedefi ile kinolonların asetilasyonunu içerir. Son olarak, QepAB ve OqxAB pompaları için plazmid genleri tarafından geliştirilmiş çıkış akışı üretilir (Solano-Gálvez vd., 2020). sul1, sul2 ve sul3, dihidropteroat sentetaz (DHP'ler) üreten ve sülfonamidlere karşı direnci indükleyen bilinen plazmit kodlu sülfonamid direnç genleridir (Wu vd., 2010). İnsan ve hayvan kaynaklarından izole edilen *E. coli* de dahil olmak üzere Gram-negatif bakteriler arasında yüksek sülfonamid direnci prevalansı dünya çapında bildirilmiştir (Kozak vd., 2009; Labar vd., 2012).

2.9. Tüm Genom Dizileme (WGS)

1995'te ilk bakteri genomu tamamen dizilenmiştir. Fleischmann vd. (1995), bilinen bir bölgede genom dizilimi boyunca "yürümek" yerine, tüm genom genomik nükleotidlerinin küçük parçalarını rastgele sıralamak için tüm genom dizilimi (WGS) adı verilen bir teknik uyguladılamışlardır. 20. yüzyılın ikinci yarısı, moleküler biyoloji ve DNA çalışmaları alanında çok verimli geçmiş ve belirli DNA bölgelerinin rolünü ve bunların fenotip ve çeşitli işlevlerle ilişkisini anlamada önemli ölçüde yardımcı olan birkaç yöntem geliştirilmiştir. İlk nesil DNA dizileme 1970'lerde ortaya çıkmış; Maxam Gilbert dizileme (fragmentasyon teknolojisi) ve Sanger dizileme (zincir sonlandırma teknolojisi) olmak üzere iki yöntem geliştirilmiştir. Bununla birlikte, Sanger dizileme daha az toksik kimyasal ve radyoizotop gerektirdiğinden, sonraki 30 yıl boyunca merkezi dizileme teknolojisi haline gelmiştir (Thermes, 2014). Bu metot yaklaşık 1000 bp uzunluğunda dizilerin üretilmesine izin vermektedir (Besser vd., 2018). Hem ilk bakteri hem de insan genomu Sanger dizilimi kullanılarak dizilenmiş, süreç birkaç yıl sürmüş ve çok fazla maliyeti olmuştur. Bu durum Sanger diziliminin

bütün bir genomun yeniden inşası için kullanmak çok pahalı ve zaman alıcı olduğunu göstermiştir (Brown vd., 2019). Maxam Gilbert dizilemesinin ilkesi, DNA'yı kimyasal modifikasyonla parçalamak ve bölünme bölgesi, değiştirici ajan konsantrasyonunun ayarlanmasıyla kontrol edilebilir. DNA molekülünün 5' ucu radyoaktif olarak etiketlenebilmektedir. Farklı boyuttaki DNA parçaları, X-ışını altında görselleştirilmekte ve Sanger dizilemede şablon olarak tek sarmallı DNA kullanılmaktadır. DNA uzantısı, DNA primeri, DNA polimeraz, dNTP ve ddNTP eklenerek yapılmaktadır. Dört PCR reaksiyonu, farklı ddNTP eklenerek işlenir. Uzatma reaksiyonları, ddNTP varlığı nedeniyle belirli nükleotit bölgelerinde sonlandırılır (ddNTP, bir sonraki nükleotid ile bir fosfodiester bağı yapamayan bir riboz şekerin C3'ünde bir hidroksil grubuna sahip değildir). Reaksiyon karışımındaki farklı boyuttaki DNA parçaları elektroforez ile ayrılabilir ve bandın konumu nükleotit tiplerini göstermektedir (Guo, 2020).

2000'lerin başında ikinci nesil veya yeni nesil dizilemenin (NGS) tanıtılması, DNA dizilemenin gıda güvenliği ve halk sağlığına rutin olarak nasıl uygulanabileceği konusunda devrim olarak nitelendirilmiştir. NGS yaklaşımıyla, bütün bir bakteri genomu küçük rastgele parçalar halinde (<100 ila birkaç 1000 bç) tek bir reaksiyonda birden çok kez sıralanabilir ("masif paralel dizileme" adı verilen bir teknik), ardından tüm DNA dizisi sekans birleştirme yazılımı kullanılarak, örtüşen sekanslara sahip fragmanların bağlanmasıyla elektronik olarak belirlenir (Vincent vd., 2017). NGS, 25-100 bp uzunluğunda kısa okumalar üretebilmektedir (Illumina'dan HiSeq (eski adıyla Solexa), Roche'tan 454 Life sciences ve SOLiD). Yüksek kapsama derinliği ile tek seferde birkaç milyondan fazla okuma gerçekleştirerek DNA dizileme maliyeti önemli ölçüde azaltılabilmektedir (Butler, 2010). Her dizileme platformunun avantajları ve sınırlamaları vardır. Pacific Biosciences dizileme, diğer teknolojilere göre daha uzun okumalar sağlar, bu da genom montajı için faydalıdır ancak bu platformun hata oranı daha yüksektir (~%13) (Quail vd., 2012). Ion Torrent nispeten düşük bir ham hata oranına (%1,78) sahiptir, ancak homopolimerleri tespit etmek ve yorumlamak için ideal değildir. Illumina sıralama platformları, NGS için rutin olarak kullanılır ve düşük bir hata oranına sahiptir (<%0,4), bu platformların önemli bir avantajıdır, ancak kısa okuma verilerinin kullanımı ve artan sayıda kontig genom montajı için zor olabilmektedir (Buermans ve den Dunnen, 2014; Quail vd., 2012).

Üç ana Illumina model serisi vardır. Bunlar:

- ✓ En küçük, en uygun fiyatlı Illumina sıralayıcı MiniSeq,
- ✓ Nispeten düşük çıktılarla hızlı sıralama için basit bir sistem olan MiSeq;
- ✓ Orta ölçekli, esnek bir sistem olan NextSeq, yüksek ve orta menzilli çıktı seçenekleriyle (ve şu anda mevcut olan en yüksek üretim devlerine (farklı modellerde HiSeq ve en yeni NovaSeq) kadar) Illumina sentez yoluyla sıralama (SBS) teknolojisi başlar ve çeşitli kütüphane hazırlama adımları ile tamamlanır (Bentley vd., 2008).

Başlangıçta, saflaştırılmış numune DNA; mekanik kesme ile DNA fragmanlarının her iki ucuna bağlanır ve sıralayıcıya yerleştirilen bir reaktif kartuşuna yüklenir. Sıralayıcı daha sonra reaktiflerin ve DNA fragmanlarının karışımını, adaptör sekanslarını tamamlayıcı primerlerle kaplı katı yüzeyli bir akış hücresine yükler. Bağlanan fragman biter daha sonra hücre yüzeyine bağlanır ve bir DNA polimeraz, kümeler adı verilen ilk DNA parçasının birkaç kopyasını üretmek için parçaları çoğaltır. Daha sonra, akış hücresine dört flüoresan etiketli nükleotit (A, C, G ve T) eklenir ve her seferinde bir baz olmak üzere bir polimeraz tarafından yeni bir DNA sarmalına dahil edilir. MiniSeq ve NextSeq sistemleri, MiSeq sistemi tarafından kullanılan dört florofor sistemi yerine iki florofor sistemi kullanır (Goodwin vd., 2016). 2011 yılında Illumina, daha küçük laboratuvarları ve klinik teşhis pazarını hedefleyen daha düşük verimli hızlı dönüşlü bir cihaz olan MiSeq'i piyasaya sürmüştür (Quail vd., 2012). Bir yıkama adımından sonra, dahil edilen nükleotitlerin floresansı, dört görüntüleme kanalından biri kullanılarak görüntülenir. Daha sonra floresan boyalar ayrılır, yıkanır ve işlem tekrarlanır. Sıralayıcı, DNA kümelerinin genetik dizisini oluşturmak için nükleotid ilavesinden sonraki renk değişikliklerini belgelenir. Her iki sonuç da tek uçlu okumalar olarak analiz edilebilir veya ikinci bir sarmal sentezlenebilir ve işlem çift uçlu okumalar için tekrarlanır. Çift uçlu okumalar daha fazla dizileme bilgisi sağlar ancak dizileme maliyetini ve süresini artırır. Illumine, küme oluşturma, sıralama ve temel arama dahil olmak üzere toplam çalışma sürelerini azaltmıştır, bu nedenle Illumina MiSeq sisteminde en düşük çıktı (reaktif kiti v2) ve en yüksek çıktı (reaktif kiti v3) ile

4 saat ve 56 saate düşürülebilir. Bununla birlikte, görüntülenen yüzey alanındaki bir azalmayla, çalıştırma başına üretilen toplam veri noktası sayısı azalır ve bu da nükleotit başına sıralama maliyetini önemli ölçüde artırır (Buermans ve den Dunnen, 2014).

Çoğu genomik çalışma, dha çok genom kompozisyonunu tüm genom dizisinde (genom uzunluğu, GC içeriği ve birkaç gen dahil), mevcut virülans faktörleri, HGT olayları, MLST ve halka açık diğer genom dizileriyle filogenetik karşılaştırma yoluyla araştırır ve genellikle çekirdek genom gibi faktörleri karşılaştırır (Ogura vd., 2009; Lorenz vd., 2017). *E. coli*, 1997'de tamamen dizilenen en eski mikrobiyal türlerden biriydi (Blattner vd., 1997). Genom dizileme projeleri, ExPEC arasında kapsamlı genom çeşitliliği ortaya çıkarmıştır, ancak aynı zamanda toksinler, demir alım sistemleri, adezinler, lipopolisakkaritler (LPS), polisakarit kapsüller, proteazlar ve istilacılar dahil olmak üzere bazı patotipe özgü genleri de tanımlanmıştır (Köhler ve Dobrindt, 2011; Lu vd., 2011). Price vd. (2016), yetişkin kadınların İYE'lerinden iki suşu izole ettikten sonra bunları genom dizilimi yoluyla analiz etmiş ve elde edilen sonuçları açıklamışlardır. NGS tarafından sağlanan kısa sürede birçok verinin elde edilmesi, bunların etkin bir şekilde işlenmesi talebini ortaya çıkarmış ve bu amaçla biyolojik mekanizmalar ve bunların etkileri hakkında bilgi ile programlama becerileri gerektiren bilgisayar yazılımları kullanmak gerekmiştir (Ellington vd., 2017). Böylece mikrobiyoloji gibi mikrobiyal biyoinformatik/hesaplamalı biyoloji de bir takım araçlar, veritabanları ve uygun bir kariyer yapısı geliştirmek için finansmana ihtiyaç duyan olgunlaşan bir araştırma alanı haline gelmiştir (Pallen, 2020). Çıktı dizisi okumalarından temel genomik bilgileri ayıklamak için (genellikle tekli okumalarda bir dosya ve aydınlatmada FASTQ formatı olarak çiftli okumalarda iki dosya), birkaç analiz adımı uygulanabilir. Birleştirme araçları ilk olarak, parçalanmış okumaları, neredeyse tamamlanmış genomlar halinde oluşturulabilen daha büyük kontigler halinde birleştirmek için kullanılır. Ardından, bu birleştirilmiş DNA dizisinden, genom karakterizasyonu için araçlar uygulanabilir. Bu karakterizasyon, numunenin bakteriyel kimliğini belirleyerek, genleri açıklayarak AMR ve virülans genleri gibi klinik öneme sahip genleri belirleyerek elde edilir. İki tür biyoinformatik veri seti mevcuttur. Birincisi, internet üzerinden web tabanlı araçlara erişilebilir olanlardır (örneğin, Genomik Epidemiyoloji Merkezi (CGE)). Bunlar kullanıcının web tabanlı

bir kullanıcı arabirimi kullanarak ham okumaları bir araya getirmesine izin veren bir hizmet sağlar (https://cge.cbs.dtu.dk/services/) ve bunları klinik bir ortamda kullanmak mümkündür. Sıralama verilerine erişim ve istikrarlı bir internet bağlantısı ile bu araçlar günlük uygulamaya dahil edilebilir. İkincisi, ücretsiz olarak kullanılabilen komut satırı araçlarıdır. Bunu kullanabilmek için de biyoinformatik uzmanlığı ve Unix tabanlı bilgisayarlara erişim gereklidir (Lund vd., 2020).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Örneklerin Alınması

Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi'nde (Erzurum-Türkiye) Ocak 2021 ile Nisan 2021 tarihleri arasında İYE olan erkek ve kadın toplam 30 hastadan alınmış olan idrar örneklerinden izole edilmiş bakteri izolatları laboratuvardan temin edilerek çalışmada kullanılmıştır.

3.2 Bakterilerin İdentifikasyonu

Bakteri izolatları MacConkey agar ve kanlı agarda 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra *E. coli* seçici besiyeri olan EMB besi yerinde (eosin metilen mavisi) izolatlarımızı 37°C'de 24 saat ayrıca inkübasyona tabi tutulmuştur. EMB besi yerinde üreyen yeşil metalik koloniler; TSI (trpile sugar iron agar), sitrat, mannitol, üreaz, MR (metil kırmızısı), VP (Voges-Proskauer) ve MİO (hareket, indol, ornitin) besiyerinde testlerine tabi tutularak izolatların *Escherichia coli* bakterisi olduğu doğrulanmıştır (Mahe vd., 2021)

3.3 Antibiyogram Testi

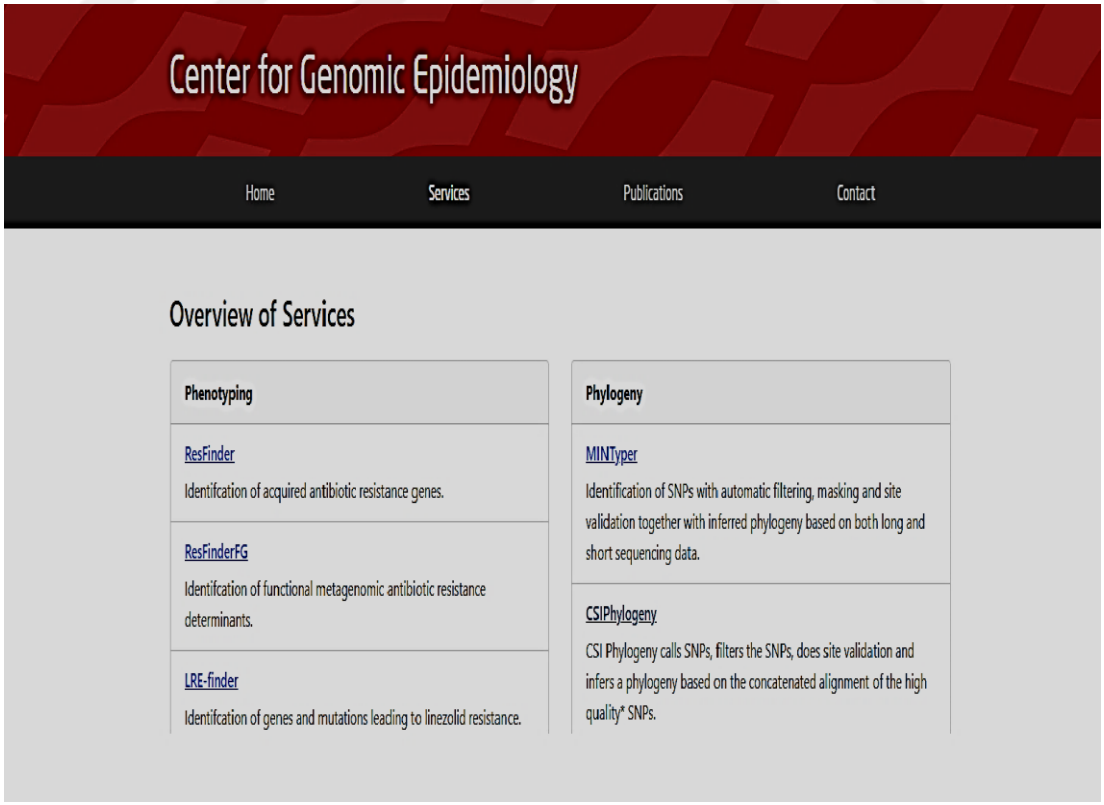
Antibiyogram testi Mueller Hinton agar ile disk düffüzyonmetodu ile McFarland 0,5 standardına göre hazırlanan *E.coli* bakteri suşları ile yapılmıştır. Antibiyogram test sonuçları EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) standartlarına göre değerlendirilmiştir (Hulscher vd., 2010; Dolinsky, 2020).

Çeşitli antibiyotik gruplarından; piperasilin/tazobaktam (100/10 µg), ertapenem (10 µg), amikasin (30 µg), seftazidime (30 µg), siprofloksasin (5 µg), gentamisin (10 µg), seftriakson (30 µg), sefotaksim (30 µg), sefuroksim (30 µg), sefepim (30 µg), imipenem (10 µg), trimetoprim+sülfametoksazol (1,25/23,75 µg), ampisilin/sulbaktam (10/10 µg), sefiksime (5 µg), meropenem (10 µg) ve evofloksasin (5 µg) antibiyogram testi için kullanılmıştır (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK).

3.4 Tüm Genom Dizileme (WGS)

Tüm genom dizilimi için antibiyogram testine göre antbiyotiklere en fazla resistans gösteren beş izolat seçilmiştir. Başlangıçta DNA ekstraksiyon kiti adımları, ardından Ankara'da bulunan bir özel laboratuvarda İllumine firmasının talimatlarına göre kullanılan Miseq reaktif V3 kiti ile 1, 2, 3, 4 ve 5 olarak adlandırılan izolatlar Illumina Miseq silico platformunda (San Diego, CA, ABD) ve https://www.bmlabosis.com/ kütüphanesi kullanılarak WGS analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları çıktıları Fastq dosya biçiminde alınarak ve FastQC analizi ile kalite parametreleri doğralanmıştır. Analiz okumalarını birleştirmek için OmicsBox platform araçları (ABySS aracılığıyla) kullanılmıştır. NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) aracılığıyla yapılan hizalaması ile çalışmada kullanılacak olan NZ-CP017669.1 suşunun Aralık 2021 tarihi itibari ile uygun bir referans suş olacağı doğrulanmıştır.

3.5 Antibiyotik Direnç Genleri



Şekil 3.1 Genomik Epidemiyoloji Merkezi ResFinder 4.1 veritabanı arayüzü

Fenotipik dirence göre, direnç özelliklerine sahip genetik özellikleri (genotipik olarak) belirlemek için daha önce belirtilen antibiyotiklere karşı önemli ölçüde direnç gösteren beş izolat seçilmiştir. Genomik Epidemiyoloji Merkezi'ndeki (CGE) *E. coli* ResFinder 4.1 veritabanı https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/. Direnç genlerini ve nokta kromozomal mutasyonlarını bulmak için Şekil 3.1'de verilen program arayüzü kullanılarak birçok antibiyotik grubuna karşı direncin birçok parametre içeren çalışma örnek işlemi silerek kullanılmıştır. ResFinder 4.1 tarafından kabul edilen dizi, %80 özdeşlik ve %60 minimum uzunluk eşiği üzerinden birleştirilmiş, genomlar (kontrol suşları) ve ham okumalar (değerlendirme suşları) yapılmıştır.

