

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**EKSTRAİNTESTİNAL ENFEKSİYONLARDAN İZOLE EDİLEN  
*ESCHERİCHİA COLİ* (EXPEC) SUŞLARINDA CYTOTOXİC  
NECROTİZİNG FACTOR (CNF1, CNF2, CNF3) VE CYTOLETHAL  
DİSTENDING TOXİN (CDT1, CDT2, CDT3, CDT4) DAĞILIMI VE  
FİLOGENETİK İLİŞKİLERİNİN PFGE İLE TESPİTİ**

**Cansu ÖNLEN GÜNERİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI  
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

**ADANA-2017**

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**EKSTRAİNTESTİNAL ENFEKSİYONLARDAN İZOLE EDİLEN  
*ESCHERİCHİA COLİ* (EXPEC) SUŞLARINDA CYTOTOXİC  
NECROTİZİNG FACTOR (CNF1, CNF2, CNF3) VE CYTOLETHAL  
DİSTENDING TOXİN (CDT1, CDT2, CDT3, CDT4) DAĞILIMI VE  
FİLOGENETİK İLİŞKİLERİNİN PFGE İLE TESPİTİ**

**Cansu ÖNLEN GÜNERİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI  
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-  
2015-3303 nolu proje olarak desteklenmiştir.

**Tez no:.....  
ADANA-2017**

## KABUL VE ONAY

**Tıbbi Mikrobiyoloji** Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan  
“Ekstraintestinal Enfeksiyonlardan İzole Edilen Escherichia Coli (ExPEC) Suşlarında  
Cytotoxic Necrotizing Factor (CNF-1, CNF-2, CNF-3) ve Cytolethal Distending Toxin (CDT-  
1, CDT-2, CDT-3, CDT4) Dağılımı ve Filogenetik İlişkilerinin PFGE ile Tespiti”  
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tarihi:** 21 / 02 / 2017

### TEZ SINAV JÜRİSİ

  
Prof. Dr. Fatih Köksal  
Çukurova Üniversitesi  
**Başkan**

  
Prof. Dr. Fügen Yarkın  
Çukurova Üniversitesi  
**Üye**

  
Prof. Dr. Gönül Aslan  
Ege Üniversitesi  
**Üye**

  
Prof. Dr. Gülnur Tarhan  
Mersin Üniversitesi  
**Üye**

  
Yrd. Doç. Dr. Toğrul Naçiyev  
Adıyaman Üniversitesi  
**Üye**

Dr.  
Üniversitesi  
**Üye**

Dr.  
Üniversitesi  
**Üye**

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve  
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

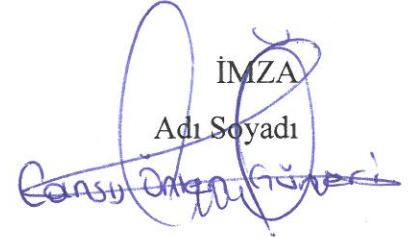
Prof. Dr. Behice DURGUN  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

**T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI**  
**ETİK BEYANI**

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi beyan ederim. .... / ..... / 20....

İMZA  
Adı Soyadı  


Kayıtlı olunan Program : Doktora  
Tezin Konusu : Ekstraintestinal Enfeksiyonlardan İzole Edilen *Escherichia coli* (ExPEC) Suşlarında Cytotoxic Necrotizing Factors (CNF1,CNF2, CNF3) ve Cytolethal Distending Toxins (CDT1, CDT2, CDT3, CDT4) Dağılımı ve Filogenetik ilişkilerinin PFGE ile Tespiti

Tezin Türü : Yüksek Lisans :  Doktora:

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Fatih KÖKSAL  
Danışmanın İletişim Bilgileri  
Telefon : 0322 3386060  
E-Posta : fkoksal@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri  
Telefon : 05073193157  
E-Posta : cansuonlen@gmail.com  
Adresi : Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

\*Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve destek olan ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı ve değerli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**'a,

Doktora eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen değerli hocalarım **Prof. Dr. Fügen YARKIN**, **Prof. Dr. Akgün YAMAN**, **Prof. Dr. Macit İLKİT**, **Yrd. Doç. Dr. Toğrul NAĞİYEV** ve **Yrd. Doç. Dr. Tülin GÜVEN GÖKMEN**'e,