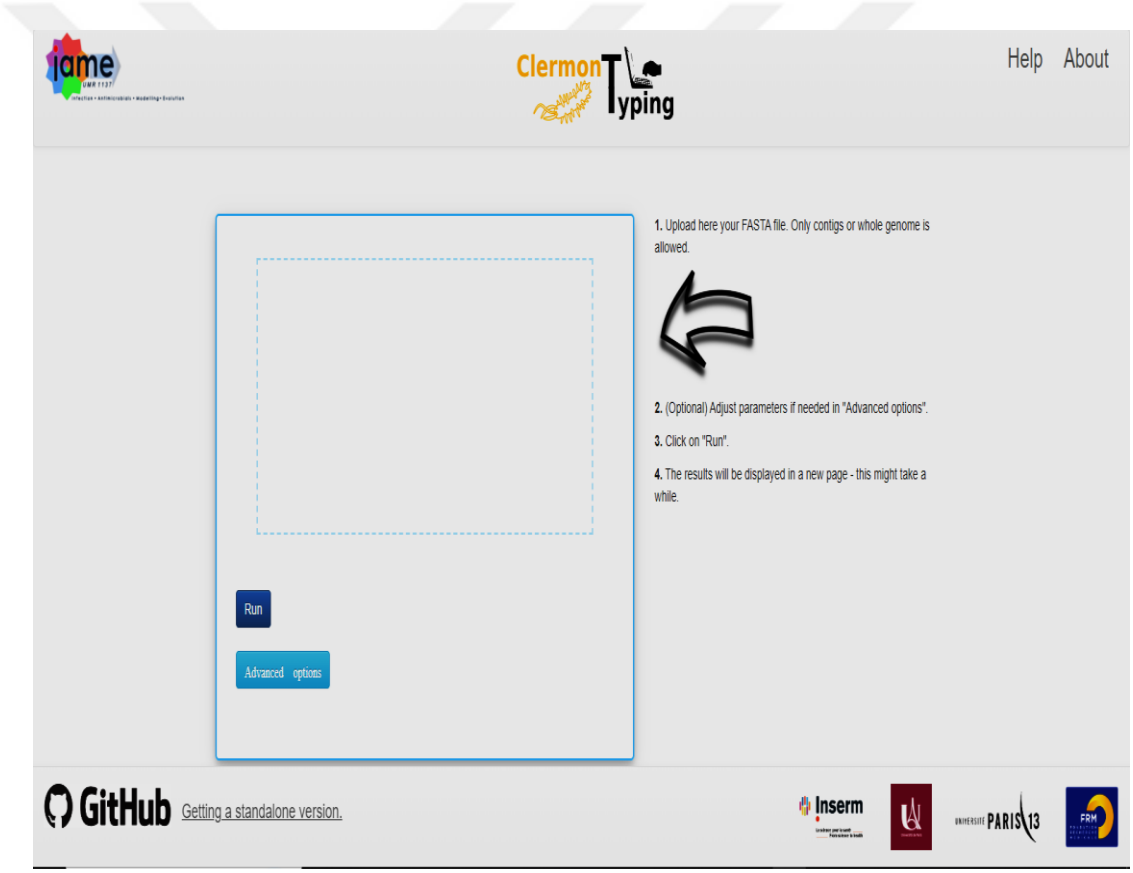
3.6 Virülens Faktörü (VF)

Patojenik bir tür olarak *E. coli*, kolonizasyon ve patojenite sürecine yardımcı olan birçok virülans faktörüne ve enzime sahiptir. Bu faktörler, tür seçimi ve eşik kimliğini içeren web tabanlı olarak Genomik Epidemiyoloji Merkezi'nin http://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/ adresindeki kütüphaneye bir genomik özellik bulucu aracılığıyla 80% özdeşlik ve %60 minimum uzunluk eşiği üzerinden araştırılarak, veriler birleştirilmiş kontigler olarak yüklenmiştir.

3.7 Filogruplar

İzolatların, *E. coli* suşları içindeki filogrupları saptamak için wen-arayüzünde taraması yapılmıştır. Clermont vd. (2000) tarafından önerilen ve Clermont vd. (2013) tarafından güncellenen *Escherichia* sınıflarını tanımlamak için geliştirilen çeşitli PCR deneyleri ile http://clermontyping.iame-research.center/index.php adresinden herkesin web tarayıcısında sadece birkaç tıklama ile bir *Escherichia* sp. suşuna tanımasına hizmet eden ClermonTyping platformu kullanılmıştır. Bu platform, aşağıdaki Şekil 3.2'de görüldüğü gibi, verileri bitişik ve/veya tüm genom çoklu bağlantılı Fastq dosyaları olarak kabul edip, bu sorgu genomu kullanılarak bir BLAST veri tabanı oluşturur ve Blastn algoritması, bir dizi primer için eşleşmelerini bulmak üzere belirli parametrelerle çağrı yapar (Altschul vd., 1990). BLAST sonucu daha sonra PCR'nin her bir primer çifti için amplifikasyonun varlığı veya yokluğu açısından yorumlanır. Dörtlü PCR yöntemi altı primer çifti kullanır ve bir tripleks yerine filogrup genlerinin

varlığını saptar (Beghain vd., 2018; Clermont vd., 2019). Mutasyon, SNP ve HGT sonucu bazı noktalarda olumsuz etkilenebilir. Bu durumları ele almak için araştırmacılar, Mash adlı bir genom kümeleme aracına dayalı bir filogrup belirleme adımı eklemişlerdir (Ondov vd., 2016). Mash, sorgu genomu ile *Escherichia* sp./phylogroup genomik çeşitliliğini mümkün olduğunca temsil eden manuel olarak derlenmiş bir veritabanı arasındaki ikili mutasyon mesafesini yaklaşık olarak tahmin etmemize imkan sağlamıştır. Araştırmacılar, bir *Escherichia* sp. suşunun en yakın genomunu tahmin etmek için manuel olarak küratörlüğü yapılan genomik veritabanı Mash2.0 ekran komutu kullanmaktadırlar. Mash grubu, veri tabanındaki en yakın genomun türü/filogrubu ifade etmketdir.



Şekil 3.2 Filogrup spesifikasyonu için Clermont platformu

3.8 Çoklu Odaklı Dizi Tiplemesi (MLST) ve Dizi Tiplemesi (ST)

E.coli bakterisinde ekans tiplemesi ve bunların nereye ait olduklarını saptamak için korunmuş bir parametre olarak bakterinin adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA ve recA gibi yedi koruyucu genine bakılmıştır. Web tabanlı araçlarla

https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/ bağlantısından, tür seçimi ve minimum derinlik aleli ile MLST saptaması sağlanmış ve MLST'lerin alanına karar vermek için genomik kontiglerle çalışılmıştır (Larsen vd., 2012).

3.9 Varyant Çağrı Formatı (VCF)

Varyant çağrı formatı (VCF), gen dizisi varyasyonlarını depolamak için biyoinformatikte kullanılan bir metin dosyasının formatını belirtir. Her suş, konum değişiklikleri üreten ve diğer genomik özellikleri etkileyen mutasyonlar (delesyon veya ekleme) yoluyla bazı genomik farklılıklara sahiptir. Örneğin, patojenik bakterinin bir üyesi olarak *E. coli*, kromozomal veya plazmid kazandıran genleri kullanır. Windows sürümüyle uyumlu bir komut satırı paketi olan BCFtools, değişken bazları veya nükleotit değişikliklerini çağırmak üzere analize rehberlik etmek için GitHub'dan indirilebilir. Varyant çağrı formatı (VCF) içindeki diziler aracılığıyla işlenen bantla sınırlandırılmış dosyalar (TDF) olarak depolanan çıktı verileridir (Li vd., 2009). Bu çalışmada (v 4.2) kullanılan VCF, tek nükleotid polimorfizmi SNP'lerini, eklemeleri ve silmeleri (indeller) ve/veya yapısal varyantları içermektedir. SNP ve indel çağırma yöntemleri, burada NZ-CP017669.1 suşu ile biraz ilerlediği için bir referansa göre polimorfizmli genom pozisyonlarını tanımlamıştır. SNP ve indel çağrısı, ya okumanın doğrudan referans genomla eşlenmesiyle ya da okumalardan bir de novo genom düzeneği oluşturularak ve düzeneğin referans genomla karşılaştırılmasıyla elde edilmiştir (Olson vd., 2015).

3.10 Veri Kullanılabilirliği ve Ulaşımı

Bu çalışmadan elde edilen veriler, Bioprojects kapsamında ulusal biyoteknoloji bilgi merkezi (NCBI) veritabanına izolat 1 için PRJNA835456;SRR19553197, izolat 2 için PRJNA846072;SRR 19543626, izolat 3 için PRJNA846072;SRR 19543627, izolat 4 için PRJNA846072;SRR 19543628 ve izolat 5 için PRJNA846072;SRR 19543629 kodları kullanılanılarak kayıt yaptırılmıştır.

3.11 İstatistiksel Analiz

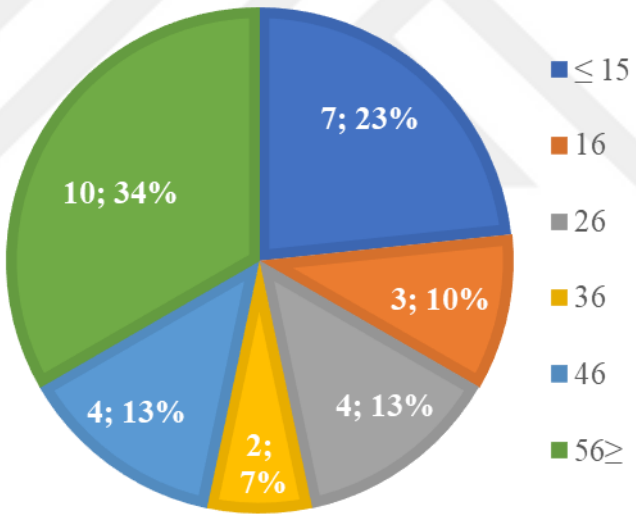
İzolatladan elde edilen sonuçlardaki statistiksel farklılıkları değerlendirmek için tek

yönlü veyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. İstatistiksel olarak faklılık düzeylerini değerlendirmek için Tukey HSD testi kullanılmış ve çalışmada farklılıklara dair önem seviyesi $P<0,05$ olarak değerlendirilmiştir. Yapılan her değerlendirmede standart sapma (SD) dikkate alınmıştır.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Hastaların Özellikleri

Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi'nde (Erzurum-Türkiye) Ocak 2021 ile Nisan 2021 tarihleri arasında İYE olan erkek ve kadın toplam 30 hastadan alınmış olan idrar örneklerinden izole edilmiş bakteri izolatları laboratuvardan temin edilerek çalışmada kullanılmıştır. Hastaların yaş dağılımı Şekil 4.1'de verilmiş olup, ortalama yaş 40,46'dır. Hastaların 20/30'u (%66,66) kadın iken geri kalan 10/30'u (%33,33) erkeklerden oluşmaktadır. İstatistiksel analizler neticesinde 56≥ yaş grubu hastalarda İYE %33,33 oranla prevalansının yüksek olduğu ($p<0,05$), ≤ 15 grubunda ise %23,3 oranla prevelansın ikinci sırada olduğu görülmüştür.

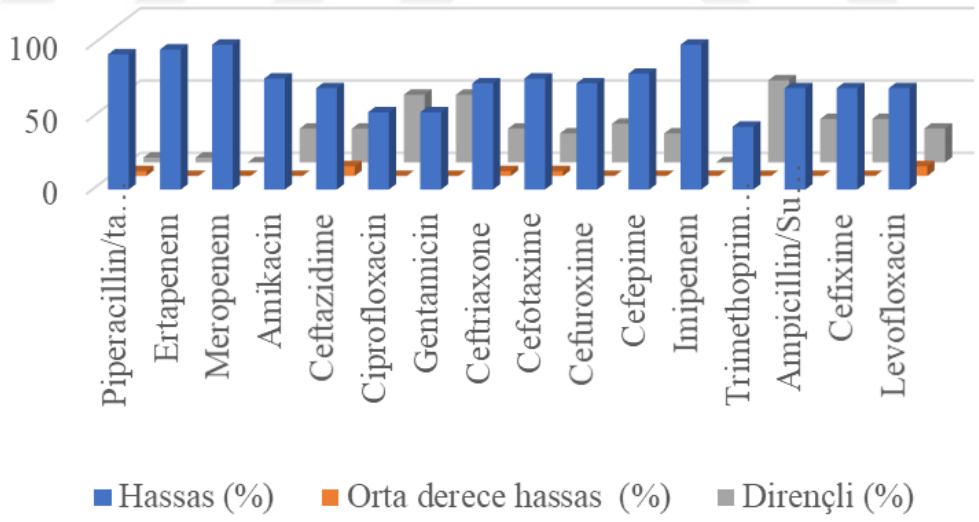


Şekil 4.1 Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı

Yetişkin kadınların %50-60 oranında en az bir ve menopoz sonrası kadınların yaklaşık %10 oranında yılda bir İYE görüldüğü belirtilmektedir (Alós, 2005). İYE yaşla birlikte artmakta ve 65 yaş üstü kadınlarda, genel kadın popülasyonuna ve genç kadınlarda görülen oranın yaklaşık iki katıdır. Artan cinsel aktivite İYE için önemli bir risk faktörüdür ve altı ay içinde yeniden nüks edebilmektedir (Medina ve Castillo-Pino, 2019). Ayrıca kadınların yarısının, erkeklerin aksine anatomik farklılıklar ve fiziksel nedenlerle yaşamları boyunca İYE geçirdiği bildirilmiştir (Al-Badr ve Al-Shaikh, 2013; Fazly Bazzaz vd., 2021).

4.2 Fenotipik Antibiyotik Direnci

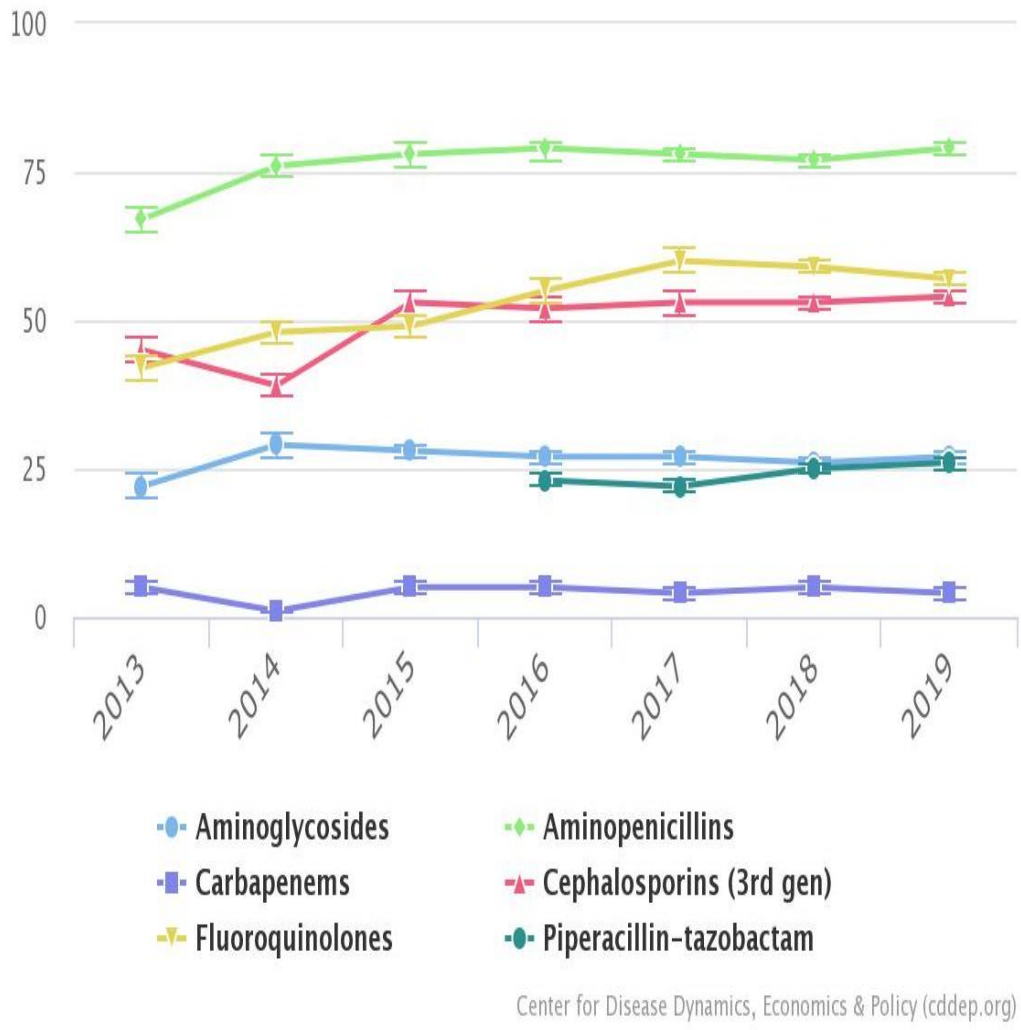
Elde edien 30 izolatın tümü, bilinen 16 antibiyotiğe karşı antibiyotik duyarlılık testlerine tabi tutulmuş ve tümünün en az bir antibiyotiğe direnç gösterdiği belilenmiştir. 30 izolatın %73,3'ü birçok sınıftan (aynı sınıfa ait olmasına rağmen) iki ila on üçüncü antibiyotiğe karşı direnç göstermiştir. Karşılaştırıldığında, 12 izolat (%40) antibiyogram testinde kullanılan bir-iki antibiyotiğe karşı direnç göstermiş ve MDR olarak ayrılmıştır. İzolatların %56,66 (17) oranında trimetoprim+sülfametoksazol antibiyotiğine en yüksek direnç gösterdiği, bunu %46,66 (14) ile siprofloksasin ve gentamisin, %30 (9) ile ampisilin/sulbaktam ve sefiksim antibiyotiklerinin izlediği görülmüştür. Piperasilin/tazobaktam (%93,33), ertapenem (%96,33), imipenem (%100) ve meropenem (%100) antibiyotiklerine karşı izolatların direncinin olmadığı veya çok az direnç gösterdiği belirlenmiştir. Bunların dışında izolatlar sefepim (%80), amikasin (%76,66) ve sefotaksim (%76,66) antibiyotiklerine ise orta derece dirençli oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.2 *E.coli* bakterisinin antibiyogram test sonuçları

Gereksiz ve/veya hatalı antibiyotik kullanımı ilaca dirençli suşların sayısının artmasına neden olmaktadır (Xu vd., 2011). Bu durum, nozokomiyal, gastrointestinal ve ekstraintestinal rahatsızlıklara birincil katkıda bulunan unsurlardan da biridir (Kaper vd., 2004) ve ayrıca dünya genelinde mortalite ve morbidite üzerine ciddi şekilde etki etmektedir. Dünya sağlık örgütünün (WHO) 2015 yılında yayınladığı raporda, *E. coli*

yılda 550 milyon insanı hasta ettmekte ve bunların 230.000 kadarı ölümle sonuçlanmaktadır (Mehlhorn, 2015). 2018 yılında yapılan bir çalışmalada 18 Avrupa ülkesinde; UPEC izolatlarının %56,66 (17)'sı trimetoprim+sülfametoksazol'e direnç göstermiştir. Bu izolatların %23,1-56,2 aralığında ortalama %32,7 oranındaki kısmı pisuarlardan toplanmıştır (Critchley vd., 2020). *E.coli*'nin siprofloksasin ve gentamisine olan direci Alabsi vd. (2014) (%46,66), López-Banda vd. (2014) (%62,3) ve Giray vd. (2012) (%47) tarafından benzer oranlarda bulunmuştur. Ojdana vd. (2018), hastanelerdeki klinik alanlardan izole edilen 44 GSBL *E. coli* bakterisinin, %59 gentamisin %23,34 amkasin atibiyotiğine dirençli olduğunu bulmuşlardır. Bu veriler, Shah vd. (2019) tarafından bildirilen amikasin antibiyotiğine karşı %22 dirençli olan UPEC raporu ile benzer nitelikte olduğu görülmüştür.



Şekil 4.3 *E.coli* bakterisinin Türkiye'deki direnç durumu (URL-1)

Hastalık Dinamik, Ekonomik ve Politika Merkezi (Center of Disease Dynamic, Economic & Policy; cddep.org) verilerine göre, 2019 yılına kadar izole edilen ve yaygın olarak karşılaşılan E.coli bakterisinin direnç oranının arttığı bildirilmiştir. Penisilinlere direnç %75'in üzerindeyken, florokinolonlar ve sefalosporinlere direnç %50-55 ve aminoglikozitlerde ise %25'in altında insidans kaydedilmiştir. Piperasilin/tazobaktam ve karbapenemlere ise 2015-2019 arasında %5-25 gibi düşük bir oranda insidans görülmüştür (Şekil 4.3).

4.3 Tüm Genom Dizileme (WGS)

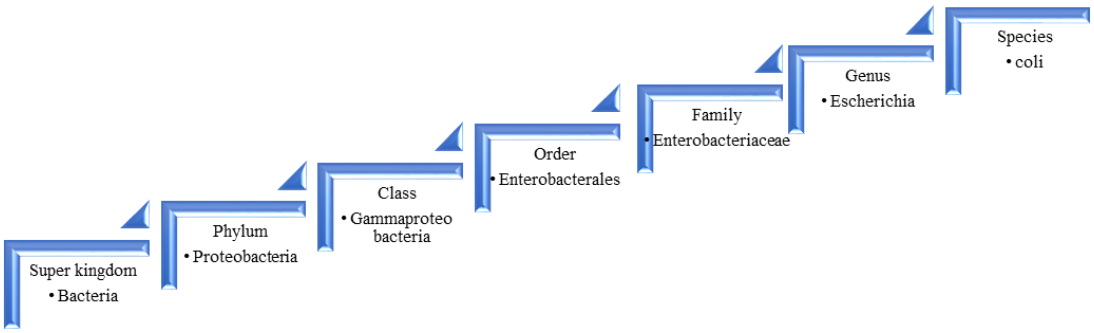
Tablo 4.1 *E.coli* izolatlarının kalite skorları

No	Toplam Dizi (bp)	Kalitesiz Dizi	Uzunluk (bp)	GC %	Parametre Linki
1	4.036.936	0	150	50	file:///F:/NG1/quality/NG1_1_fastqc.html
2	3.716.627	0	150	50	file:///F:/NG2/quality/NG2_1_fastqc.html
3	4.072.225	0	150	50	file:///F:/NG3/quality/NG3_1_fastqc.html#M10
4	3.696.916	0	150	50	file:///F:/NG4/quality/NG4_1_fastqc.html
5	4.730.241	0	150	50	file:///F:/NG5/quality/NG5_1_fastqc.html

Üretilen çıktı tek ucu, Fataq formatındaki beş izolattan 150 bp uzunluğunda üretilen verileri okutularak bütünüyle biyoinformatik araç setlerine iletilmiştir. Fastqc kalite kontrolü, Illumine'den gelen çıktı dosyalarının çok iyi geçtiğini ve kalite parametrelerinin çoğu için iyi notlar aldığını göstermiştir. Kalite puanlarını açıklamaları Tablo 4.1'de detayları ile verilmişitir. ABySS birleştiricisi (Jackman vd., 2017) tarafından OmicsBox versiyonundan (2,1,10) K-mer boyutu 55 ile kastedilen toplam genom uzunluğu izolat 1 için 5,24 Gbp; izolat 2 için 5,20 Gbp; izolat 3 için 5,25 Gbp; izolat 4 için 5,25 Gbp ve izolat 5 için 5,36 Gbp olarak başlamıştır. Kontig sayısı ≥ 500 olup her izolat için sırasıyla; izolat 1 (382), izolat 2 (132), izolat 3 (199), izolat 4 (243) ve izolat 5 (180) olmuştur. 1, 2, 3, 4 ve 5 numaralı izolatlarda en büyük bitişik uzunluk sırasıyla 91,85; 35,7616; 35,6038; 30,2444 ve 32,2642 şeklinde olmuştur. N50 ayrıca çıktı veri kalitesinin bir göstergesidir, bu nedenle N50 izolat 1 için 28,317; izolat 2 için 123,955; izolat 3 için 81,475; izolat 4 için 117,395 ve izolat 5 için 149,638 olarak bulunmuştur. *E. coli* izolatlarının kalite skoları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Genom boyutunun Kauser (2020) verilerine yakın olduğu, *E. coli* bakterisinin genomik içeriği 4-5 Gbp iken birkaç kontig 471±622 olduğu görülmüştür. Çalışmada elde edilen tüm izolatlar için en büyük kontigler 373.475±229.473 bulunmuş olup, Cooper vd. (2014), Lorenz vd. (2017) ve Ogura vd. (2009) araştırmalarında çoklu serotiplerin WGS bulgularını ve toplam genom boyutu olarak 5,3-5,6 Gbps ve %GC'yi %50-50,6 olarak bildirmişlerdir. N50, kontiglerin yarısı kadar kısa ve yarısından daha uzun olacak şekilde uzunluklarına göre sıralanan tüm elde edilen kontiglerin ortasında yer alan kontig boyutuna atıfta bulunmaktadır. 15 000 bp'den yüksek N50 tipik olarak kabul edilebilir ve kaliteyi göstermektedir. Ancak N50 için genellikle en az 30.000 bp oranında bir değer tercih edilir ve kontig boyutu ve N50 hesaplamalarında biraz daha gidebilir (Ellington vd., 2017).

OmicsBox, veri analizi için çok işlevli bir platformdur. Bu çalışmada, izolatlar %97-100 arasında değişen yüksek doğrulukta ve hassas bir şekilde tür düzeyinde sınıflandırmak için kullanılan sınıflandırma modeli kullanılmıştır (Wood vd., 2019). Aynı rasgele adımlarda bulunan tüm izolatlar, Şekil 4.4'de görüdüğü gibi sonlandırılmıştır.



Şekil 4.4 *E.coli* bakterisinin sınıflandırmasının şematik gösterimi

E. coli sınıflandırmasının keşfinden bu yana cinsin tip türleri sabit kalmıştır fakat cinsin geri kalanının taksonomik statüsü önemli ölçüde değişmiştir. Biyokimyasal ve filogenetik kanıtlar, *E. coli* bakterisini cins içinde temsili tür olarak gösterse de, model bakterinin kapsamlı konakçı ve nişe özgüllüğü ile birleşen muazzam genetik ve biyolojik çeşitliliği mevcuttur. *E. coli* birkaç farklı konağa özgü ekotipten ibaret bir kompleksten oluşabileceğinden, mevcut taksonominin garanti olsa bile yeniden gözden geçirilmesinin gerekliliği öne sürülmüştür. Fakat, cinsin diğer üyelerinin (*E.*

fergusonii, *E. albertii* ve *E. marmotae* gibi) sürekli değişen statüsüne rağmen, *E. coli* hem biyokimyasal hem de filogenetik kanıtlarla taksonomik pozisyonunu devam ettirmiştir (Yu vd., 2021).

4.4 Direnç Genleri

Günümüzde, birçok veri tabanı ve platform, genomun milyon bazında neye sahip olup olmadığı hakkında yüksek düzeyde bir garanti ile bize ne ile karşı karşıya olduğumuz hakkında bilgiler vererek tahminde bulunmamıza yardımcı olabilir. Bu çalışmada kullanılan CGE bu amaca hizmet eden en uygun araçtır (Zhao vd., 2021). Yapılan analize göre, elde edilen izolatların fenotipik verilerle tutarlı olarak birkaç direnç genine sahip olduğu görülmüştür. On dokuz kodlayıcı gen tanımlanmış, haritalanmış ve kromozomlara entegre edilmiştir. Sefalosporinler, sülfonamidler ve aminoglikozidler insidensi en yüksek olanlar olarak bulunmuştur.

Verilere göre önemli sayıda plazmid aracılı direnç olan β-laktamaz gelişimi (blaTEM-1b, blaCTX-M-15 ve blaOXA-1) durumunda fenotipik olarak kaydedildiği üzere çoklu ilaç direncine sahip olan direnç geni görülmüştür. Genişletilmiş spektrumlu β-laktamazlar, sefalosporinlerin birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü kuşaklarında temsil edilir (Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5 ve Tablo 4.6). Sülfonamidler, aminoglikozitler, tetrasiklinler, kloramfenikol, florokinolonlar ve makrolidler genleri etkileyen bu antimikrobiyal gruplarıdır.

Trimetoprim (dfrA17, drfA14) ve sülfametoksazole (sul1, sul2) dirençli genlerin önemli bir kısmı fenotipik dirençle birlikte gelir ve yüksek oranda (%56,66) yer almaktadır. Tablo 4.2, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te görüleceği üzere; sırasıyla streptomisin, gentamisin, amikasin, kanamisin ve tobramisin aminoglikozit O-fosfotransferaz, ANT(3'')-Ia ailesi aminoglikozit nükleotidiltransferaz, aminoglikozit N-asetiltransferaz ve AAC(6')-Ib ailesi aminoglikozit 6'-N-asetiltransferaz, aminoglikozit türevlerinin kesintiye uğramasına neden olmaktadır. Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'te görüleceği üzere; tetrasiklinler, tetrasiklin MFS taşıyıcısı yoluyla tetA ve tetB kodlayan genler tarafından doksisiklin, tetrasiklin ve minosiklin etkisini ortadan kaldırmıştır.

Tablo 4.2 İzolat 1'in direnç genleri

Direnç geni	Oran	Baş-Son	Hizalama / Gen	İplik	Kontig/ Derinlik	Fenotip	Not
sul2	100,0	1709-2524	816/816	+	155,63	Sülfametoksazol	Sülfonamide dirençli dihidropteroat sentaz
dfrA17	100,0	1013-1486	474/474	-	151,96	Trimetoprim	Trimetoprim dirençli dihidrofolat redüktaz
tet(B)	100,0	4152-5357	1206/1206	+	158,24	Doksisiklin, Tetrasiklin, Minosiklin	Tetrasiklin MFS taşıyıcı
bla_{TEM-1B}	100,0	81-941	861/861	+	141,39	Amoksisilin, Ampisilin, Sefalotin, Piperasilin, Ticarsilin	A sınıfı geniş spektrumlu β-laktamaz
catA1	99,85	4199-4858	660/660	_	153,0	Kloramfenikol	Tip A-1 kloramfenikol O-asetiltransferaz
aph(3")-Ib	100,0	2561-3388	828/828	+	85,493	Streptomisin	Aminoglikozit O-fosfotransferaz
Aph(6)-Id	100,0	3388-4224	837/837	+	85,4937	Streptomisin	Aminoglikozit O-fosfotransferaz
aadA5	100,0	94-882	789/789	-	3472	Streptomisin	ANT(3")-Ia ailesi aminoglikozit nükleotidiltransferaz

Dört suş, makrolid antibiyotikler eritromisin, azitromisin, spiramisin ve telitromisine karşı hayati bir protein olarak Mph (A) ailesi makrolid 2'-fosfotransferaz vermektedir. İzolat 1 ve 2, kloramfenikole karşı direnç faktörü olarak catA1 tarafından kodlanan tip A-1 kloramfenikol O-asetiltransferaz içermektedir. Siprofloksasin, qnrS1 oluşumunda ve kinolon dirençli pentapeptit proteinine çevrilen aac(6')-Ib-cr genleri ile aktivitesini kaybedebilmektedir (Tablo 4.6). Karbapenemler (ertapenem, meropenem ve imipenem), UPEC tarafından kullanılan hidrolize veya diğer savunma mekanizmalarına maruz kalan tek antibiyotik olarak günümüzde çok değerli olduklarını ispatlamaktadırlar. Veri tabanı, araştırılan tüm genlere ideal bir tanılama sağlamıştır. Güvenliği artırıp, tüm gen hesaplamalarında ve tüm *E. coli* izolatlarında belirli bir bölgeyi, ileri veya geri sarmalı bulmada sapma veya yanlılık yapma şansını ortadan kaldırmaktadır. Bu durum, araştırmacıları web tabanlı biyoinformatik araç setine odaklanmaya teşvik etmekte ve dünya çapında yayın yapan bilimsel dergilerde de bu durum görülmektedir.

Tablo 4.3 İzolat 2'nin direnç genleri

Direnç geni	Oran	Baş-Son	Hizalama / Gen	İplik	Kontig/ Derinlik	Fenotip	Not
mph(A)	100,0	147-1068	906/906	+	114,08	Eritromisin, Azitromisin, Spiramisin, Telitromisin	Mph(A) ailesi makrolid 2'-fosfotransferaz
dfrA17	100,0	8668-9141	474/474	-	111,41	Trimetoprim	Trimetoprim dirençli dihidrofolat redüktaz
sul2	100,0	1938-2753	816/816	+	115,56	Sülfametoksazol	Sülfonamide dirençli dihidropteroat sentaz
sul1	99,88	6363-7202	839/840	-	108,45	Sülfametoksazol	Sülfonamide dirençli dihidropteroat sentaz
tet(B)	100,0	970-2175	1206/1206	+	108,45	Doksisiklin, Tetrasiklin, Minosiklin	Tetrasiklin MFS taşıyıcı
bla_{TEM-1B}	100,0	598-1458	861/861	+	106,17	Amoksisilin, Ampisilin, Sefalotin, Piperasilin, Tikarsilin	A sınıfı geniş spektrumlu β-laktamaz
catA1	99,85	105-764	660/660	+	134,88	Kloramfenikol	Tip A-1 kloramfenikol O-asetiltransferaz
aadA5	100,0	7749-8537	789/789	-	64,023	Sterptomisin	ANT(3")-Ia ailesi aminoglikozid nükleotidiltransferaz
aac(3)IId	100,0	6540-7400	861/861	-	65,042	Gentamisin	Aminoglikozit N-asetiltransferaz
aph(3")-Ib	100,0	2790-3617	828/828	+	64,877	Streptomisin	Aminoglikozit O-fosfotransferaz
aph(6)-Id	100,0	3617-4453	837/837	+	64,8776	Streptomisin	Aminoglikozit O-fosfotransferaz

Çalışmada elde edilen WGS bulguları Tadesse vd. (2012) tarafından yapılan amoksisilin, ampisilin, aztreonam, sefepim, sefotaksim, seftazidim, seftriakson, piperasilin ve ticarsiline karşı β-laktamaz (blaTEM-1b, blaCTX-M-15 ve blaOXA-1) prevalansı ile benzer olduğu bulunmuş ve β-laktam direncinin birçok sınıftaki çok fazla ilaca karşı büyük ölçüde arttığını göstermiştir. Fam vd. (2011), yaptıkları çalışmada 74 idrar örneğinden izole edilen ESBL *E.coli* suşlarının %75 oranında sefalosporin antibiytik grubuna karşı direnç gösgerdiği ve önemli ölçüde CTX-M-15 ürettiği bulmuşlardır. Özgüneş vd. (2006), Türkiye'de idrar da dahil olmak üzere klinik alanlardan alınan örneklerde ESBL *E. coli* prevalansını %12 olarak bildirmişlerdir. blaCTX-M-15 geninin yayılması, Ekvador'daki klinik örneklerde en sık bildirilen *E.*

coli izolatlarında β-laktamaz antibiyotik direncinin önde gelen nedeni olduğu bildirilmektedir (Zurita vd., 2019). OXA, keşfedilen en eski β-laktamazlar arasında D sınıfı β-laktamazlara aittir.

Tablo 4.4 İzolat 3'ün direnç genleri

Direnç geni	Oran	Baş-Son	Hizalama / Gen	İplik	Kontig/ Derinlik	Fenotip	Not
Aac(6')-Ib-cr	100,0	169-723	600/600	+	85,83	Amikasin, Kanamisin, Tobramisin	AAC(6')-Ib ailesi aminoglikozit 6'-N-asetiltransferaz
aac(3)-IIe	100,0	121-981	861/861	+	70,83	Gentmisin	Aminoglikozit N-asetiltransferaz
aadA5	100,0	1780-2568	789/789	-	57,088	Streptomisin	ANT(3")-Ia ailesi aminoglikozid nükleotidiltransferaz
Mph(A)	100,0	146-1067	906/906	+	152,35	Eritromisin, Azitromisin, Spiramisin, Telitromisin	Mph(A) ailesi makrolit 2'-fosfotransferaz
sul1	99,64	394-1233	837/840	-	91,67	Sülfametoksazol	Sülfonamide dirençli dihidropteroat sentaz
dfrA17	100,0	2699-3172	474/474	-	92,96	Trimetoprim	Trimetoprime dirençli dihidrofolat redüktaz
tet(B)	100,0	2077-3282	1206/1206	+	144,52	Doksisiklin, Tetrasiklin, Minosiklin	Tetrasiklin MFS taşıyıcı
bla_{OXA-1}	100,0	854-1684	831/831	+	91,99	Amoksisilin, Amoksisilin+klavulanik asit, Ampicillin, Ampicillin+clavulanic acid, Sefepim, Piperasilin, Piperasilin+tazobactam	Oksasilin- hidrolize edici D sınıfı β-laktamaz
$bla_{CTX-M-15}$	100,0	2713-3588	876/876	-	106,36	Amoksisilin, Ampisilin, Aztreonam, Sefepim, Sefotaksim, Seftazidim, Seftriakson, Piperasilin, Ticarsilin	A sınıfı geniş spektrumlu β-laktamaz

Bu çalışmada OXA-1, CTX-M-15 ile birlikte bir izolatta tespit edilmiştir. TEM-1 ve OXA-1, ampisilin, tikarsilin, piperasilin direncine yol açan geniş spektrumlu β-laktamazlardır (Sugumar vd., 2014; Guo, 2020). CTX-Ms ile bir arada bulunmaları, β-

laktamazlara direnç eklemektedir. Diğer AMR genlerinin veya ilgili mutasyonların bir arada bulunması da yaygın görülen bir durumdur. Tetrasiklin direnci, bakterilerin hücre dışına tetrasiklin pompalamasına yardımcı olan enerjiye bağımlı akış proteinlerini kodlamak için birlikte kullanılan tetB ve tetA genleri ile ortaya çıkmaktadır (Roberts, 2005).