Tez çalışmam süresince desteklerini her daim hissettiğim değerli arkadaşlarım **Suna KIZILYILDIRIM**, **Başak BEDİR** ve **Tülay KANDEMİR**'e,

Her konudaki destek ve katkılarından dolayı bölüm sekreterimiz **Suna GÖKMEN**'e

Hayatımın her anında yalnız olmadığımı hissettiren annem **Nihal ÖNLEN**'e, babam **Yusuf ÖNLEN**'e, canım kardeşim **Şevval Sude ÖNLEN**'e ve sevgili eşim **Mehmet Nadir GÜNERİ**'ye sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Cansu ÖNLEN GÜNERİ

# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL ve ONAY</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>TABLOLAR DİZİNİ</b> .....	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ÖZET</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1.GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Escherichia coli .....	3
2.1.1. Ekstraintestinal patojenik <i>Escherichia coli</i> (ExPEC) .....	5
2.1.2. ExPEC'in virülans faktörleri .....	7
2.1.2.1. Polisakkarit kılıf .....	9
2.1.2.2. Aderans .....	9
2.1.2.3. Fimbrial Adezinler .....	10
2.1.2.4. Afimbrial Adezinler .....	11
2.1.2.5. Motilite .....	11
2.1.2.6. Serum dirençli proteinler .....	11
2.1.2.7. Proteazlar .....	12
2.1.2.8. Sidereforlar .....	12
2.1.2.9. Toksinler .....	13
2.1.3. Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs) .....	14
2.1.3.1. CNF Etki Şekli .....	16
2.1.3.2. Yapı-Fonksiyon İlişkisi .....	19
2.1.3.3. CNFs'nin Hücresel Alımı .....	20
2.1.3.4. CNF'nin Hücresel Atılımı .....	22
2.1.4. Cytolethal Distending Toxins (CDTs) .....	23
2.1.4.1. CDT yapısı ve enzimatik aktivitesi .....	25

2.1.4.2. CDT sentezi ve sekresyonu .....	27
2.1.4.3. İnternalizasyon .....	28
2.1.5. Tedavi .....	30
2.1.6. Korunma ve Kontrol .....	31
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEMLER .....</b>	<b>32</b>
3.1. Test Suşlarının; Klinik Materyale Göre Dağılımı .....	32
3.2. Test Suşlarının Çoğaltılması, Fenotipik ve Genotipik Özelliklerine Göre Identifikasyonu.....	33
3.3. Çalışmaya Dahil Edilen ExPEC suşları ve Virülans Genlerinin Tespiti .....	34
3.3.1. PCR Bazlı çalışmalar için DNA Ekstraksiyon ve Amplifikasyon işlemlerinde kullanılan kimyasal solüsyonlar ve Enzimler .....	34
3.3.2. Genotipik identifikasyon .....	35
3.3.2.1. DNA ekstraksiyonu .....	35
3.3.2.2. PCR Yöntemi ile Beta-D-Glukorinidaz Enzim Aktivitesi ile CDT ve CNF Toksin Genlerinin Belirlenmesi .....	36
3.4. Klonal ilişkinin <i>XbaI</i> -PFGE ile araştırılması .....	39
3.4.1. <i>XbaI</i> -PFGE Protokolü .....	39
3.4.1.1. İzolatların hazırlanması .....	40
3.4.1.2. İzolatların agaroz gömülmesi .....	40
3.4.1.3. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması .....	41
3.4.1.4. Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması.....	41
3.4.1.5 Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi:.....	41
3.4.1.6. Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi .....	42
3.4.1.7. Sonucun analizi .....	44
3.4.1.8. PFGE Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar.....	44
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>46</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>58</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER .....</b>	<b>67</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>68</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>85</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 2.1.	Diyarejenik <i>E. coli</i> 'nin patojenik mekanizmaları.....5
Şekil 2.2.	Klinik kaynakla ilişkili ExPEC virülans genlerinin filogenetik dağılımı .....7
Şekil 2.3.	Bakteriyel patojenite ile ilgili özellikleri vurgulayan, konakçı doku ile etkileşime giren bir <i>E. coli</i> hücresinin şematik gösterimi. ....8
Şekil 2.4.	CNFs tarafından Rho GTPaz'ların aktivasyonu .....18
Şekil 2.5.	CNF1 katalitik domainin yapısı .....19
Şekil 2.6.	CNF1'in hücresel alınımı .....22
Şekil 2.7.	CDT operon.....25
Şekil 2.8.	CDT protein yapısı .....26
Şekil 2.9.	<i>E. coli</i> 'de Cdt sentezi ve sekresyon modeli .....28
Şekil 2.10.	Memeli hücrelerinde Cdt toksikasyonunun mekanik modeli ve benzersiz özellikleri .....30
Şekil 3.1.	<i>E. coli</i> 'nin EMB agarda metalik refle vermesi ve IMVIC testi ile fenotipik olarak doğrulanması .....33
Şekil 3.2.	120 bp'lik <i>uidA</i> gen bölgesine ait bant profilini gösteren jel görüntüsü.....34
Şekil 3.3:	<i>E. coli</i> suşunun filogenetik grubunu belirlemek için ikili karar ağacı .....39
Şekil 4.1.	1111 bp'lik <i>cnf1</i> , 1240 bp'lik <i>cnf2</i> , 757 bp'lik <i>cnf3</i> kodlayan gen bölgesine ait bant profilini gösteren jel görüntüsü .....47
Şekil 4.2.	Sırasıyla <i>cdt1</i> , <i>cdt2</i> , <i>cdt3</i> , <i>cdt4</i> genlerini kodlayan gen bölgesine ait bant profilini gösteren jel görüntüleri.....48
Şekil 4.3.	PFGE Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri.....55
Şekil 4.4.	PFGE Sonucu Elde Edilen Dendogram.....56
Şekil 4.5.	Virülans genotiplendirmesinin kümelenmesi .....57