Tablo 4.5 İzolat 4'ün direnç genleri

Direnç geni	Oran	Baş-Son	Hizalama / Gen	İplik	Kontig/ Derinlik	Fenotip	Not
Mph(A)	100,0	5798-6719	906/906	-	95,39	Eritromisin, Azitromisin, Spiramisin, Telitromisin	Mph(A) ailesi makrolit 2'-fosfotransferaz
sul2	100,0	1785-2600	816/816	-	131,5	Sülfametoksazol	Sülfonamide dirençli dihidropteroat sentaz
dfrA14	100,0	1635-2108	474/474	+	96,85	Trimetoprim	Trimetoprime dirençli dihidrofolat redüktaz
bla_{TEM-1B}	100,0	177-1037	861/861	+	233,99	Amoksisilin, Ampisilin, Sefalotin, Piperasilin, Tikarsilin	A sınıfı geniş spektrumlu β-laktamaz
$bla_{CTX-M-15}$	100,0	64573-65448	876/876	-	162,8	Amoksisilin, Ampisilin, Aztreonam, Sefepim, Sefotaksim, Seftazidim, Seftriakson, Piperasilin, Ticarsilin	A sınıfı geniş spektrumlu β-laktamaz
aph(3')-Ia	100,0	164-979	816/816	+	83,711	Kanamisin	aminoglikozit O-fosfotransferaz
aph(6)-Id	100,0	85-921	837/837	-	79,1575	Streptomisin	aminoglikozit O-fosfotransferaz
aph(3'')-Ib	100,0	921-1748	828/828	-	79,157	Streptomisin	aminoglikozit O-fosfotransferaz

Kinolon, amino grubunu kesinlikle asetilleyen aac(6')-Ib-cr gen aktivitesi tarafından hedeflenen bir piperazin halkası içermektedir. Bir istisna olarak, amino grubunu tıkayan levofloksasindir (Cattoir ve Nordmann, 2009). Kinolonlara karşı plazmit yoluyla bir direnç mekanizması sonunda direncin fenotipik olarak aşırı düzeyde katılımını (%46,66) açıklamaktadır. Ayrıca, qnr gen ailesi tarafından kodlanan peptit, DNA giraz veya DNA topoizomeraz IV komplekslerini kinolonlar yoluyla sınırlandırıl bir düzeyde koruyabilmektedir (Fàbrega vd., 2009). Türkiye'de yapılan araştırmalar

qrnS ile aac(6')-Ib-cr arasında bir miktar buraya doğru giden bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Nazik vd., 2011).

Tablo 4.6 İzolat 5'in direnç genleri

Direnç geni	Oran	Baş-Son	Hizalama / Gen	İplik	Kontig/ Derinlik	Fenotip	Not
Mph(A)	100,0	146-1067	906/906	+	115,43	Eritromisin, Azitromisin, Spiramisin, Telitromisin	Mph(A) ailesi makrolit 2'-fosfotransferaz
qnrS1	100,0	9738-10394	657/657	+	155,7	Siprofloksasin	Kinolon dirençli pentapetid tekrar proteini
sul1	100,0	20991-21830	840/840	-	118,14	Sülfametoksazol	Sülfonamide dirençli dihidropteroat sentaz
sul2	100,0	16029-16844	816/816	+	227,92	Sülfametoksazol	Sülfonamide dirençli dihidropteroat sentaz
dfrA17	100,0	22401-22874	474/474	-	126,98	Trimetoprim	Trimetoprime dirençli dihidrofolat redüktaz
tet(A)	99,84	9747-10946	1275/1275	-	107,5	Doksisiklin, Tetrasiklin	Tetrasiklin MFS taşıyıcı
bla_{TEM-1B}	100,0	1-769	861/861	-	155,31	Amoksisilin, Ampisilin, Sefalotin, Piperasilin, Tikarsilin	A sınıfı geniş spektrumlu β-laktamaz
$bla_{CTX-M-15}$	100,0	64573-65448	876/876	-	162,8	Amoksisilin, Ampisilin, Aztreonam, Sefepim, Sefotaksim, Seftazidim, Seftriakson, Piperasilin, Ticarsilin	A sınıfı geniş spektrumlu β-laktamaz

Bu çalışmada, ESBL *E. coli* içinde aac(6')Ib-cr'nin Türkiye'de kinolon direncine neden olan standart bir gen olarak qrnS genleri ve ailelerinden daha fazla insidansa sahip olduğu sonucuna varan Azeez vd. (2018) bulguları ile uyumludur ancak Türkiye'de çok-yalıtılmış sayıda izolat mevcut olduğu da göz önüne alınmalıdır. Florokinolonlar ve kinolonları içeren antimikrobiyal ilaçların insan enfeksiyonlarını iyileştirmedeki önemi bilinmektedir. Duyarlı bakterilerde kinolonlara karşı kazanılmış direnç genellikle tek aşamalı spontan kromozom mutasyonlarından oluşmaktadır.

Kromozom mutasyonları iki biçimde açıklanmaktadır; birincisi, kinolonların hedef enzimi olan DNA giraz ve DNA topoizomeraz IV alt birimlerindeki bir modifikasyondur. İkincisi ise zar geçirgenliğinin bozulmasıdır (Heeb vd., 2011). Giraz enzimi, 2 alt birim gyrA ve iki alt birim gyrB'den oluşmakta olup, topoizomeraz IV, halihazırda GNB tarafından saldırıya uğrayan iki parC ve iki parE alt birimi içermektedir (Hopkins vd., 2005).

Çalışmada incelenen 16 antibiyotikten imipenem, meropenem ve ertapenem %0,00-3,3 oranında direnç göstermiştir buna rağmen imipeneme uzun süre maruz kalma durumunda da son derece etkili olan antibiyotiğe karşı direnç gelişiine neden olabileceği göz ardı edilmemelidir. Son çalışmalar, *Enterobacteriaceae* türlerinin artık karbapenem direnci geliştirdiğini ortaya koymuştur (Mediavilla vd., 2016; Shields vd., 2021).

4.5 Kromozomal Nokta Mutasyonları

ResFinder4.1 yazılım programından alınan kromozomal nokta mutasyonları Tablo 4.7'de verilmiştir. Kinolonların aktivitesinin üstesinden gelmek için giraz kodlayan genlerde mutasyonların varlığı veri tabanından tespit edilmiştir. GyrA genindeki tek bir mutasyon, kinolonlara direnç kazandırabilir, ancak tüm gruplar için gyrA ve/veya parC birimleri içinde başka mutasyonlar gerekmektedir (Hopkins vd., 2005; Poriel vd., 2018). Nalidiksik asit ve siprofloksasin direnci gösteren izolatların (izolat 1, izolat 2, izolat 3 ve izolat 4) uyumlu olduğu görülmüştür. *gyrA* (Ser ≥ Leu, Asp ≥ Asn) gösterdiği mutasyonların, *parE* (Ser ≥ Ala, Ile ≥ Leu) ve *parC* (Ser ≥ Ile) diğer mutasyonlardan daha büyük bir oluşum oranına sahip olduğu belirlenmiştir. İzolat 2, insidansı beş ana mutasyon aracılığıyla yükseltmiş, bunu izolat 3, izolat 1 ve izolat 4 takip etmiştir. Fakat izolat 5'te hiçbir kromozom mutasyonu görülmemiştir.

İspanya'da yapılan bir çalışmada *gyrA*'nın Ser83Leu, *parC*'nin Ser80Ile ve *parE*'nin Ser458Ala ile yüksek prevalansı olduğu ve kinolonlar için MİC değerlerinin arttığı bildirilmiştir (Sorlozano vd., 2007). Tablo 4.8'de verilen mutasyonların, *E. coli* suşlarının antimikrobiyalleri hedefleyen DNA'sının herhangi bir etkili yolu bloke etme yeteneğini desteklediği tespit edilmiştir.

Table 4.7 *E. coli* izolatlarında mutasyonlar ve buna bağlı değişiklikler

Mutasyon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	Fenotip
İzolat 1			
parC:p.S80I	agc≥atc	Ser≥Ile	Nalidiksik asit, Siprofloksasin
gyrA:p.S83L	tcg≥ttg	Ser≥Leu	Nalidiksik asit, Siprofloksasin
İzolat 2			
gyrA:p.D87N	gac≥aac	Asp≥Asn	Nalidiksik asit, Siprofloksasin
gyrA:p.D87N	gac≥aac	Asp≥Asn	Nalidiksik asit, Siprofloksasin
parC:p.S80I	agc≥atc	Ser≥Ile	Nalidiksik asit, Siprofloksasin
gyrA:p.S83L	tcg≥ttg	Ser≥Leu	Nalidiksik asit, Siprofloksasin
parE:p.S458A	tcg≥gcg	Ser≥Ala	Nalidiksik asit, Siprofloksasin
İzolat 3			
gyrA:p.D87N	gac≥aac	Ser≥Asn	Nalidiksik asit, Siprofloksasin
parE:p.S458A	tcg≥gcg	Ser≥Ala	Nalidiksik asit, Siprofloksasin
parC:p.S80I	agc≥atc	Ser≥Ile	Nalidiksik asit, Siprofloksasin
gyrA:p.S83L	tcg≥ttg	Ser≥Leu	Nalidiksik asit, Siprofloksasin
İzolat 4			
parE:p.I529L	att≥ctt	Ile≥Leu	Nalidiksik asit, Siprofloksasin

Kısaltmalar: Ser, Serin; Ile, Izolösin; Leu, Lösin; Asp, Aspartik asit; Asn: Asparjin; Ala, Alanin

4.6 Virulans Faktörleri (VF)

Extraintestinal patojenik *Escherichia coli* (ExPEC), tüm yaş gruplarını etkileyen çeşitli klinik hastalıklara neden olan en yaygın Gram negatif bakteriyel patojendir. ExPEC, öncellikle yaşlı yetişkinleri etkileyen ve yenidoğanlarda menenjitin sık görülen bir nedeni olan bakteriyeminin en yaygın nedenidir (Russo ve Johnson, 2003). Genç sağlıklı kadınlarda idrar yolu enfeksiyonlarının (İYE) çoğuna ExPEC neden olur. ExPEC enfeksiyonlarına bağlı küresel morbidite ve mortalite oranları önemlidir ve sürekli olarak artmaktadır. Genomik çağın ardından, bakteri genomlarının karakterizasyonu için çeşitli web araçları geliştirilmiştir. Bu web araçlardan birisi de Genomik Epidemiyoloji Merkezi (CGE) tarafından sağlanan VirulenceFinder'dır (URL-1, 2023). VirulenceFinder, *E. coli* izolatlarının karakterizasyonu için tüm

genom dizileme (WGS) verilerini kullanır ve araştırmacıların ve klinik sağlık personelinin, WGS verilerinden virülansla ilgili bilgileri hızlı bir şekilde çıkarmasını ve yorumlamasını sağlar (Joensen vd., 2014). VirulenceFinder, ya birleştirilmiş genom verilerine karşı bir BLAST araması gerçekleştirerek ya da ham okumaları virülans genlerini içeren bir FASTA veri tabanına karşı k-mer hizalaması (KMA) ile hizalayarak virülans genlerini saptar (Clausen vd., 2018).

Table 4.8 Gen dağılımını kodlayan virülans faktörleri

İzolat 1	**İzolat 2**	**İzolat 3**	**İzolat 4**	**İzolat 5**
gad	*air*	*chuA*	*afaA*	*chu*
iss	*chuA*	*gad*	*afaC*	*gad*
ompT	*eilA*	*terC*	*afaD*	*iha*
terC	*gad*	*air*	*capU*	*iss*
cea	*hra*	*eilA*	*chuA*	*ompT*
etsC	*iucC*	*fyuA*	*fyuA*	*terC*
hlyC	*iutA*	*hra*	*gad*	*air*
hra	*kpsE*	*irp*	*iha*	*cia*
iroN	*kpsMII-K96*	*kpsE*	*ipr2*	*cib*
iucC	*ipfA*	*kpsMII-K5*	*iucC*	*eilA*
iutA	*ompT*	*sitA*	*iutA*	*fyuA*
ipfA	*sitA*	*traT*	*kpsE*	*hra*
papC	*terC*		*kpsMII-K5*	*iroN*
sitA			*nfaE*	*ipr2*
traT			*ompT*	*iss*
			papAF43	*kpsE*
			sat	*kpsMIII-K96*
			satA	*ipfA*
			terC	*mcmA*
			traT	*papA-F11*
			yfcV	*papC*
				sitA
				traT
		Toplam		
15	13	12	21	23
		84		

Bu çalışmada beş izolattan, *E. coli*'nin UTI patojenite seyri sırasında birçok konakçı hücreye yapışmasını, kolonize olmasını ve istila etmesini sağlayan farklı işlevlere sahip toplam 84 virülans faktörü kodlayan gen saptanmıştır. Genler, Tablo 4.8'de sunulmuştur. En çok VF geni sırasıyla izolat 5'te (23) (%27,38), ardından izolat 4'te (21) (%25), izolat 1'de (15) (%17,85), izolat 2'de (13) (15,47) ve izolat 3'te (12) (%14,28) olarak temsil edildiği belirlenmiştir. İzolatlarda VF; adhezin 12 geni (*iha, afaA, afaC, afaD, hra, papAF43, papA-F11, papC, cea, ipfA, nfaE, yfcV*), demir alım sistemi 9 (*fuyA, iutA, sitA, iroN, iucC, irp, ipr2, chu, chuA*), koruma ve istila 8 (*traT, iss, terC, kpsE, kpsMII-K96, kpsMII-K5, kpsMIII-K96, hlyC*), toksinler 4 (*sat, satA,*

cia, cib) ve diğer muhtelif proteinler 7 (g*ad, etsC, air, eilA, capU, mcmA, ompT*) şeklindedir. İzolat 1'de *gad* (3), *iss* (2) ve *etsC* (2) gibi birden fazla kopyada temsil edilen bazı genler mevcut olup, *gad* (2), *sitA* (2) ve *terC* (2) genleri izolat 2'nin genomunda tespit edilmiştir. İzolat 3 *gad* (2), *terC* (2), *eilA* (2), *fyuA* (2), *hra* (3), *irp2* (3), *kpsE* (3), *kpsMII-K5* (3), *sitA* (3) ve *traT* (3) genlerini, izolat 4 ise *terC* (2) ve *traT* (2) genlerini içermektedir. İzolat 5'in genom bileşiminde ise *gad* (2), *iss* (2), *terC* (2) ve *traT* (2) genleri tespit edilmiştir.

ExPEC, IPEC'den farklıdır, çünkü bu fakültatif patojenler, geleneksel olarak, serotiplerinin çeşitliliği ile gösterilen, farklı filogenetik gruplardan türetilmiş olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte belirli bir hastalık tipine özgü VF kesin ve ayırt edici bir dağarcığı bulunmamaktadır (Dobrindt 2005; Köhler ve Dobrindt 2011). Çeşitli virülans faktörleri (VF) kombinasyonları, yalnızca bir ExPEC patotipini tanımlayan ekstraintestinal hastalığın ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Genom dizileme çalışmaları, ExPEC arasında kapsamlı genom çeşitliliği ortaya çıkarmıştır, ancak aynı zamanda toksinler, demir alım sistemleri, adezinler, lipopolisakkaritler (LPS), polisakarit kapsüller, proteazlar ve invazinler dahil olmak üzere bazı patotipe özgü genleri de tanımlamıştır. Yine, bu faktörler sıklıkla mobil elemanlar üzerinde kodlanmaktadırlar (Köhler ve Dobrindt, 2011; Lu vd., 2011; Moriel vd., 2010). Ayrıca, *hlyA, fyuA, traT* ve *iutA* gibi birkaç ExPEC virülans geni, patojenite için bağımsız belirleyicilerdir. Özellikle *iutA* ve *traT* genlerinin ikisi, patojenite için bağımsız belirleyicilerdir (Lee vd., 2010). Bakteriyemi etkeni olarak *E. coli*'den yaklaşık 30 VF geninin saptanması ve rektal sürüntülerin (dışkı örnekleri) (Sannes vd., 2004) çaışma sonuçlarımızı destekleyen birçok gen içermektedir.

İYE sırasında nüksetmeye veya kalıcılığa neden olan birincil enfeksiyonlu *E. coli*, daha yüksek bir toplam virülans faktörü gen skoruna ve daha yüksek hemoliz prevalansına ve ardından tedavi veya yeniden enfeksiyona göre birçok virülans faktörü genine sahiptir. Kalıcılık veya nüks sonuçlarıyla ilişkili virülans faktörü genleri şunları içermektedir: Adezinler (*sfa/focDE, papAH*), demir alım sistemleri (*chuA, fyuA, iroN*), koruyucular (*kpsM II, kpsMII K2*), toksinler (*cnf1, hlyD*) ve CFT073'ten (*malX*) patojenite ile ilişkili bir adanın belirteci iken, biyofilm ile ilgili bir faktör (*agn43*) ve

bir bakteriyosin benzeri faktör (*usp*) (Ejrnæs vd., 2011), çalışmamızda ampisilin, sülfametizol, streptomisin ve tetrasikline dirençli olduğu bulunmuştur.

chuA, *fyuA*, *vat* ve *yfcV* genlerini taşıyan *E. coli* izolatları, üriner sistemi verimli bir şekilde kolonize eder ve üropatojeniteyi yükseltir (Crossman vd., 2010; Spurbeck vd., 2012). *chu* ve *fyu* genlerinin varlığında kommensali patojenik suşlardan ayırt etmek için bu köşe taşıdır. Bir izolattan elde edilen mevcut veriler, kandaki demiri kullanmak için *chu* geninin bulunmadığını ortaya çıkarmıştır ve bunun nedeni, *E. coli* patogruplarının birçok genomunun analiz edilmesi yoluyla bu izolatın B1 filogrubuna ait olmasıdır. Üropatojenik suşlar ve hedef glikosfingolipidlerle ilişkilidir (Mulvey, 2002). Hem PAI ICFT073 hem de PAI IICFT073 patojenite adalarının bir parçasıdır (Rasko vd., 2001). Demir edinim proteinleri durumunda, virülans ile ilişkili olduğu uzun zamandır bilinmektedir çünkü demir, konakçıdaki patojenik bakteriler için sınırlayıcı bir temel besindir, bu nedenle heme gelirleri için önemli olduğundan patojeniteyi tetiklemektedir (Wilks ve Heinzl, 2014; Subashchandrabose ve Mobley, 2015). Bu çalışmada, hayatta kalmak için patojenik izolatları zenginleştiren dokuz demir edinim virülans geni saptanmıştır. *Iss* geni, sporadik olarak dağıldıkları ve profaj kodlu oldukları için ExPEC ve diğer patotipler arasında izolat 5'te sunulan bir bağışıklık yanıtı sırasında konakçı tamamlayıcı sistemine direnen proteinleri kodlamaktadır (Lynne vd., 2006).

4.7 Filogenetik Gruplar

Clermont vd. (2000) çalışmasında *chuA* ve *yjaA* genlerinin ve DNA fragmanı TSPE4.C2'nin bir moleküler tanıma tekniği olan PCR tespitine dayalı olarak *E. coli* suşlarının filogenetik gruplarını belirlemek için hızlı bir teknik açıklanmıştır. Bu üç genin varlığı veya yokluğu ile ilgili olarak, bir *E. coli* suşu ana filogruplardan biri olan A, B1, B2 veya D'ye aittir. Clermont vd. (2013) çalışmasında ise bu üç aday işaretleyiciye bir gen hedefi olan *arpA* eklenmiştir ve bir *E. coli* izolatını A, B1, B2, C, D, E, F ve sınıf 1 filogruplarından birine sınıflandırmak için dörtlü bir PCR testi yapılmıştır.

Tablo 4.9'de temsil edilen filogenetik grup sınıflarındaki tez çalışmasındaki bulgular açıklamaktadır. Bir yandan sırasıyla B1 ve B2'de yer alan izolat 1 ve izolat 4, öte yandan, izolat 2, izolat 3, ve izolat 5 aynı filogenetik grup D'i meydana getirmektedir.

Table 4.9 *E. coli* izolatlarının filogenetik grupları

İzolat No	Dötlü Genler	Ekler	Filogrup	Filogenetik Grup
1	+--+	*Fdm, trpAgpC, ybgD*	B1	B1
2	++--	*trpAgpC, ybgD*	D	D
3	++-+	*trpAgpC, ybgD*	D	D
4	-+++	*trpAgpC*	B2	B2
5	++--	*trpAgpC, ybgD*	D	D

A, B1, B2 ve D dahil olmak üzere ana filogenetik gruplardan, B2 ve D filogruplarına ait olan *E. coli* suşlarının, A ve B1 gruplarından daha fazla ekstraintestinal enfeksiyona neden olma ve karşılık gelen virülans genlerine sahip olma olasılığı daha yüksektir (Picard vd., 1999; Johnson ve Stell, 2000). Ayrıca, bağırsak dışı ilişkili B2 ve D filogrupları karşılaştırıldığında, filogrup B2, UPEC patotipi ile pozitif olarak ilişkilidir. Buna karşılık, D filogrubu, diğer ExPEC patotipleriyle daha fazla ve UPEC patotipiyle daha az ilişkilidir (Hutton vd., 2018). Tenaillon vd. (2010) çalışmasında aynı bulguları elde ederek filogenetik gruplar B2 ve D'nin bağırsak dışı patojenik *E. coli* izolatlarının çoğunun ait olduğu gruplar olarak bilindiğini göstermiştir. Bunlar izolatlarımızın sırasıyla %26 ve %32'sinde mevcut olduğu belerilenmiştir. İlgili filogruplar, ExPEC'ler arasında *E. coli* klonal grubundaki MDR'i, filogenetik grup D'den klonal grup A'dır (CGA). 1990'larda ortaya çıkan klon grubu, trimetoprim-sülfametoksazol direnci ile ilişkilidir ve çeşitli bağırsak dışı enfeksiyonların yaygın bir nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. İfade edilen tüm bu çalışmalar, *E. coli* içindeki filogrup B1, B2 ve D prevalansına ilişkin verilerimizi desteklemektedir. Öte yandan, elf ve CFA/I fimbriaları, kommensalizm veya bağırsak patogenezi ile ilişkili filogruplarda iyi korunduğu, ancak B2 ve D suşlarında eksik olduğu görülmüştür. Clark ve Maresso (2021) çalışmasına buna göre bulgularımızda bu iki genin yokluğu nettir. Belirli filogruplarda artan demir edinim genleri, B2 ve D filogruplarının üyelerinin neden ExPEC'lerde aşırı temsil edildiğini açıklayabilmektedir. Çünkü son çalışmalar demir edinim genlerinin içsel virülansı artırdığını göstermiştir (Id vd.,

2020). Bu ilişki, söz konusu filogruplarda bu genlerin yayılımını çalışmamızda olduğu gibi desteklemektedir.

4.8 Çoklu Odak Sekans Tiplemesi (MLST)

Çoklu odak sekans tiplemesi (MLST), genellikle yedi temizlik geninin dahili fragmanlarının sekanslarını kullanarak bakteri türlerinin izolatlarını karakterize etmek için kesin bir prosedürdür. Her bir genin yaklaşık 450-500 bp dahili fragmanları kullanılır, çünkü bunlar otomatikleştirilmiş bir DNA dizileyici kullanılarak her iki sarmal üzerinde doğru bir şekilde dizilenebilmektedir. Her bir ev tutma geni için, bir bakteri türü içinde bulunan farklı diziler, farklı aleller olarak atanır ve her izolat için, yedi lokusun her birindeki aleller, alelik profili veya dizi tipini (ST) tanımlamaktadır.

Halihazırda, *E. coli* dizisi tiplemesinin ana anahtarı olarak yedi gen tespit edilmiştir. Bunları şu şekilde sıralayabiliriz:

- ✓ *adk*,
- ✓ *fumC*,
- ✓ *gyrB*,
- ✓ *icd*,
- ✓ *mdh*,
- ✓ *purA*,
- ✓ *recA*.

Veriler, tüm izolatların %100 özdeşliğe sahip ve herhangi bir boşluk olmaksızın farklı ST alanlarına sahip olduğunu ortaya koymuştur. Örneğin, izolat 1'de ST 69'da yer almakta ancak izolat 2'de ST 162'de düşmektedir. Diğerlerinde ise izolat 3'te ST 405'te, izolat 4'te ST 131'de ve izolat 5'te ST 69'da yerleşmektedir.

Fimbrial adezin Afa, *afa* genleri tarafından kodlanır ve genellikle ExPEC, UPEC ve yaygın olarak yapışan *E. coli* suşları ile ilişkilidir (Servin, 2005; Dhakal vd., 2008). *afa* genlerini içeren çoğu suş, ST131 klonal grubuna aittir (Clark ve Maresso, 2021). Sat toksini, üropatogenezde yer alan vakuolleştirici bir sitotoksindir (Guyer vd., 2002). *FimH*, *fyuA*, *kpsMII*, *iha*, *iutA*, *tratT*, *ompT* ve *usp*, bağırsak dışında ST131'i saptamak

için ana anahtarlar olarak değerlendirilir (Chanoine vd., 2008; Shaik vd., 2017). B1 ve D'nin yanı sıra B2 filo grubundan ST131 ve ExPEC suşlarında da tespit edilmiştir (Guyer vd., 2000; Hojabri vd., 2020); bunlar, araştırılmakta olan veri tabanı analizinde *sat, afaA, afaC* ve *afaD* genini ve diğer VF eksprese eden izolatın ST131'ini ortaya çıkarmaktadır. ST131 izolatlarının, CTX-M-15 gibi (Lau vd., 2008) genişletilmiş spektrumlu β-laktamazlar ürettiği ve neredeyse tamamının florokinolonlara dirençli olduğu bildirilmektedir. Tüm ExPEC'lerin %30'u, florokinolon direnci ExPEC'in %60-90'ı ve ESBL direnci ExPEC'in %40-80'i ST131 ile bağlantılıdır (Pitout ve DeVinney, 2017). Ayrıca, ST131 *E. coli* izolatları, hem toplum hem de hastane ortamlarında neden oldukları enfeksiyon spektrumu ve içerdikleri birçok virülansla ilişkili gen nedeniyle patojen olarak kabul edilir. ST131 izolatları, yüksek düzeyde antimikrobiyal direncin zorunlu olarak patogenezde bir azalmaya yol açan bir uygunluk maliyeti ile ilişkili olduğu şeklindeki yaygın görüşle çelişiyor gibi görünmektedir (Banerjee ve Johnson, 2014; Nicolas-Chanoine vd., 2014). MLST genlerindeki (housekeeping genler) stabilite aslında o kadar yüksektir ki, hem serotipleme hem de PFGE'den önemli ölçüde daha düşük olan bu tipleme yönteminin ayrımcı gücünü olumsuz etkilemektedir. *E. coli* genlerindeki varyasyonun bir tahmini ayrıca, ortalama korunmuş genden daha değişken genler içerdiğini gösteren Pasteur şeması dışında, MLST tiplendirmesi için kullanılan genlerin *E. coli*'de bulunan ortalama korunmuş genden daha az varyasyon içerdiğini düşündürür (Kaas vd., 2012).

Multidirençle ilişkili 'virulans' filogrup D'nin *E. coli* soyları, ST69 ve ST405'i içermektedir (Cagnacci vd., 2008; Platell vd., 2010). ESBL genişletilmiş spektrumlu β-laktamaz anlamına gelir. B-laktamazlar, bazı bakteriler tarafından üretilen ve onları bazı antibiyotiklere dirençli hale getirebilen enzimlerdir. ESBL üretimi, genellikle bağırsakta bulunan bir bakteri ile ilişkilidir. ST405, ESBL üreten *E. coli* izolatları için en yaygın ikinci sekans tipidir. ST405 aynı zamanda ESBL üreticilerinin CTX-M-15 genotipi ile de yakından ilişkilidir. ST131 ve ST405 oldukça öldürücüdür ve dirençli ve duyarlı genlere sahiptir (Mihaila vd., 2010; Smet vd., 2010). Çoğu İYE ST69 çoklu ilaca dirençlidir ve tipik olarak bir sınıf I integron üzerinde sırasıyla trimetoprim/sülfametoksazol ve aminoglikozid adeniltransferaz için dihidrofolat redüktazı kodlayan tek bir gen kaseti (dfrA17-aadA5) düzenlemesi içermektedir (Ajiboye vd., 2009; Solberg vd., 2006). Kritik halk sağlığı ve klinik kaygılardan

bazıları, klonal soylarda, özellikle ST131, ST393, ST69, ST95 ve ST73 (Riley, 2014) dahil olmak üzere küresel yayılma soylarında ilaca karşı direncin giderek artmasıdır. ST162 ishal ve toplumdan edinilmiş enfeksiyonlarla yatan hastalarda tanımlanmıştır (Zhang vd., 2016). Literatürdeki diğer çalışmalarda, blaCTX-M-55 barındıran *E. coli* ST162 (CC469) prevalansının daha yüksek olduğunu bulunmuştur; bu nedenle *E. coli*-ST162, bu blaCTX-M varyantlarının ülke çapında yayılmasıyla ilişkilendirilebilir (Zurita vd., 2020). Sırasıyla 69, 162 ve 69 dizilim tiplerinde yer alan izolat 1, izolat 3 ve izolat 5 daha önce gösterilen direnç sonuçları ile uyumludur. Ludden vd. (2021) çalışmasından elde edilen sonuçlara göre patojenik *E. coli* ile enfekte hastaların klinik kohortlarından en çok tanımlanan ST'lerde bu çalışmadakilere benzer olarak ST131, ST10 ve ST69 bulunmuştur.

4.9 Varyant Çağrı Tabanları (VCB)

Bilinen bir referans genomla (daha önce bahsedilen) ek açıklamanın ardından farklı konumlarda beş izolatta (2,217) çok fazla SNP ortaya çıkmıştır. İzolat 1'de 5 Gbps'den 427 indel, özellikle delesyonlar için 138 (%32,31) ve eklemeler için 288 (%67,44) indel olurken, sadece bir baz çifti G→T transversiyon mutasyonu olarak kaydedilmiştir. İzolat 2, tüm genomda delesyon olarak algılanan 424 insersiyon-delesyon noktası mutasyonuna sahip olup 142 (%33,49) ve 282 (%66,50) insersiyon görülmüştür. Aynı noktada izolat 3'te 140 (%30,5) içinde toplam 459 indel delesyon ve 319 (%69,49) insersiyon mevcuttur. İzolat 4 ve izolat 5, 466 ve 441 toplam hasat edilmiş indel, sırasıyla 166 (%35,62) ve 135 (%30,61) delesyon, 300 (%64,37) ve 306 (%69,38) insersiyon içermektedir. Nokta mutasyonu, DNA dizisindeki bir baz çiftinin değiştirildiği bir gen içindeki değişikliktir. Nokta mutasyon sınıflandırmasına göre, veri analizinde bazlarda birden fazla varyant türetmiştir. İzolat 1, 21 (%4,91) çerçeve kaymalı varyasyon, 94 (%22,01) intragenik varyant ve kodlamayan ekson varyantı olarak yalnızca bir SNP'dir. İzolat 2'nin genomunun içinde çerçeve kaymalı 12 (%2,83), intragenik varyant 114 (%26,88) ve 1 (%0,23) konservatif insersiyon bilgisine sahiptir. İzolat 3, intragenik varyasyonlar olarak 19 (%4,13) çerçeve kayması ve 105 (%22,87) ile temsil edilmiştir. İzolat 4 sırasıyla çerçeve kaydırma, intragenik varyantlar ve konservatif bilgi ekleme için 11 (%2,36), 129 (%27,68) ve 1 (%0,21) şelinde, izolat 5 ise 14 (%3,17) çerçeve kayması, 92 (%29,86) intragenik varyant,

eşanlamlı varyant 1 (%0,22) ve missense 1 (%0,22) toplam SNP'lerden oluşmaktadır. 69 *E. coli* SNP tespit çalışması, 1.000'den fazla gende çekirdek genomda 86.350 varyant bulunmuştur (Lorenz vd., 2017). Çekirdek genomun farklı boyutları, çalışmadaki farklılığa da neden olmuş olabilir. Nükleotit veya SNP varyasyonları, bireysel organizmalar arasındaki DNA'daki tek bazlı farklılıklardır (Foster vd., 2008; Uelze vd., 2020; Jian ve Li, 2021). İzolatlar arasındaki genlerin SNP'lerindeki farklılıkları belirlemek de *E. coli*'nin coğrafi kökenlerini belirlemek için umut verici bir tekniktir (Liu vd., 2020; Parsons vd., 2016). SNP'ler mikroplarda bol miktarda bulunur ve genellikle genetik çalışmalar için optimum seçim olarak kabul edilir ve ayrıca esneklik, azaltılmış hata oranı, hız ve maliyet etkinliği gibi çeşitli avantajlara sahiptir (Dallman vd., 2021).

Klinik vakalarından toplanan 74 numune, WGS teknolojisiyle *E. coli* O157:H7 genomunda 813 SNP sergilenmiştir (Strachan vd., 2015). O157:H7 serotipinde 105 izolatta toplam 8.721 nükleotit varyantı WGS ile toplanmıştır. Holmes vd. (2015) çalışmasına göre SNP'lerin %47'si rekombinant bölgeleri içermektedir. Farklı *E. coli* genleri içindeki SNP'ler, gıda kaynaklı hastalıkların hızlı gözetimi, salgın takibi (Navjot vd., 2019), tipleme yöntemleri ve rutin teşhisler için değerli belirteçler olabilir. Multiplex PCR, her hedef için farklı bir primer çifti ile tek bir reaksiyon kuyusunda birden çok hedefin eş zamanlı tespitidir. Multiplex PCR yöntemi sırasında, temizlik genlerinde *E. coli* izole edilen üriner enfeksiyon örneklerinden 2559 örnekte 54 SNP tanımlanmıştır (Tchesnokova vd., 2016). Önceki araştırmalarda, SNP tabanlı teknik, benzer bakteri suşlarının farklı izolatlarını tespit edebilen WGS'nin SNP'lerine dayalı retrospektif araştırma çalışmalarında yardımcı olmaktadır (Camprubí-font vd., 2018). Bu çalışmadan eelde edilen bulgular, *E. coli* DH10B'nin WGS'sinde eşanlamlı taşıyan 30 gen, 66 gen yanlış anlam ve beş gen anlamsız SNP varlığı ile Durfee vd. (2008) çalışması ile farklılık göstermektedir. Ek olarak, yanlış anlamlı 11 gen, 42 SNP'nin intragenik varyasyon olup olmadığı ve dört genin çerçeve kaydırmalı SNP'lerle karşılaşıp karşılaşmadığı bu çalışmada gösterilmektedir. SNP oluşumunun ana nedeni olan nokta mutasyonları, farklı genom bölgelerinde çoklu değişikliklere yol açmıştır. Bu, antibiyotik direncinde, fonksiyonel genlerde, virülans faktör genlerinde ve filogenetik gruplarda görülmüştür. Tüm bu değişiklikler, *E. coli* genomunun bunları yaşam döngüsü sırasında elde ettiğini göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmadan elde edilen sonuçlar özetle aşağıda sıralanmıştır:

a. Çalışmada kullanılmak için izole edilmiş olan *Escherichia coli* bakteri suşları, erkekler ve kadınlarda idrar yolu enfeksiyonu amili olarak tanımlanmış olup, prevalansı özellikle 56 yaş ve üzerindedir.

b. Uygulanan antibiyogram testinde kullanılan 16 antibiyotik arasından, fenotipik olarak trimetoprim/sülfametoksazol ve gentamisine karşı *Escherichia coli* izolatları en yüksek direnci göstermiştir. Antibiyogram testi sonuçlarına göre karbapenemler bu bakteriye karşı kullanılacak elimizdeki en değerli gruptur.

c. Çalışmada tercih edilen tüm genom dizileme teknolojisinin (WGS), milyonlarca baz çiftini araştırmak, tespit etmek ve biyoinformatik platformlarla gen analizi üretmek için hassas ve doğru bir yöntem sunduğu görülmüştür.

d. Illumine platformu tarafından genom dizileme teknolojisi ile dizilenen beş izolattan sülfanilamid, sefalosporinler, eritromisinler ve tetrasiklinlere karşı birçok direnç geni tespit edilmiş ve haritalanmıştır.

e. Florokinolonlara karşı *gyrA*, *gyrB*, *parC* ve parE genlerinde 5 nokta kromozomal mutasyon meydana gelmiştir.

f. Beş genomun izole edilmesinden kaynaklanan çoklu virülans faktörü gen kategorileri orataya konulmuştur.

g. Filogenetik grup D üç izolattan en tipik olanı olarak kaydedilirken, veri analizinde B1 ve B2 bunu takip etmiştir.

h. Sekans tiplemesi, ST405, ST162 ve ST131 olmak üzere iki izolatta ST69'u ortaya çıkarmıştır.

i. Antibiyotik direnci ve virülans faktör genleri, SNP insidansı ve buna bağlı değişiklikler ile klinik olarak ST'ler içindeki patojenik bakterilerin dağılımına ve yayılmasına yardımcı olduğu dğerlendirilmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre ise:

a. Hiç kimsenin doktor reçetesi olmadan idrar yolu enfeksiyonlarına karşı yanlış ve/veya aşırı antibiyotik kullanmamalarını,

b. Antibiyotik direncinden sorumlu genlerin susturulması veya devre dışı bırakılması için klinik çalışmaların arttırılmasını,

c. Zamanla artışı devam ettiği ve gelecek açısından çok önemli bir problem teşkil edeceği için antibiyotik direncine dikkat edilmesini,

d. Eksiksiz bir genom analizi olmadan, önemli klinik patojenlerin her geçen gün yayılması tehlikesiyle karşı karşıya olduğumuzu,

e. Nükleotid polimorfizmi genom içindeki değişikliklerden dramatik bir şekilde ifade etmektedir, bu nedenle bu değişikliklerin önüne geçebilmek ve/veya asgari seviyeye indirebilmek için büyük araştırmalar yapılması gerektiğini,

f. Bakteri suşlarının küresel dağılımını doğru bir şekilde bilmek için Centre for Genomic Epidemiology gibi web tabanlı platformlarla bakterilerin, filogeetik gruplarının, virülanlarının sekans tipi gibi birçok özelliklerinin ortaya konması gerektiğini,

önermekteyiz.

KAYNAKLAR

Abe, C.M., Salvador, F.A., Falsetti, I.N., Vieira, M.A.M., Blanco, J., Blanco, J.E., vd. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *52*(3), 397-406. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00388.x

Adams, R.A., Leon, G., Miller, N.M., Reyes, S.P., Thantrong, C.H., Thokkadam, vd. (2021). Rifamycin antibiotics and the mechanisms of their failure. *Journal of Antibiotics*, *74*(11), 786-798. https://doi.org/10.1038/s41429-021-00462-x.

Ajiboye, R.M., Solberg, O.D., Lee, B.M., Raphael, E., Debroy, C. & Riley, L.W. (2009). Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and salmonella strains causing community-acquired infections. *Clinical Infectious Diseases*, *49*(3), 365-371. https://doi.org/10.1086/600301.

Al-Badr, A. & Al-Shaikh, G. (2013). Recurrent urinary tract infections management in women: A review. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, *13*(3), 359-367. https://doi.org/10.12816/0003256.