## TABLolar DİZİNİ

<b><u>Tablo No:</u></b>	<b><u>Sayfa No:</u></b>
<b>Tablo 3.1.</b> Toplum ve hastane kaynaklı ExPEC dağılımı.....	32
<b>Tablo 3.2.</b> ExPEC suşlarının klinik materyale göre dağılımı .....	33
<b>Tablo 3.3.</b> Agaroz Kalıplarda Kullanılan Enzim Tampon-Su Oranı .....	42
<b>Tablo 3.4.</b> Agaroz Kalıplarda Kullanılan Enzim, Enzim Tamponu ve Su Oranı.....	42
<b>Tablo 3.5.</b> Elektroforez Şartları .....	43
<b>Tablo 4.1.</b> İzole edilen tüm ExPEC suşlarındaki CDT ve CNF Toksin Genlerinin dağılımı .....	49
<b>Tablo 4.2.</b> CDT ve CNF pozitif ExPEC suşlarındaki Toksin Genlerinin dağılımı.....	49
<b>Tablo 4.3.</b> Klinik orjinlerine göre 156 ExPEC izolatının faktör-toksin genleri dağılımı.....	50
<b>Tablo 4.4.</b> CDT ve CNF pozitif ExPEC suşlarında üriner sistem ve üriner sistem dışı enfeksiyon odaklarındaki virülans faktör dağılımları .....	51
<b>Tablo 4.5.</b> İzole edilen ExPEC suşlarında üriner sistem ve üriner sistem dışı virülans faktör dağılımları .....	52
<b>Tablo 4.6.</b> Virülans geni taşıyan 156 izolatın filogenetik gruplarının dağılımı. ....	53
<b>Tablo 4.7.</b> Filogenetik grup ve klinik orjinine göre 156 ExPEC izolatının virülans genlerinin dağılımı .....	54