Alabsi, M.S., Ghazal, A., Sabry, S.A. & Alasaly, M.M. (2014). Association of some virulence genes with antibiotic resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection patients in Alexandria, Egypt: A hospital-based study. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *2*(2), 83-86. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.01.003.

Alós, J.I. (2005). Epidemiology and etiology of urinary tract infections in the community. Antimicrobial susceptibility of the main pathogens and clinical significance of resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *23*(SUPPL.4), 3-8. https://doi.org/10.1157/13091442.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). BLAST_article.pdf. In *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403-410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Ambler, R.P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *289*(1036), 321-331. https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049.

Aminov, R.I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*, *11*(12), 2970-2988. https://doi.org/10.1111/j.1462-

2920.2009.01972.x.

Andrews, S.C., Robinson, A.K. & Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, *27*(2-3), 215-237. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X.

Antunes, N.T. & Fisher, J.F. (2014). Acquired class D β-Lactamases. *Antibiotics*, *3*(3), 398-434. https://doi.org/10.3390/antibiotics3030398.

Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N. & Ohta, M. (1995). A novel integron-like element carrying the metallo-β-lactamase gene bla(IMP). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(7), 1612-1615. https://doi.org/10.1128/AAC.39.7.1612.

Artsimovitch, I., Vassylyeva, M.N., Svetlov, D., Svetlov, V., Perederina, A., Igarashi, N., vd. (2005). Allosteric modulation of the RNA polymerase catalytic reaction is an essential component of transcription control by rifamycins. *Cell*, *122*(3), 351-363. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.014.

Azeez, D.A., Fındık, D., Türkdağı, H. & Arslan, U. (2018). Konya, Türkiye'de *Escherichia coli* klinik izolatlarında plazmid aracılı fluorokinolon direnci. *Cukurova Medical Journal*, *43*(2), 295-300. https://doi.org/10.17826/cumj.341637.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Molecular Systems Biology*, *2*. https://doi.org/10.1038/msb4100050.

Bae, B., Nayak, D., Ray, A., Mustaev, A., Landick, R. & Darst, S.A. (2015). CBR antimicrobials inhibit RNA polymerase via at least two bridge-helix cap-mediated effects on nucleotide addition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(31), E4178-E4187. https://doi.org/10.1073/pnas.1502368112.

Balsalobre, C., Silván, J.M., Berglund, S., Mizunoe, Y., Uhlin, B.E. & Wai, S.N. (2006). Release of the type I secreted α-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *59*(1), 99-112. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04938.x.

Banerjee, R. & Johnson, J.R. (2014). A new clone sweeps clean: The enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(9), 4997-5004. https://doi.org/10.1128/AAC.02824-14.

Beaber, J.W., Hochhut, B. & Waldor, M.K. (2004). SOS response promotes horizontal

dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, *427*(6969), 72-74. https://doi.org/10.1038/nature02241.

Beghain, J., Bridier-Nahmias, A., Nagard, H., Le Denamur, E. & Clermont, O. (2018). ClermonTyping: An easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microbial Genomics*, *4*(7), 1-8. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000192.

Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., vd. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, *456*(7218), 53-59. https://doi.org/10.1038/nature07517.

Besser, J., Carleton, H.A., Gerner-Smidt, P., Lindsey, R.L. & Trees, E. (2018). Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical Microbiology and Infection*, *24*(4), 335-341. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.013.

Bister, B., Bischoff, D., Nicholson, G.J., Valdebenito, M., Schneider, K., Winkelmann, G., vd. (2004). The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *BioMetals*, *17*(4), 471-481. https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000029432.69418.6a.

Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O. & Piddock, L.J.V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(1), 42-51. https://doi.org/10.1038/nrmicro3380.

Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., vd. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, *277*(5331), 1453-1462. https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453.

Bowdish, D., Davidson, D. & Hancock, R. (2005). A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Current Protein & Peptide Science*, *6*(1), 35-51. https://doi.org/10.2174/1389203053027494.

Breines, D.M., Ouabdesselam, S., Ng, E.Y., Tankovic, J., Shah, S., Soussy, C. J., & Hooper, D.C. (1997). Quinolone resistance locus nfxD of *Escherichia coli* is a mutant allele of the parE gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*(1), 175-179. https://doi.org/10.1128/aac.41.1.175.

Briceño, D.F., Torres, J.A., Tafur, J.D., Quinn, J.P. & Villegas, M.V. (2012). *Clinical Issues of Resistance : Problematic Microbes : Enterobacteriaceae*. 651-678. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1.

Brown, E., Dessai, U., Mcgarry, S. & Gerner-Smidt, P. (2019). Use of whole-genome sequencing for food safety and public health in the United States. *Foodborne Pathogens and Disease*, *16*(7), 441-450. https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2662.

Buermans, H.P.J. & den Dunnen, J.T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1842*(10), 1932-1941. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015.

Bush, K. (2013). *β -lactamases*. *1277*, 84-90. https://doi.org/10.1111/nyas.12023.

Bush, K. (2018). Past and present perspectives on β-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*(10). https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18.

Bush, K. & Jacoby, G.A. (2010). Updated functional classification of β-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(3), 969-976. https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09.

Butler, D. (2010). Human genome at ten: Science after the sequence. *Nature*, *465*(7301), 1000-1001. https://doi.org/10.1038/4651000a.

Cagnacci, S., Gualco, L., Debbia, E., Schito, G.C. & Marchese, A. (2008). European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST 131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(8), 2605-2612. https://doi.org/10.1128/JCM.00640-08.

Camprubí-font, C., Lopez-siles, M., Ferrer-guixeras, M., Niubó-carulla, L., Abellà-ametller, C., Garcia-gil, L.J. & Martinez-medina, M. (2018). *Comparative genomics reveals new single-nucleotide polymorphisms that can assist in identification of adherent-invasive Escherichia coli*. *September 2017*, 1-11. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20843-x.

Castanheira, M., Toleman, M. A., Jones, R.N., Schmidt, F.J. & Walsh, T.R. (2004). Molecular characterization of a β-lactamase gene, blaGIM.1, encoding a new subclass of metallo-β-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(12), 4654-4661. https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4654-4661.2004.

Cattoir, V. & Nordmann, P. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance in Gram-negative bacterial species: An update. *Current Medicinal Chemistry*, *16*(8), 1028-1046. https://doi.org/10.2174/092986709787581879.

Cavalleri, B., Turconi, M., Tamborini, G., Occelli, E., Cietto, G., Pallanza, R., Svd. (1990). Synthesis and biological activity of some derivatives of rifamycin P. *Journal of Medicinal Chemistry*, *33*(5), 1470-1476. https://doi.org/10.1021/jm00167a029

Clark, J.R. & Maresso, A.M. (2021). *Comparative Pathogenomics of Escherichia coli : Polyvalent Vaccine Target Identi fi cation through Virulome Analysis*. *February*, 1-42.

Clausen, P.T.L.C., Aarestrup, F.M. & Lund, O. (2018). Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics*, *19*(1), 1-8. https://doi.org/10.1186/s12859-018-2336-6.

Clermont, O., Bonacorsi, S. & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555-4558. https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000.

Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E. & Gordon, D.M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, *5*(1), 58-65. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019.

Clermont, O., Dixit, O.V.A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., vd. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*, *21*(8), 3107-3117. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713.

Cochrane, S.A. & Lohans, C.T. (2020). Breaking down the cell wall: Strategies for antibiotic discovery targeting bacterial transpeptidases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *194*, 112262. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112262.

Cooper, K.K., Mandrell, R.E., Louie, J.W., Korlach, J., Clark, T.A., Parker, C.T., vd. (2014). Comparative genomics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145: H28 demonstrates a common evolutionary lineage with *Escherichia coli* O157: H7. *BMC Genomics*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-17.

Critchley, I.A., Cotroneo, N., Pucci, M.J., Jain, A. & Mendes, R.E. (2020). Resistance among urinary tract pathogens collected in Europe during 2018. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *23*, 439-444. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.10.020.

Crossman, L.C., Chaudhuri, R.R., Beatson, S.A., Wells, T.J., Desvaux, M., Cunningham, A.F., vd. (2010). A commensal gone bad: Complete genome sequence of the prototypical enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407. *Journal of Bacteriology*, *192*(21), 5822-5831. https://doi.org/10.1128/JB.00710-10.

Croxen, M.A. & Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(1), 26-38. https://doi.org/10.1038/nrmicro2265.

Dale, A.P. & Woodford, N. (2015). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *Journal of Infection*, *71*(6), 615-626. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.09.009.

Dallman, T.J., Greig, D.R., Gharbia, S.E. & Jenkins, C. (2021). Phylogenetic structure of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 from sub-lineage to SNPs. *Microbial Genomics*, *7*(3). https://doi.org/10.1099/mgen.0.000544.

Danel, F., Hall, L.M.C., Gur, D. & Livermore, D.M. (1995). OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(8), 1881-1884. https://doi.org/10.1128/AAC.39.8.1881.

Danel, Franck, Hall, L.M.C., Gur, D. & Livermore, D.M. (1997). OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 β-lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*(4), 785-790. https://doi.org/10.1128/aac.41.4.785.

Davis, B.D. (1987). Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiological Reviews*, *51*(3), 341-350. https://doi.org/10.1128/mmbr.51.3.341-350.1987.

Davis, J.M., Carvalho, H.M., Rasmussen, S.B. & O'Brien, A. D. (2006). Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infection and Immunity*, *74*(8), 4401-4408. https://doi.org/10.1128/IAI.00637-06.

Dhakal, B.K., Kulesus, R.R. & Mulvey, M.A. (2008). Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Investigation*, *38*(SUPPL.2), 2-11. https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2008.01986.x.

Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L. & Brisse, S. (2010). The population structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE*, *5*(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010034.

Dobrindt, U. (2005). (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, *295*(6-7), 357-371.

Dolinsky, A.L. (2020). M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Services Marketing*, *8*(3).

Drawz, S.M., Papp-Wallace, K.M. & Bonomo, R.A. (2014). New β-lactamase inhibitors: A therapeutic renaissance in an MDR world. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(4), 1835-1846. https://doi.org/10.1128/AAC.00826-13.

Drews, G. & Schlegel, H. G. (1999). *Biology of the Prokaryotes*.

Drlica, K. & Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *61*(3), 377-392. https://doi.org/10.1128/mmbr.61.3.377-392.1997.

Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., vd. (2008). The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the biology of a laboratory workhorse. *Journal of Bacteriology*, *190*(7), 2597-2606. https://doi.org/10.1128/JB.01695-07.

Ejrnaes, K. (2011). Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Danish Medical Bulletin*, *58*(4), B4187. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21466767.

Ejrnæs, K., Stegger, M., Reisner, A., Ferry, S., Monsen, T., Holm, S.E., vd. (2011). Characteristics of Escherichia coli causing persistence or relapse of urinary tract infections: Phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence*, *2*(6), 528-537. https://doi.org/10.4161/viru.2.6.18189.

El-hajj, Z.W. & Newman, E.B. (2015). *An Escherichia coli Mutant That Makes Exceptionally Long Cells*. *197*(8). https://doi.org/10.1128/JB.00046-15.

El Salabi, A., Walsh, T.R. & Chouchani, C. (2013). Extended spectrum β-lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, *39*(2), 113-122. https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691870.

Elbadawi, H.S., Elhag, K.M., Mahgoub, E., Altayb, H.N., Mahdi, M. & Hamid, A. (2022). *Antimicrobial resistance surveillance among gram-negative bacterial isolates from patients in hospitals in Khartoum State , Sudan [version 1 ; peer review : 3 approved with reservations]*. *May*.

Ellington, M.J., Ekelund, O., Aarestrup, F.M., Canton, R., Doumith, M., Giske, C., vd. (2017). The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clinical Microbiology and Infection*, *23*(1), 2-22. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.012.

Escobar-Páramo, P., Giudicelli, C., Parsot, C. & Denamur, E. (2003). The evolutionary history of Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli* revised. *Journal of Molecular Evolution*, *57*(2), 140-148. https://doi.org/10.1007/s00239-003-2460-3.

Essack, S.Y. (2001). The development of β-lactam antibiotics in response to the evolution of β-lactamases. *Pharmaceutical Research*, *18*(10), 1391-1399. https://doi.org/10.1023/A:1012272403776.

Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kießling, S., Alt, K., Antáo, E.M., vd. (2007). Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*, *297*(3), 163-176. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.01.003.

Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E. & Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology*, *2*(1), 40-61. https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x

Fam, Nevine, Leflon-Guibout, V., Fouad, S., Aboul-Fadl, L., Marcon, E., Desouky, D., vd. (2011). CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Cairo (Egypt), including isolates of clonal complex ST10 and clones ST131, ST73, and ST405 in both community and hospital settings. *Microbial Drug Resistance*, *17*(1), 67-73.

Fam, N.O.C., Comm, J., Iii, J.J.F., Control, D., Diseases, D. & Bacterial, D. (2015). *Enterobacteriaceae*. https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00222.

Fazly B.B. ., Darvishi F.S., Ahmadi, R. & Khameneh, B. (2021). Deep insights into urinary tract infections and effective natural remedies. *African Journal of Urology*, *27*(1). https://doi.org/10.1186/s12301-020-00111-z.

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., vd. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, *269*(5223), 496-512. https://doi.org/10.1126/science.7542800.

Flores-Mireles, A.L., Walker, J.N., Caparon, M. & Hultgren, S.J. (2015). Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(5), 269-284. https://doi.org/10.1038/nrmicro3432.

Floss, H.G. & Yu, T.W. (2005). Rifamycin - Mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chemical Reviews*, *105*(2), 621-632. https://doi.org/10.1021/cr030112j.

Fluit, A.C., Visser, M.R. & Schmitz, F.J. (2001). Molecular detection of antimicrobial

resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *14*(4), 836-871. https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.836-871.2001

Foster, J.T., Okinaka, R.T., Svensson, R., Shaw, K., De, B.K., Robison, R.A., vd. (2008). Real-time PCR assays of single-nucleotide polymorphisms defining the major *Brucella clades*. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(1), 296-301. https://doi.org/10.1128/JCM.01496-07.

Foxman, B. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-Month*, *49*(2), 53-70. https://doi.org/10.1067/mda.2003.7.

Gad, G.F., Mohamed, H.A. & Ashour, H.M. (2011). Aminoglycoside resistance rates, phenotypes, and mechanisms of gram-negative bacteria from infected patients in upper Egypt. *PLoS ONE*, *6*(2), 1-7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017224.

Gal-mor, O. & Finlay, B.B. (2006). *Microreview Pathogenicity islands : A molecular toolbox for bacterial virulence*. *8*(August), 1707-1719. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00794.x.

Giray, B., Uçar, F.B. & Aydemir, S.Ş. (2012). Characterization of uropathogenic *Escherichia coli* strains obtained from urology outpatient clinic of Ege Medical Faculty in İzmir. *Turkish Journal of Medical Sciences*, *42*(SUPPL.1), 1328-1337. https://doi.org/10.3906/sag-1201-31.

Gomes, D., Bertoldi, I., Spagnuolo, A., Marchi, S., Rosini, R. & Nesta, B. (2010). *Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic Escherichia coli*. *107*(20). https://doi.org/10.1073/pnas.0915077107.

Goodwin, S., McPherson, J.D. & McCombie, W.R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, *17*(6), 333-351. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49

Gould, S.J. (1996). *Life's Grandeur: The Spread of Excellence from Plato to Darwin, Random House.* (1st ed.). https://doi.org/10.4159/harvard.9780674063396.

Guerin, É., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Re, S., vd. (2009). The SOS response controls integron recombination. *Science*, *324*(5930), 1034.

Guyer, D.M., Henderson, I.R., Nataro, J.P. & Mobley, H.L.T. (2000). *Identification of Sat , an autotransporter toxin produced by uropathogenic Escherichia coli*. *38*.

Guyer, D.M., Radulovic, S., Jones, F., Mobley, H.L.T., Guyer, D.M., Radulovic, S., vd. (2002). *Sat , the Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic Escherichia coli , Is a Vacuolating Cytotoxin for Bladder and Kidney Epithelial Cells Sat , the Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic Escherichia coli , Is a Vacuolating Cytotoxin for Bla*. https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4539.

Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I. & Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology*, *23*(6), 1089-1097. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3101672.x.

Heeb, S., Fletcher, M.P., Chhabra, S.R., Diggle, S.P., Williams, P. & Cámara, M. (2011). Quinolones: From antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(2), 247-274. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00247.x.

Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C. & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *68*(4), 692-744. https://doi.org/10.1128/mmbr.68.4.692-744.2004.

Hirai, K. & Mitsuhashi, S. (1992). Mechanisms of resistance to quinolones. In K.-S.L. and R.-T.C. Mihai Mareș, Swee Hua Erin Lim (Ed.), *Progress in Drug Research*, 38, 107-120. https://doi.org/10.5772/intechopen.92577.

Hojabri, Z., Darabi, N., Mirmohammadkhani, M., Rahimi, H., Hemmati, R., Saeedi, Z., vd. (2020). Expansion of a Subset within the C2 Subclade of E*scherichia coli* Sequence Type 131 (ST131) Is Driving the Increasing Rates of Aminoglycoside Resistance. *Open Forum Infectious Diseases*, *7*(11), 1-8.

Holmes, A., Allison, L., Ward, M., Dallman, T.J., Clark, R., Fawkes, A., vd. (2015). Utility of whole-genome sequencing of *Escherichia coli* o157 for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(11), 3565-3573.

Holmes, A.H., Moore, L.S.P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., vd. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, *387*(10014), 176-187.

Hooper, D.C. & Jacoby, G.A. (2015). Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1354*(1), 12-31.

Hooper, D.C. & Jacoby, G.A. (2016). Topoisomerase inhibitors: Fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(9), 1-22.

Hopkins, K.L., Davies, R.H. & Threlfall, E.J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *25*(5), 358-373.

Horner, C., Fawley, W., Morris, K., Parnell, P., Denton, M. & Wilcox, M. (2014). *Escherichia coli* bacteraemia: 2 years of prospective regional surveillance (2010-12). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(1), 59-66.

Huang, Q. & Lew, E. (2018). Epidemiology and risk factors. *Gastric Cardiac Cancer*, 39-49.

Hulscher, M.E.J.L., Grol, R.P.T.M. & Meer, J.W.M. (2010). Antibiotic prescribing in hospitals : A social and behavioural scientific approach. *The Lancet Infectious Disease*, *10*(3), 167-175.

Hutton, T.A., Innes, G.K., Harel, J., Garneau, P., Cucchiara, A., Schifferli, D.M. & Rankin, S.C. (2018). Phylogroup and virulence gene association with clinical characteristics of *Escherichia coli* urinary tract infections from dogs and cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *30*(1), 64-70.

Id, M.G., Clermont, O., Baron, A., Id, B.B., Dion, S., Id, P.B. & Id, E.D. (2020). *Major role of iron uptake systems in the intrinsic extra-intestinal virulence of the genus Escherichia revealed by a genome-wide association study*. 1-19.

Idalia, V.-M.N. & Bernardo, F. (2017). *Escherichia coli* as a Model Organism and Its Application in Biotechnology. *Escherichia Coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*.

Iredell, J., Brown, J. & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and clinical implications. *BMJ*, 352.

Isozumi, R., Yoshimatsu, K., Yamashiro, T., Hasebe, F., Nguyen, B.M., Ngo, T.C., vd. (2012). BlaNDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* from environment, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(8), 1383-1385.