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>CDT</b>	: Cytolethal Distending Toxin
<b>CNF</b>	: Cytotoxic Necrotizing Factor
<b>DAEC</b>	: Diffüz Aderans Gösteren <i>E. coli</i>
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik asit
<b><i>E. coli</i></b>	: <i>Escherichia coli</i>
<b>EAggEC</b>	: Enteroagregativ <i>E. coli</i>
<b>EDTA</b>	: Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EHEC</b>	: Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>
<b>EIEC</b>	: Enteroinvasive <i>E. coli</i>
<b>EMB</b>	: Eozin Metilen Mavisi
<b>EPEC</b>	: Enteropatojenik <i>E. coli</i>
<b>ETEC</b>	: Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
<b>ExPEC</b>	: Ekstraintestinal Patojenik <i>E. coli</i>
<b>HST</b>	: Hücre Süspansiyon Tamponu
<b>IMVIC</b>	: Indol, Metil KırmızıS1, Voges Proskauer ve Sitrat
<b>IYE</b>	: İdrar Yolu Enfeksiyonu
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>MHB</b>	: Müller Hinton Besiyeri
<b>MLST</b>	: Multilocus Sequence Typing
<b>NMEC</b>	: Neonatal Menejitile İlişkili <i>E.coli</i>
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>PFGE</b>	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyon
<b>RFLP</b>	: Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>STL</b>	: Shiga Like Toxin
<b>TBE</b>	: Trismabase, Borik Asit, EDTA
<b>TE</b>	: Tris-Hcl, EDTA
<b>UPEC</b>	: Uropatojenik <i>E. coli</i>
<b>USİ</b>	: Uriner Sistem İnfeksiyonu
<b>USP</b>	: Uropatojen Spesifik Protein

## ÖZET

### Ekstraintestinal Enfeksiyonlardan İzole Edilen *Escherichia coli* (ExPEC) Suşlarında Cytotoxic Necrotizing Factor (CNF-1, CNF-2, CNF-3) ve Cytolethal Distending Toxin (CDT-1, CDT-2, CDT-3, CDT4) Dağılımı ve Filogenetik İlişkilerinin PFGE ile Tespiti

*Escherichia coli*'de (*E.coli*) ekstraintestinal enfeksiyon tanı markırları hala belirsizliği korumaktadır. Ekstraintestinal patojenik *E.coli*'yi (ExPEC) diğer *E.coli* suşlarından farklı kılan virülans faktörleri konak hücreye adezyon, invazyon ve hücre ölümünden sorumlu olan iki önemli faktör/toksin: Cytotoxic Necrotizing Factor (CNF) ve Cytolethal Distending Toxin'dir. Bu çalışmada, intestinal sistem dışındaki enfeksiyon odaklarından izole edilen 645 *E. coli* suşunda CNF-CDT genotip prevalansları araştırıldı. Bu prevalans, örneklerin klinik kökenleri, filogrupları ve filogenetik ilişkileri ile analiz edildi. Analiz edilen 645 *E. coli* suşunda ExPEC için tanımlanan virülans genlerinden (CNF1-3/CDT1-4) en az birini taşıyan 156 suş bulundu. Sırasıyla; ExPEC suşlarının 81, 20 ve 18'i *cnf1*, *cnf2*, *cnf3*; 20, 4, 4 ve 4'ü *cdt1*, *cdt2*, *cdt3*, *cdt4* içermekteydi. İkili kombinler ise *cnf1-cnf3*(n=6), *cnf1-cdt1*(n=6), *cdt1-cdt4*(n=6) olarak tespit edildi. Bu 156 suşun PFGE ile 106 büyük küme içerisinde dağıldıkları bulundu. Virülan ExPEC suşlarının öncelikli olarak filogrup B2 (%60,8) ve D (%30,7) ile ilişkili olduğu bulundu. CNF gen ailesinin özellikle üriner sistemde *E. coli* kolonizasyonunu arttırdığı ve *E. coli* gen havuzundaki bu genler ile, insan idrar yolu gibi yeni ortamlarda hayatta kalma yeteneği kazandığı kanaatine varıldı. *E. coli*'de CNF geninin yaygın difüzyonu, kommensal suşlardan ExPEC'i ayırmaya yardımcı olabileceği ve bu genlerin, non-kommensal *E. coli* için spesifik bir marker olabileceği düşünüldü. Evrim açısından farklı *E. coli* suşlarının delesyon, rekombinasyon mutasyonları sonucunda farklı virülans genlerini kazanarak ExPEC özelliği kazandığı ve bu suşların neden olduğu enfeksiyonların, hastane kaynaklı olmaktan çok toplum kökenli olduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** CNF, CDT, ExPEC, PFGE

## ABSTRACT

### **The distribution of Cytotoxic Necrotizing Factors (CNF-1, CNF-2, CNF-3) and Cytolethal Distending Toxins (CDT-1, CDT-2, CDT-3, CDT4) in *Escherichia coli* Strains Isolated From Extraintestinal Infections and Determination of Their Phylogenetic Relationship by PFGE**

Determinants of extraintestinal infection in *Escherichia coli* remain unclear. Virulence factors making Extraintestinal pathogenic *E.coli* (ExPEC) different from other *E.coli* strains are the host cell adhesion, invasion, and two important factors/toxin, Cytotoxic Necrotizing Factor (CNF) and Cytolethal Distending Toxin (CDT) that are responsible for cell death. In the present study, CNF-CDT genotypes prevalences were investigated in 645 *E. coli* strains isolated from patients. This prevalences was analyzed with clinical origins, phylogroups and putative phylogenetic relationships. At least one virulence gene identified for ExPEC was found in 156 (20.7%) of 645 *E. coli* strains. Respectively; 81, 20, 18 of ExPEC strains contained *cnf1*, *cnf2*, *cnf3*. Genes *cdt1*, *cdt2*, *cdt3*, *cdt4* were detected 20, 4, 4, 4. At last two factors were detected *cnf1-cnf3*(n=6), *cnf1-cdt1*(n=6), *cdt1-cdt3* (n=4). These 156 strains were found to be distributed in 106 large clusters by PFGE. Virulent ExPEC primarily related to groups B2 (60,8%) and D (30,7%). The CNF gene family is believed to enhance colonization of *E. coli* especially in the urinary system and these genes of the *E. coli* gene pool are gained in the ability to survive in new environment, such as the human urinary tract. The widespread diffusion of the CNF gene in *E. coli* help to distinguish ExPEC from commensal strains and these genes may be use spesific marker for noncommensal *E. coli*. Different strains of *E. coli* in terms of evolution have led to conclusion that have acquired ExPEC properties by acquiring different virulence genes resulting in deletion, recombination mutations and It is thought that infections caused by these strains was more likely community-acquired rather than hospital-acquired.

**Key Words: CNF, CDT, ExPEC, PFGE**

# 1. GİRİŞ ve AMAÇ

*Escherichia coli* (*E. coli*), insan ve sıcak kanlı hayvanların kommensal intestinal florasına ait geniş bir çeşitliliğe sahip suşlardan oluşur. Bu suşlar arasında, çeşitli patojenik varyantlar, insanlarda ve hayvanlarda intestinal veya ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olurlar (1). İntestinal florada diğer flora bakterilerinden kolaylıkla virülans ve direnç genleri transfer edebilen *E. coli*'nin bazı geno/serotipleri, intestinal sistemde, basit sekretuar tip ishalle seyreden patolojilerden mortal seyreden dizanteri formundaki inflamatuvar ishaller kadar değişen semptomlar ile seyreden patolojilere de yol açarlar. Ancak intestinal sistem dışında vücutta steril alanlardaki kolonizasyonları her zaman klinik patolojinin sebebi olarak kabul edilir. Multilocus enzyme electrophoresis (MLST) ve çeşitli DNA markırlarına (2, 3, 4) dayanan popülasyon genetik çalışmaları, *E. coli* suşlarını dört büyük filogenetik grupta (A, B1, B2 ve D) toplamaktadır.

Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) suşları henüz tam olarak tanımlanamayan fakültatif patojenlerdir. Çoğunlukla filogrup B2 ve D'ye ait oldukları ve fleksibl bir gen havuzuna ait çok sayıda virülans genine sahip oldukları bildirilmektedir (5, 6). ExPEC üriner sistem enfeksiyonu, yeni doğan menenjit, sepsis, osteomyelit, pnömoni, cerrahi alan enfeksiyonları ve diğer ekstraintestinal bölgelerdeki enfeksiyonlara neden olmaktadır. ExPEC suşları arasında, üropatojenik *E. coli* (UPEC) suşları, üriner sistemde bakteri üremesini ve persistansını kolaylaştıran virülans faktörlerini kullanarak konak davranış ve duyarlılığından istifade etmektedir (7, 8-10). ExPEC'in neden olduğu enfeksiyonlar düşük morbiditelerine rağmen mortal seyretmeleri ve hastanede yatış sürelerini uzatmaları sebebi ile giderek daha önemli bir endemik problem haline gelmektedir. CDC (Central for Disease Control and Prevention) verilerine göre ExPEC'e bağlı ekstraintestinal enfeksiyonlar, ABD'de her yıl milyarlarca dolar ulusal sağlık harcamasına ve yüz binlerce insanın ölmesine sebep olmaktadır. Üriner sistem enfeksiyonları, pnömoni, cerrahi alan enfeksiyonları ve sepsisten izole edilen ExPEC'in neden olduğu yıllık vaka sayısı bir çalışmada 6,7 – 8,6 milyon olarak tespit edilmiştir. Bir yıllık mali kayıp ise 1,5-2,3 milyar dolar olarak belirlenmiştir. ExPEC'i diğer *E. coli* suşlarından farklı kılan önemli virülans mekanizmaları adezyon, invazyon, konak defansının defekti ve salgılanan efektörler