Jackman, S.D., Vandervalk, B.P., Mohamadi, H., Chu, J., Yeo, S., Hammond, S.A., vd. (2017). ABySS 2 . 0 : Resource-efficient assembly of large genomes using a bloom filter effect of bloom filter false positive rate. *Genome Research*, 27, 768-777.

Jacoby, G.A. (2017). *History of Drug-Resistant Microbes*. In: Mayers, D.L. (eds) Antimicrobial Drug Resistance. Infectious Disease. Humana Press.

Jarocki, V.M., Reid, C.J., Chapman, T.A. & Djordjevic, S.P. (2020). *Escherichia coli* ST302: Genomic Analysis of virulence potential and antimicrobial resistance

mediated by mobile genetic elements. *Frontiers in Microbiology,* 10, 1-17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03098

Jaureguy, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., vd. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, 9, 1-14. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-560

Jian, Y. & Li, M. (2021). A narrative review of single-nucleotide polymorphism detection methods and their application in studies of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bio-X Research, 4*(1), 1-9. https://doi.org/10.1097/jbr.0000000000000071

Joensen, K.G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R.S., Nielsen, E.M. & Aarestrup, F. M. (2014). Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology, 52*(5), 1501-1510. https://doi.org/10.1128/JCM.03617-13

Johnson, J.R., Scheutz, F., Ulleryd, P., Kuskowski, M.A., O'Bryan, T.T. & Sandberg, T. (2005). Phylogenetic and pathotypic comparison of concurrent urine and rectal *Escherichia coli* isolates from men with febrile urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology, 43*(8), 3895-3900. https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.3895-3900.2005

Johnson, J.R. & Stell, A.L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *Journal of Infectious Diseases, 181*(1), 261-272. https://doi.org/10.1086/315217

Kaas, R.S., Friis, C., Ussery, D.W. & Aarestrup, F.M. (2012). Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics, 13*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-577

Kai, A., Konishi, N. & Obata, H. (2010). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Nippon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine, 68-6*(1), 203-207. https://doi.org/10.1128/cmr.11.2.403

Kaper, J.B., Nataro, J.P. & Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology, 2*(2), 123-140. https://doi.org/10.1038/nrmicro818

Katz, L. & Ashley, G.W. (2005). Translation and protein synthesis: Macrolides. *Chemical Reviews, 105*(2), 499-527. https://doi.org/10.1021/cr030107f

Kauser, A. (2020). *Resistome Identification from Whole Genome Sequencing Data of Norwegian Isolates. Masters in Applied and Commercial Biotechnology, Inland Norway University of Applied Science*.

Khameneh, B., Diab, R., Ghazvini, K. & Fazly Bazzaz, B.S. (2016). Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microbial Pathogenesis*, 95, 32-42.

Kohanski, M.A., Dwyer, D.J. & Collins, J.J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(6), 423-435. https://doi.org/10.1038/nrmicro2333.

Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A. & Collins, J.J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, *130*(5), 797-810. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049.

Köhler, C. & Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? International Journal of Medical Microbiology, 301, 642-647. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.006.

Kozak, G.K., Pearl, D.L., Parkman, J., Reid-Smith, R.J., Deckert, A. & Boerlin, P. (2009). Distribution of sulfonamide resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from swine and chickens at abattoirs in Ontario and Québec, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(18), 5999-6001. https://doi.org/10.1128/AEM.02844-08.

Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R. & Connolly, L.E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, *6*(6), 1-19.

Kudinha, T. (2016). *The Pathogenesis of Escherichia coli Urinary Tract Infection. Eschrichia coli -Recent Advances on Phsiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. https://www.intechopen.com/chapters/56154.

Kudinha, T., Kong, F., Johnson, J.R., Andrew, S.D., Anderson, P. & Gilbert, G.L. (2012). Multiplex PCR-based reverse line blot assay for simultaneous detection of 22 virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(4), 1198-1202. https://doi.org/10.1128/AEM.06921-11.

Labar, A.S., Millman, J.S., Ruebush, E., Opintan, J.A., Bishar, R.A., Aboderin, A.O., Newman, M.J., Lamikanra, A. & Okeke, I.N. (2012). Regional dissemination of a trimethoprim-resistance gene cassette via a successful transposable element. *PLoS ONE*, *7*(5), 1-10.

Lane, M.C., Alteri, C.J., Smith, S.N. & Mobley, H.L.T. (2007). Expression of flagella

is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(42), 16669-16674. https://doi.org/10.1073/pnas.0607898104.

Lapierre, P. & Gogarten, J.P. (2009). Estimating the size of the bacterial pan-genome. *Trends in Genetics*, *25*(3), 107-110. https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.12.004.

Larsen, M.V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R.L., vd. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(4), 1355-1361. https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11.

Lau, S.H., Kaufmann, M.E., Livermore, D.M., Woodford, N., Willshaw, G.A., Cheasty, T., vd. (2008). UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 β-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *62*(6), 1241-1244. https://doi.org/10.1093/jac/dkn380.

Lauretti, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., & Rossolini, G.M. (1999). Cloning and characterization of bla(VIM), a new integron-borne metallo- β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *43*(7), 1584-1590. https://doi.org/10.1128/aac.43.7.1584.

Laxminarayan, R., Matsoso, P., Pant, S., Brower, C., Røttingen, J.A., Klugman, K. & Davies, S. (2016). Access to effective antimicrobials: A worldwide challenge. *The Lancet*, *387*(10014), 168-175. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00474-2.

Lee, S., Yu, J.K., Park, K., Oh, E.J., Kim, S.Y. & Park, Y.J. (2010). Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with blaCTX-M. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, *40*(4), 361-367.

Lemonnier, M., Landraud, L. & Lemichez, E. (2007). Rho GTPase-activating bacterial toxins: From bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiology Reviews*, *31*(5), 515-534. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00078.x.

Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *12*(5), 371-387. https://doi.org/10.1038/nrd3975.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G. & Durbin, R. (2009). *The Sequence Alignment / Map (SAM) Format and SAMtools 1000 Genome Project Data Processing Subgroup*. 1-2.

Liakopoulos, A., Mevius, D. & Ceccarelli, D. (2016). A review of SHV extended-spectrum β-lactamases: Neglected yet ubiquitous. *Frontiers in Microbiology*, 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01374.

Liebert, M.A., Malpica, R., Sandoval, G.R.P., Rodríguez, C., Franco, B. & Georgellis, D. (2006). *Signaling by the Arc Two-Component System Provides a Link Between the Redox State of the Quinone Pool and Gene Expression*. *8*.

Lima, L.M., Silva, B.N.M. da, Barbosa, G. & Barreiro, E.J. (2020). β-lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 208, 112829. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829.

Liu, W., Zhao, H., Qiu, Z., Jin, M., Yang, D., Xu, Q., Feng, H., Li, J., & Shen, Z. (2020). Identifying geographic origins of the *Escherichia coli* isolates from food by a method based on single-nucleotide polymorphisms. *Journal of Microbiological Methods*, 168, 105807. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105807.

Livermore, D.M. & Woodford, N. (2006). The β-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Trends in Microbiology*, *14*(9), 413-420. https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.07.008.

Llosa, M., Gomis-Rüth, F.X., Coll, M. & De la Cruz, F. (2002). Bacterial conjugation: A two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology*, *45*(1), 1-8. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03014.x

López-Banda, D.A., Carrillo-Casas, E.M., Leyva-Leyva, M., Orozco-Hoyuela, G., Manjarrez-Hernández, Á.H., Arroyo-Escalante, S., vd. (2014). Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *BioMed Research International*, https://doi.org/10.1155/2014/959206.

Lorenz, S.C., Gonzalez-Escalona, N., Kotewicz, M.L., Fischer, M. & Kase, J. A. (2017). Genome sequencing and comparative genomics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145:H25 and O145:H28 reveal distinct evolutionary paths and marked variations in traits associated with virulence & colonization. *BMC Microbiology*, *17*(1), 1-15. https://doi.org/10.1186/s12866-017-1094-3.

Lu, S., Zhang, X., Zhu, Y., Kim, K. S., Yang, J. & Jin, Q. (2011). Complete genome sequence of the neonatal-meningitis-associated *Escherichia coli* Strain CE10. *Journal of Bacteriology*, *193*(24), 100176. https://doi.org/10.1128/JB.06284-11.

Lu, T., Zhao, X., Li, X., Drlica-Wagner, A., Wang, J.Y., Domagala, J. & Drlica, K. (2001). Enhancement of fluoroquinolone activity by C-8 halogen and methoxy

moieties: Action against a gyrase resistance mutant of *Mycobacterium smegmatis* and a gyrase-topoisomerase iv double mutant of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(10), 2703-2709. https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2703-2709.2001.

Ludden, C., Coll, F., Gouliouris, T., Restif, O., Blane, B., Blackwell, G.A., Kumar, N., Naydenova, P., Crawley, C., Brown, N.M., Parkhill, J. & Peacock, S.J. (2021). Defining nosocomial transmission of *Escherichia coli* and antimicrobial resistance genes: a genomic surveillance study. *The Lancet Microbe*, *2*(9), e472-e480. https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00117-8.

Lund, O. (n.d.). *In Silico Genotyping of Escherichia coli Isolates for Sequencing Data*. *ii*.

Lynne, A.M., Foley, S.L. & Nolan, L.K. (2006). Immune response to recombinant *Escherichia coli* Iss protein in poultry. *Avian Diseases*, *50*(2), 273-276.

Machado, D. (2015). *Modeling the contribution of allosteric regulation for flux control in the central carbon metabolism of E. coli*. 1-11. https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00154.

Mahe, A., Sabiu, B., Adam, A.A. & Abdullahi, U.Z. (2021). Effect of citric acid at different pH on the survival of *Escherichia coli*. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, *14*(1), 79-84. https://doi.org/10.4314/bajopas.v14i1.11.

Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., vd. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(6), 3140-3145. https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140.

Mancini, S., Marchesi, M., Imkamp, F., Wagner, K., Keller, P.M., Quiblier, C., Bodendoerfer, E., Courvalin, P. & Böttger, E. C. (2019). Population-based inference of aminoglycoside resistance mechanisms in Escherichia coli. *EBioMedicine*, 46, 184-192. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.020.

Manges, A.R., Johnson, J.R., Foxman, B., O'Bryan, T.T., Fullerton, K.E. & Riley, L.W. (2001). Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *New England Journal of Medicine*, *345*(14), 1007-1013. https://doi.org/10.1056/nejmoa011265.

Marrs, C.F., Zhang, L. & Foxman, B. (2005). *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiology Letters*, *252*(2), 183-190. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.028.

Martínez, J.L. (2019). Mechanisms of action and of resistance to quinolones. *Antibiotic Drug Resistance, 01805*(2), 39-55. https://doi.org/10.1002/9781119282549.ch2

Mashburn-Warren, L.M. & Whiteley, M. (2006). Special delivery: Vesicle trafficking in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, *61*(4), 839-846. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05272.x.

Masignani, V., Medini, D., Donati, C. & Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Curr Opin Genet Dev, 15*(6), 589-594. https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.09.006.

Maslowska, K.H., Makiela-Dzbenska, K. & Fijalkowska, I.J. (2019). The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *60*(4), 368-384. https://doi.org/10.1002/em.22267.

Mavromatis, K., Land, M.L., Brettin, T.S., Quest, D.J., Copeland, A., Clum, A., vd. (2012). The fast changing landscape of sequencing technologies and their impact on microbial genome assemblies and annotation. *PLoS ONE*, *7*(12), 1-6. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048837.

Mccoy, L.S., Xie, Y. & Tor, Y. (2011). Antibiotics that target protein synthesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA, 2*(2), 209-232. https://doi.org/10.1002/wrna.60.

Mediavilla, J.R., Patrawalla, A., Chen, L., Chavda, K.D., Mathema, B., Vinnard, C., Dever, L.L. & Kreiswirth, B.N. (2016). Colistin- and carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring mcr-1 and blaNDM-5, causing a complicated urinary tract infection in a patient from the United States. *MBio*, *7*(4), 5-8. https://doi.org/10.1128/mBio.01191-16.

Medina, M. & Castillo-Pino, E. (2019). An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Therapeutic Advances in Urology*, 11, 3-7. https://doi.org/10.1177/1756287219832172

Meerman, M. & Sciences, B. (2016). *Uropathogenic Escherichia coli : from molecular characteristics to clinical relevance*. *May*, 1-16.

Mehlhorn, H. (2015). Food-Borne Disease Burden Epidemiology Reference Group. *Encyclopedia of Parasitology*, 1-1. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27769-6_3884-1.

Mendelson, M., Røttingen, J.A., Gopinathan, U., Hamer, D.H., Wertheim, H., Basnyat, B., vd. (2016). Maximising access to achieve appropriate human antimicrobial use in low-income and middle-income countries. *The Lancet, 387*(10014), 188-198. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00547-4.

Mihaila, L., Wyplosz, B., Clermont, O., Garry, L., Hipeaux, M. C., Vittecoq, D., Dussaix, E., vd. (2010). Probable intrafamily transmission of a highly virulent CTX-M-3-producing *Escherichia coli* belonging to the emerging phylogenetic subgroup D2 O102-ST405 clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*(7), 1537-1539. https://doi.org/10.1093/jac/dkq155.

Moreno, E., Andreu, A., Pérez, T., Sabaté, M., Johnson, J.R. & Prats, G. (2006). Relationship between *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in women and the dominant faecal flora of the same hosts. *Epidemiology and Infection*, *134*(5), 1015-1023. https://doi.org/10.1017/S0950268806005917.

Moriel, D.G., Bertoldi, I., Spagnuolo, A., Marchi, S., Rosini, R., Nesta, B., vd. (2010). Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(20), 9072-9077. https://doi.org/10.1073/pnas.0915077107.

Mukerji, S., O'Dea, M., Barton, M., Kirkwood, R., Lee, T. & Abraham, S. (2017). Development and transmission of antimicrobial resistance among Gram-negative bacteria in animals and their public health impact. *Essays in Biochemistry*, *61*(1), 23-35. https://doi.org/10.1042/EBC20160055.

Mulvey, M.A. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, *4*(5), 257-271. https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00193.x.

Navjot, Lapierre, P., Quinlan, T.M., Halse, T.A., Wirth, S., Dickinson, M.C., Lasek-nesselquist, E. & Musser, A. (2019). *Crossm Toxin-Producing Escherichia coli : an Advanced Molecular Outbreak Tracking*, *March*, 1-11.

Nazik, H., Bektöre, B., Öngen, B., Ilktaç, M., Özyurt, M., Kuvat, N., Baylan, O., Keküllüoğlu, H., Haznedaroğlu, T. & Keleşoğlu, F. M. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* urinary isolates from two teaching hospitals in Turkey: Coexistence of TEM, SHV, CTX-M and VEB-1 type β-lactamases. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *10*(3), 325-333. https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i3.9.

Nederbragt, L. (2016). Developments in NGS. Figshare, Dataset, https://doi.org/10.6084/m9.figshare. 100940.v9.

Nemeth, J., Oesch, G. & Kuster, S.P. (2015). Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(2), 382-395. https://doi.org/10.1093/jac/dku379.

Nicolas-Chanoine, M.H., Bertrand, X. & Madec, J.Y. (2014). Escherichia coli st131,

an intriguing clonal group. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(3), 543-574. https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13.

Nicolas-Chanoine, M.H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M.P., Caniça, M.M., Park, Y.J., Lavigne, J.P., Pitout, J. & Johnson, J.R. (2008). Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *61*(2), 273-281. https://doi.org/10.1093/jac/dkm464.

Odoki, M., Aliero, A.A., Tibyangye, J., Nyabayo M.J., Wampande, E., Kato, C.D., Agwu, E. & Bazira, J. (2019). Prevalence of bacterial urinary tract infections and associated factors among patients attending hospitals in Bushenyi District, Uganda. *International Journal of Microbiology*, https://doi.org/10.1155/2019/4246780.

Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, A., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., vd. (2009). Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(42), 17939-17944. https://doi.org/10.1073/pnas.0903585106.

Ojdana, D., Sieńko, A., Sacha, P., Majewski, P., Wieczorek, P., Wieczorek, A. & Tryniszewska, E. (2018). Genetic basis of enzymatic resistance of *E. coli* to aminoglycosides. *Advances in Medical Sciences*, *63*(1), 9-13. https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.004.

Olowe, O., Ojo-Johnson, B., Makanjuola, O., Olowe, R. & Mabayoje, V. (2015). Detection of bacteriuria among human immunodeficiency virus seropositive individuals in Osogbo, south-western Nigeria. *European Journal of Microbiology and Immunology*, *5*(1), 126-130. https://doi.org/10.1556/eujmi-d-14-00036.

Olson, N.D., Lund, S.P., Colman, R.E., Foster, J.T., Sahl, J.W., Schupp, J.M., Keim, P., Morrow, J.B., Salit, M.L. & Zook, J.M. (2015). Best practices for evaluating single nucleotide variant calling methods for microbial genomics. *Frontiers in Genetics*, 6, 1-15. https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00235.

Oluwaseun, O., Singleton, I. & Sant, A.S. (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during fi eld cultivation : A review. *Food Microbiology*, 73, 177-208. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.003.

Ondov, B.D., Treangen, T.J., Melsted, P., Mallonee, A.B., Bergman, N.H., Koren, S. & Phillippy, A.M. (2016). Mash: Fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biology*, *17*(1), 1-14. https://doi.org/10.1186/s13059-016-0997-x.

OneHealthTrust. ResistanceMap: Antibiotic resistance (2022). OneHealthTrust. ResistanceMap: Antibiotic Resistance. https://resistancemap.onehealthtrust.org/CountryPage.php?countryId=44&country=Turkey.

Oppegaard, H., Steinum, T.M. & Wasteson, Y. (2001). Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(8), 3732-3734. https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3732-3734.2001.

Orskov, F. & Orskov, I. (1983). From the national institutes of health. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the Enterobacteriaceae and other bacteria. *The Journal of Infectious Diseases, 148*(2), 346-357. https://doi.org/10.1093/infdis/148.2.346.

Ozgunes, I., Erben, N., Kiremitci, A., Kartal, E.D., Durmaz, G., Colak, H., Usluer, G., & Colak, E. (2006). The prevalence of extended-spectrum beta lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in clinical isolates and risk factors. *Saudi Medical Journal*, *27*(5), 608-612.

Paetzel, M., Danel, F., De Castro, L., Mosimann, S.C., Page, M.G.P. & Strynadka, N.C.J. (2000). Crystal structure of the class D β-lactamase OXA-10. *Nature Structural Biology, 7*(10), 918-925. https://doi.org/10.1038/79688.

Pagès, J.M., James, C.E. & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(12), 893-903. https://doi.org/10.1038/nrmicro1994.

Pakbin, B., Brück, W.M. & Rossen, J.W.A. (2021). Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(18). https://doi.org/10.3390/ijms22189922.

Pallen, M.J. (2020). Microbial bioinformatics 2020. *Microbial Biotechnology, 9*(5), 681-686. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12389.

Palmer, C., Bik, E.M., Digiulio, D.B., Relman, D.A. & Brown, P.O. (2007). *Development of the Human Infant Intestinal Microbiota*. *5*(7). https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177.

Palzkill, T. (2013). Metallo-β-lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1277*(1), 91-104. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x.

Pape, T., Wintermeyer, W. & Rodnina, M.V. (2000). Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome.

Nature Structural Biology, *7*(2), 104-107. https://doi.org/10.1038/72364.

Parsons, B.D., Zelyas, N., Berenger, B.M. & Chui, L. (2016). Detection, characterization, and typing of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00478.