yoluyla konak hücresel işlevlerine direkt müdahaleyi kapsamaktadır (11, 12).

Bu efektörler konak hücrenin temel hücre prosesi olan hücre saykılını bozan fonksiyonel bir toksin sınıfından oluşur. *E. coli* türlerinde özellikle toksin-faktörler, 2 sınıf olarak tanımlanmıştır: Rho-GTPase-hedefleyen toksin sınıfı CNF1-CNF3 (Cytotoxic Necrotizing Factor) ve genotoksin olan CDT1-CDT4 (Cytolethal Distending Toxin)'dir. CNF'ler sitokinezis olmaksızın DNA replikasyonunu promote ederken; CDT'ler mitozisi bloke ederler. Dolayısıyla bu toksin-faktörlerin üretimi sitopatik etkinin indüklenmesi analiziyle tespit edilebilir (13, 14).

Bu toksin-faktörler *E. coli* fleksible gen havuzuna ait olan mobil elementler patojenite adası, plazmidler, bakteriyofajlar gibi aracılığıyla kodlanır (15). Ekstraintestinal tutulumlardan izole edilen ve ciddi semptomlar ile seyreden enfeksiyonlara sebep olan suşların intestinal sistem patolojilerini oluşturan suşlar gibi, diğer mikroorganizmalardan transfer ettikleri farklı kolonizasyon ve virülans faktörlerine sahip oldukları, bu virülans faktörlerini kodlayan genlerdeki polimorfizmin hastalığın prognozunu etkilediği sınırlı sayıda yapılan klinik-epidemiolojik çalışma ile gösterilmiştir. Çalışmamızın amacı klinik orjinleri farklı olan *E. coli* suşlarında CNF-CDT prevalansını ve klinik tablo ile genotipler arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Böylece non-kommensal *E. coli* tanısı için spesifik bir marker tespit etmektir. Ayrıca CNF-CDT pozitif suşlarda enfeksiyon kaynağını belirleyebilmek ve evrim açısından farklı *E. coli* suşlarının delesyon, rekombinasyon mutasyonları sonucunda mı yoksa bir ata suştan evrilerek mi ExPEC özelliği kazandığı anlamak için virülans faktör genotipleri ile klinik izolatlar arasında muhtemel filogenetik ilişkiyi tespit etmektir. Böylece bir taraftan ExPEC suşlarının virülans ile ilgili genotipik özellikleri tespit edilirken, bu faktör/toksinlerin suşlar arasındaki dağılımının hastane enfeksiyonları ve toplum kökenli enfeksiyonlar ile ilişkisini sorgulamaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Escherichia coli

*E. coli* 19. yy sonunda Alman pediatrist ve bakteriyolog Theodor Escherich (1857-1911) tarafından “*bacterium coli commune*” olarak keşfedildi. *E. coli* muhtemelen en iyi çalışılan prokaryotik organizmayı temsil etmekte ve genetik ve biyoteknoloji gibi farklı araştırma alanlarında önemli bir model organizma görevi görmektedir. *E. coli* gama-proteobakterilerin enterobacteriaceae ailesine ait fakültatif anerob, gram negatif, çubuk şeklinde bir bakteridir. Enterobacteriaceae ailesi patojenik suşların yanı sıra apatojenik veya kommensal suşlarda dahil olmak üzere 40’dan daha fazla farklı türü (aralarından sıyrılan; *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Enterobacter* and *Escherichia*) içerir. *E. coli* türleri son derece heterojen olup; kommensal ve patojen suşlardan oluşur. Birçok *E. coli* suşu insanların ve sıcakkanlı hayvanların kolon normal florasında kommensal olarak kolonizedir; K vitamini (16) üreterek veya kolonda patojen bakterilerin oluşumunu engelleyerek konağa fayda sağlar (17). Bununla birlikte, bazı *E. coli* suşları serotip ve virülans faktör paternlerine bağlı olarak ciddi hastalıklara neden olabilir. Bu yüzden *E. coli* klinik olarak en yaygın ve önemli patojenlerden biri olarak bilinir. Çoğunlukla üç genel klinik sendrom patojenik *E. coli* suşlarının enfeksiyonuyla oluşur: (i) üriner sistem enfeksiyonu, (ii)sepsis/meninjit, ve (iii)enterik/diyare. Patojenik *E. coli* suşları enfeksiyon alanı ve virülans gen paternlerine binaen karakterize edilen farklı patotipler içerisinde sınıflandırılabilir. İntestinal patojenik *E. coli* suşları virülans özellikleri ve serolojik karakterlerine bağlı olarak altı patotipe ayrılır (Şekil 2.1).

Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC) insanda ve birçok hayvanda ishale (ateş olmadan) neden olan ajandır. ETEC ince bağırsaktaki enterosit hücrelerine bağlanmak için fimbrial adezinleri kullanılır ve tanımlanmış iki enterotoksin grubundan en az birini üretir. İki proteinden daha büyük olanı yapısı ve işlevi kolera toksinine benzeyen ısıya dayanıksız enterotoksin (LT) iken; daha küçük olan ısıya dayanıklı enterotoksin (ST) hedef hücrelerde cGMP birikimine neden olur ve ardından bağırsak lümeni içine sıvı ve elektrolitlerin sekresyonuna neden olur. ETEC suşları non-invazivdir ve intestinal lümeni terk etmezler (18).

Elli yıldan daha uzun süre önce infant diyarenin sebebi olarak serogrup O26

*E.coli* suşu tanımlandı ve Enteropathogenic *E.coli* (EPEC) olarak sınıflandırıldı. EPEC'e bağlı enfeksiyonların en belirgin özelliği attaching-effacing (A/E) histopatolojisidir. Mikrovilülerin etkili hale gelmesi ve bakteri ve epitel hücre membranı arasındaki sıkı aderans intimin olarak bilinen EPEC suşlarının karakteristik adeziv determinantı tarafından gerçekleştirilmektedir (19). A/E fenotipinden sorumlu genler enterocyte effacement lokus (LEE) olarak adlandırılan bir patojenite adası üzerinde kodlanır. EPEC'in intestinal mukozaya aderansı önemli deformasyona sebep olarak konak hücredeki aktinin yeniden düzenlenmesine neden olmaktadır. EPEC suşları orta derecede invazivdir ve EPEC'e maruz kalanlarda intestinal hücredeki değişiklikler muhtemelen ishalin ilk nedenidir (20). Dahası EPEC fimbria, invazyondan sorumlu proteinler ve düşük molekül ağırlıklı EAST1 olarak adlandırılan stabil toksin gibi çeşitli virülans faktörlerine sahiptir. Ancak bu virülans faktörlerinin EPEC patogenezindeki önemi hala bilinmemektedir. Büyük olasılıkla bu virülans determinantlarının A/E lezyonları üretiminde rol oynadığı düşünülmektedir.

EPEC ve ETEC'in aksine, enteroinvaziv *E.coli* (EIEC) sadece insanda bulunur. EIEC enfeksiyonu, profüz diyare ve yüksek ateş ile karakterize Shigellosis'e benzer bir sendroma neden olur. EIEC suşları oldukça invazivdir; Barsak hücrelerine bağlanma ve internalizasyon, adezinler tarafından teşvik edilir. EIEC suşları hiçbir toksin üretmemesine rağmen, bağırsak duvarı mekanik hücre yıkımı nedeniyle ciddi hasar görür.