Patel, U., Yan, Y.P., Hobbs, F.W., Kaczmarczyk, J., Slee, A.M., Pompliano, D.L., Kurilla, M.G. & Bobkova, E.V. (2001). Oxazolidinones Mechanism of Action: Inhibition of the First Peptide Bond Formation. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(40), 37199-37205. https://doi.org/10.1074/jbc.M102966200.

Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J. & Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection? *Infection and Immunity*, *67*(2), 546-553. https://doi.org/10.1128/iai.67.2.546-553.1999.

Pightling, A.W., Pettengill, J.B., Luo, Y., Baugher, J.D., Rand, H. & Strain, E. (2018). Interpreting whole-genome sequence analyses of foodborne bacteria for regulatory applications and outbreak investigations. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01482.

Pioletti, M., Schlünzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Glühmann, M., Avila, H., vd. (2001). Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO Journal*, *20*(8), 1829-1839. https://doi.org/10.1093/emboj/20.8.1829.

Pitout, J.D.D. & DeVinney, R. (2017). *Escherichia coli* ST131: A multidrug-resistant clone primed for global domination. *F1000Research*, *6*(0), 1-7. https://doi.org/10.12688/f1000research.10609.1.

Platell, J.L., Cobbold, R.N., Johnson, J.R. & Trott, D.J. (2010). Clonal group distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* among humans and companion animals in Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*(9), 1936-1938. https://doi.org/10.1093/jac/dkq236.

Poirel, L., Madec, J., Lupo, A., Schink, A., Kieffer, N., Nordmann, P. & Schwarz, S. (2018). *Antimicrobial Resistance in Escherichia coli*. 1-27. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.Correspondence.

Pollini, S., Maradei, S., Pecile, P., Olivo, G., Luzzaro, F., Docquier, J.D. & Rossolini, G.M. (2013). FIM-1, a new acquired metallo-β-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(1), 410-416. https://doi.org/10.1128/AAC.01953-12.

Price, T.K., Mehrtash, A., Kalesinskas, L., Malki, K., Hilt, E.E., Putonti, C. & Wolfe,

A.J. (2016). Genome sequences and annotation of two urinary isolates of *E. coli*. *Standards in Genomic Sciences*, *11*(1), 1-8. https://doi.org/10.1186/s40793-016-0202-6.

Puzari, M. & Chetia, P. (2017). RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: a major issue worldwide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, https://doi.org/10.1007/s11274-016-2190-5.

Russo, T.A. & Johnson J.R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect Inst Pasteur*, 5, 449-56.

Quail, M.A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., vd. (2012). A tale of three NGS sequencing platforms. *BMC Genomics*, *13*(341), 13.

Quainoo, S., Coolen, J.P.M., Sacha A.F. . van Hijum, C., Martijn A. Huynen, W.J.G.M., Willem van Schaik, E. & Wertheim, H.F.L. (2017). Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens : the Future of Nosocomial. *Clinical Microbiology Reviews*, *30*(4), 1015-1064.

Ramirez, M.S. & Tolmasky, M.E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, *13*(6), 151-171. https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003.

Rantsiou, K., Kathariou, S., Winkler, A., Skandamis, P., Saint-Cyr, M.J., Rouzeau-Szynalski, K., vd. (2018). Next generation microbiological risk assessment: opportunities of whole genome sequencing (WGS) for foodborne pathogen surveillance, source tracking and risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 287, 3-9. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.007.

Rashki, A. (2014). Cervico-vaginopathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Microbial Pathogenesis*, 75, 29-34. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.08.004.

Rasko, D.A., Phillips, J.A., Li, X. & Mobley, H.L.T. (2001). Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: Probes specific for uropathogenic populations. *Journal of Infectious Diseases*, *184*(8), 1041-1049. https://doi.org/10.1086/323602.

Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2010). MEROPS : the peptidase database. *Nuclei Aids Res*, 38, 227-233. https://doi.org/10.1093/nar/gkp971.

Restieri, C., Garriss, G., Locas, M.C. & Dozois, C.M. (2007). Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Applied and Environmental Microbiology*,

73(5), 1553-1562. https://doi.org/10.1128/AEM.01542-06.

Riley, L.W. (2014). Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*(5), 380-390. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12646.

Roberts, M.C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, *245*(2), 195-203. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.034.

Rode, C.K., Melkerson-Watson, L.J., Johnson, A.T. & Bloch, C.A. (1999). Type-specific contributions to chromosome size differences in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 67(1), 230-236. https://doi.org/10.1128/iai.67.1.230-236.1999.

Romeo, T., Vakulskas, C.A. & Babitzke, P. (2013). Post-transcriptional regulation on a global scale : form and function of Csr/Rsm systems. *Environmenet Microbiology*, *15*(2), 313-324. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02794.x.

Rousset, F., Cabezas-Caballero, J., Piastra-Facon, F., Fernández-Rodríguez, J., Clermont, O., Denamur, E., vd. (2021). The impact of genetic diversity on gene essentiality within the Escherichia coli species. *Nature Microbiology*, *6*(3), 301-312. https://doi.org/10.1038/s41564-020-00839-y.

Rubinstein, E. (2001). History of quinolones and their side effects. *Chemotherapy*, *47*(SUPPL. 3), 3-8. https://doi.org/10.1159/000057838.

Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *51*(5), 1109-1117. https://doi.org/10.1093/jac/dkg222.

Russell, A.D. (2003). Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *52*(5), 750-763. https://doi.org/10.1093/jac/dkg422.

Sahoo, B.M. & Banik, B.K. (2020). Therapeutic Potentials of β-Lactam. In *Synthetic Approaches to Nonaromatic Nitrogen Heterocycles* (Issue October). https://doi.org/10.1002/9781119708841.ch4.

Sannes, M.R., Kuskowski, M.A., Owens, K., Gajewski, A. & Johnson, J.R. (2004). Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *Journal of Infectious Diseases*, 190(12), 2121-2128. https://doi.org/10.1086/425984.

Sass, P. (2017). Antibiotics: Precious goods in changing times. *Methods in Molecular Biology*, 1520, 3-22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9_1.

Sauvage, E. & Terrak, M. (2016). Glycosyltransferases and transpeptidases/penicillin-binding proteins: Valuable targets for new antibacterials. *Antibiotics*, *5*(1), 1-27. https://doi.org/10.3390/antibiotics5010012.

Schneider, T., & Sahl, H. G. (2010). An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(2-3), 161-169. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.10.005.

Selwyn, S. (1979). Pioneer work on the "penicillin phenomenon", 1870-1876. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *5*(3), 249-255. https://doi.org/10.1093/jac/5.3.249.

Service, R.F. (2006). The race for the $1000 genome. *Science, 311*(5767), 1544-1546. https://doi.org/10.1126/science.311.5767.1544.

Servin, A.L. (2005). Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, *18*(2), 264-292. https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.264-292.2005.

Shah, C., Baral, R., Bartaula, B. & Shrestha, L.B. (2019). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbiology*, *19*(1), 204. https://doi.org/10.1186/s12866-019-1587-3.

Shaik, S., Ranjan, A., Tiwari, S.K., Hussain, A., Nandanwar, N., Kumar, N., vd. (2017). Comparative genomic analysis of globally dominant ST131 clone with other epidemiologically successful. *MBio*, *8*(5), 1-15. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29066550%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5654935.

Sharma, S., Kaur, N., Malhotra, S., Madan, P., Ahmad, W. & Hans, C. (2016). Serotyping and antimicrobial susceptibility pattern of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in pediatric population in a tertiary care hospital. *Journal of Pathogens*, 2016, 1-4. https://doi.org/10.1155/2016/2548517.

Sheerin, N.S. & Glover, E.K. (2019). Urinary tract infection. *Medicine (United Kingdom)*, *47*(9), 546-550. https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.06.008.

Shields, R.K., Zhou, Y., Kanakamedala, H. & Cai, B. (2021). Burden of illness in US hospitals due to carbapenem-resistant Gram-negative urinary tract infections in patients with or without bacteraemia. *BMC Infectious Diseases*, *21*(1), 1-12. https://doi.org/10.1186/s12879-021-06229-x.

Sirot, D. (1995). Extended-spectrum plasmid-mediated β-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36, 19-34. https://doi.org/10.1093/jac/36.suppl_A.19.

Siyao, G. (2020). *Whole genome sequencing analysis of antimicrobial resistant Escherichia coli : from food to human*. https://hdl.handle.net/10356/145480.

Skočková, A., Cupáková, Š., Karpíšková, R. & Janštová, B. (2012). Detection of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* from raw cow's milk. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *1*(Special Issue), 777-784.

Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, *3*(3), 155-160. https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146.

Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Claeys, G., vd. (2010). Characterization of extended-spectrum β-lactamases produced by *Escherichia coli* isolated from hospitalized and nonhospitalized patients: Emergence of CTX-M-15-producing strains causing urinary tract infections. *Microbial Drug Resistance*, *16*(2), 129-134. https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0132.

Smith, K.D. (2007). Iron metabolism at the host pathogen interface: Lipocalin 2 and the pathogen-associated iroA gene cluster. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *39*(10), 1776-1780. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.003.

Snyder, J.A., Haugen, B.J., Lockatell, C.V., Maroncle, N., Hagan, E.C., Johnson, D.E., Welch, R.A. & Mobley, H.L.T. (2005). Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, *73*(11), 7588-7596. https://doi.org/10.1128/IAI.73.11.7588-7596.2005.

Snyder, J.A., Lloyd, A.L., Lockatell, C.V., Johnson, D.E. & Mobley, H.L.T. (2006). Role of phase variation of type 1 fimbriae in a uropathogenic *Escherichia coli* cystitis isolate during urinary tract infection. *Infection and Immunity*, *74*(2), 1387-1393. https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.1387-1393.2006.

Sohmen, D., Harms, J.M., Schlünzen, F., Wilson, D.N., Sohmen, D., Harms, J.M., Schlünzen, F. & Wilson, D. N. (2009). *SnapShot : Antibiotic Inhibition of Protein Synthesis II SnapShot : Antibiotic Inhibition of Protein Synthesis II*. 9-10. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.009.

Solberg, O.D., Ajiboye, R.M. & Riley, L.W. (2006). Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(4), 1347-1351. https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1347-1351.2006.

Sorlozano, A., Gutierrez, J., Jimenez, A., Luna, J.D.D. & Martínez, J.L. (2007). Contribution of a new mutation in parE to quinolone resistance in extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology, 45*(8), 2740-2742. https://doi.org/10.1128/JCM.01093-07.

Speer, B.S., Shoemaker, N.B. & Salyers, A.A. (1992). Bacterial resistance to tetracycline: Mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews, 5*(4), 387-399. https://doi.org/10.1128/CMR.5.4.387.

Spurbeck, R.R., Dinh, P.C., Walk, S.T., Stapleton, A.E., Hooton, T.M., Nolan, L.K., vd. (2012). *Escherichia coli* isolates that carry vat, fyua, chua, and yfcv efficiently colonize the urinary tract. *Infection and Immunity*, *80*(12), 4115-4122. https://doi.org/10.1128/IAI.00752-12.

Stamm, W.E. & Norrby, S.R. (2001). Urinary tract infections: Disease panorama and challenges. *Journal of Infectious Diseases*, *183*, S1-S4. https://doi.org/10.1086/318850.

Stokes, H.W. & Gillings, M.R. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiology Reviews, 35*(5), 790-819. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x.

Stokstad, E.L. & Jukes, T.H. (1987). Sulfonamides and folic acid antagonists: A historical review. *The Journal of Nutrition*, *117*(7), 1335-1341. https://doi.org/10.1093/jn/117.7.1335.

Strachan, N.J.C., Rotariu, O., Lopes, B., Macrae, M., Fairley, S., Laing, C., Gannon, V., vd. (2015). Whole Genome Sequencing demonstrates that Geographic Variation of *Escherichia coli* O157 Genotypes Dominates Host Association. *Scientific Reports*, 5, 1-10. https://doi.org/10.1038/srep14145.

Subashchandrabose, S. & Mobley, H.L.T. (2015). host - pathogen interface during urinary tract infection. *Metallomics*. https://doi.org/10.1039/C4MT00329B.

Sugumar, M., Kumar, K.M., Manoharan, A., Anbarasu, A. & Ramaiah, S. (2014). Detection of OXA-1 β-lactamase gene of Klebsiella pneumoniae from blood stream infections (BSI) by conventional PCR and in-silico analysis to understand the mechanism of OXA mediated resistance. *PLoS ONE, 9*(3), 1-8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091800.

Suzuki, S. & Hoa, P.T.P. (2012). Distribution of quinolones, sulfonamides, tetracyclines in aquatic environment and antibiotic resistance in Indochina. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00067.

Tchesnokova, V., Avagyan, H., Billig, M., Chattopadhyay, S., Aprikian, P., Chan, D., vd. (2016). A Novel 7-single nucleotide polymorphism-based clonotyping test allows rapid prediction of antimicrobial susceptibility of extraintestinal *Escherichia coli* directly from urine specimens. *Open Forum Infectious Diseases*, *3*(1), 1-7. https://doi.org/10.1093/ofid/ofw002.

Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. & Denamur, E. (2010a). The population genetics of commensal *Escherichia coli. Nature Reviews Microbiology*, *8*(3), 207-217. https://doi.org/10.1038/nrmicro2298.

Tenson, T., Lovmar, M. & Ehrenberg, M. (2003). The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *Journal of Molecular Biology*, *330*(5), 1005-1014. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00662-4.

Terlizzi, M.E., Gribaudo, G. & Maffei, M.E. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: Virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in Microbiology*, 8, https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566.

Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics : TIG*, *30*(9), 418-426. https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001

Thomson, K.S. (2010). Extended-spectrum-β-lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(4), 1019-1025. https://doi.org/10.1128/JCM.00219-10.

Toleman, M.A., Simm, A.M., Murphy, T.A., Gales, A.C., Biedenbach, D.J., Jones, R. N. & Walsh, T.R. (2002). Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *50*(5), 673-679. https://doi.org/10.1093/jac/dkf210.

Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., vd. (2009). Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genetics*, *5*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000344.

Uelze, L., Grützke, J., Borowiak, M., Hammerl, J.A., Juraschek, K., Deneke, C., Tausch, S.H. & Malorny, B. (2020). Typing methods based on whole genome sequencing data. *One Health Outlook*, *2*(1), 1-19. https://doi.org/10.1186/s42522-020-0010-1.

URL-1. Resistance status of E.coli bacteria in Turkey. https://bio.tools/virulencefinder Erişim tarihi: 20 Şubat 2023.

Van Belkum, A. (2007). Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *49*(1), 22-27. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00173.x.

Vannuffel, P. & Cocito, C. (1996). Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs*, *51*(1), 20-30. https://doi.org/10.2165/00003495-199600511-00006.

Vázquez-López, R., Rojas, O.R., Moreno, A.I., Favila, J.E.U., Barreto, A.P., Ortuño, G.L.O., vd. (2019). Antibiotic-resistant septicemia in pediatric oncology patients associated with post-therapeutic neutropenic fever. *Antibiotics*, *8*(3). https://doi.org/10.3390/antibiotics8030106.

Verraes, C., Boxstael, S.V., Meervenne, E.V. & Coillie, E.V. (2013). Antimicrobial Resistance in the Food Chain : A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, *10*(7), 2643-2669. https://doi.org/10.3390/ijerph10072643.

Vincent, A.T., Derome, N., Boyle, B., Culley, A.I. & Charette, S.J. (2017). Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *Journal of Microbiological Methods*, 138, 60-71. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.02.016.

Vosti, K.L. (2007). A prospective, longitudinal study of the behavior of serologically classified isolates of Escherichia coli in women with recurrent urinary tract infections. *Journal of Infection*, *55*(1), 8-18. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2007.01.006.

Walther-rasmussen, J. & Høiby, N. (2007). Class A carbapenemases. *J. Antimicrob Chemother*, *60*(3), 470-482. https://doi.org/10.1093/jac/dkm226.

Weichhart, T., Haidinger, M., Hörl, W.H. & Säemann, M. D. (2008). Current concepts of molecular defence mechanisms. *Eur. J. Clin. Onvest.*, *38*(2), 29-38. https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2008.02006.x.

WHO (2014). Global Report on Surveillance 2014. *WHO 2014 AMR Report*, 1-8. http://www.who.int/drugresistance/documents/AMR_report_Web_slide_set.pdf.

Wiles, T.J., Kulesus, R.R. & Mulvey, M.A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, *85*(1), 11-19. https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.03.007.

Wilke, M.S., Lovering, A.L. & Strynadka, N.C.J. (n.d.). β-Lactam antibiotic resistance : A current structural perspective. https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.08.016.

Wilks, A. & Heinzl, G. (2014). Heme oxygenation and the widening paradigm of heme degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 544, 87-95. https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.013.

Winkler, J.D., Halweg-Edwards, A.L., Erickson, K.E., Choudhury, A., Pines, G. & Gill, R.T. (2016). The Resistome: A comprehensive database of *Escherichia coli* resistance phenotypes. *ACS Synthetic Biology*, *5*(12), 1566-1577. https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00150.

Wood, D.E., Lu, J. & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, *20*(1), 1-13. https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0.

Woodford, N., Turton, J.F. & Livermore, D.M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(5), 736-755. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x.

Wu, S., Dalsgaard, A., Hammerum, A.M., Porsbo, L.J. & Jensen, L.B. (2010). Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *52(*1), 1-7. https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-47.

Xu, Z., Li, L., Shirtliff, M.E., Peters, B.M., Li, B., Peng, Y., Alam, M.J., Yamasaki, S. & Shi, L. (2011). Resistance class 1 integron in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in southern China, 2001-2006. *Clinical Microbiology and Infection*, *17*(5), 714-718. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03379.x.

Yamamoto, S. (2007). Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *13*(2), 68-73. https://doi.org/10.1007/s10156-007-0506-y.

Young, H.K. & Amyes, S.G.B. (1986). A new mechanism of plasmid trimethoprim resistance. Characterization of an inducible dihydrofolate reductase. *Journal of Biological Chemistry*, *261*(6), 2503-2505. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)35813-1.

Yu, D., Banting, G. & Neumann, N.F. (2021). A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, *67*(8), 553-571. https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0508.

Zhang, R., Gu, D.X., Huang, Y.L., Chan, E.W.C., Chen, G.X. & Chen, S. (2016). Comparative genetic characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli*

strains recovered from clinical and non-clinical settings. *Scientific Reports*, 6, 1-9. https://doi.org/10.1038/srep24321.

Zhao, Q., Shen, Y., Chen, G., Luo, Y., Cui, S. & Tian, Y. (2021). Prevalence and Molecular Characterization of Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* in Healthy Children. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 1-8. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.743390.

Zlatkov, N. (2019). *Regulatory Mechanisms Involved in the Pathoadaptation of Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*.

Yánez, F., Sevillano, G., Ortega-Paredes, D. & Paz y Miño, A. (2020). Ready-to-eat street food: a potential source for dissemination of multidrug-resistant *Escherichia coli* epidemic clones in Quito, Ecuador. *Letters in Applied Microbiology*, *70*(3), 203-209. https://doi.org/10.1111/lam.13263.

Zurita, J., Solís, M.B., Ortega-Paredes, D., Barba, P., Paz y Miño, A. & Sevillano, G. (2019). High prevalence of B2-ST131 clonal group among extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from bloodstream infections in Quito, Ecuador. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 19, 216-221. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.04.019.