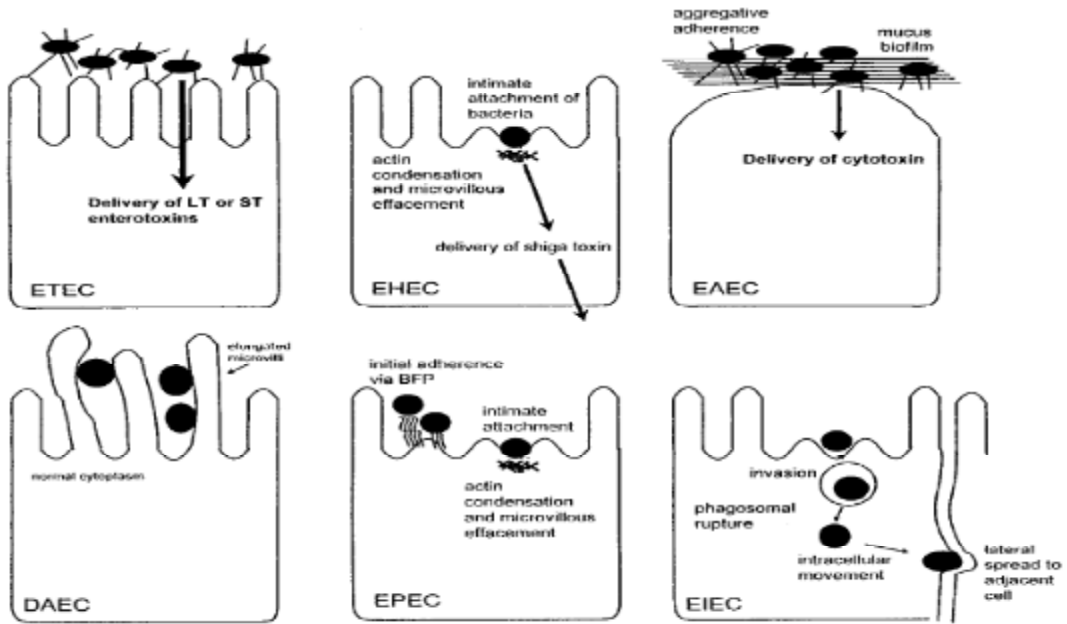
Tipik olarak, virülan enterik suşlar, sağlıklı erişkin insanlarda ishalden daha fazlasına neden olmaz, ancak yaşlı, çok genç veya bağışıklığı baskılanmış insanlarda ciddi hastalık veya ölüme neden olabilen bazı özel suşlar vardır (21). Bu bakteriler arasında, tek bir suş (serotip O157:H7) tarafından temsil edilen Enterohemorajik *E.coli* (EHEC) vardır. EHEC, kanlı akıntı ve ateş olmaması ile EIEC'ten (ve *Shigella*) farklı bir diyarel sendroma sebep olur. Sıklıkla hayatı tehdit eden bir durum, böbrekler üzerine olan, hemolitik üremik sendrom (HUS) veya ani böbrek yetmezliği, gibi toksik etkileridir (22). EHEC suşları, fimbriasıyla birlikte bağırsak hücrelerine bağlanır ve konak hücreyi istila eder. Bazı suşlar yoğun bir enflamatuvar cevap oluşturabilen verotoksini (aynı zamanda "shigatoxin; Stx" olarak adlandırılır) kodlayan bir faja sahiptir. EHEC suşlarının bir diğer önemli virülans determinantı, EHEC hemolizini kodlayan EHEC-hlyA geninin yer aldığı plazmidir (EHEC toksini Ehx olarak da



adlandırılır).

Başka bir patotip, Enteroagregatif *E.coli* (EAEC) enterotoksin; LT veya ST sekrete etmeyen, ancak doku kültür hücrelerini agregatif etki gösteren özel fimbriaları içeren *E.coli* suşları olarak tanımlanmaktadır. EAEC ilişkili ishale, non-invaziv EAEC'lerin intestinal mukozaya bağlanmasıyla neden olur. Özellikle küçük çocuklarda ateş ve inflamasyon olmaksızın persistent sulu ishale neden olmaktadır.

Bir diğer patotip ise, gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerdeki 1,5-5 yaş arası çocuklarda görülen sekretuar tip ishallere sorumlu tutulan Diffusely adherent *E.coli* (DAEC)'dir. Ancak akut başlayan ishallere kronik inflamatuvar ishallere dönüşme riski yüksek bulunmuştur. Patofizyolojik özellikleri ve virülans faktörleri hakkında çok şey bilinmemekle beraber Afa-Dr adezinler ailesine mensup mannos dirençli iki tip adezinin intestinal hücre adezyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (23, 24).



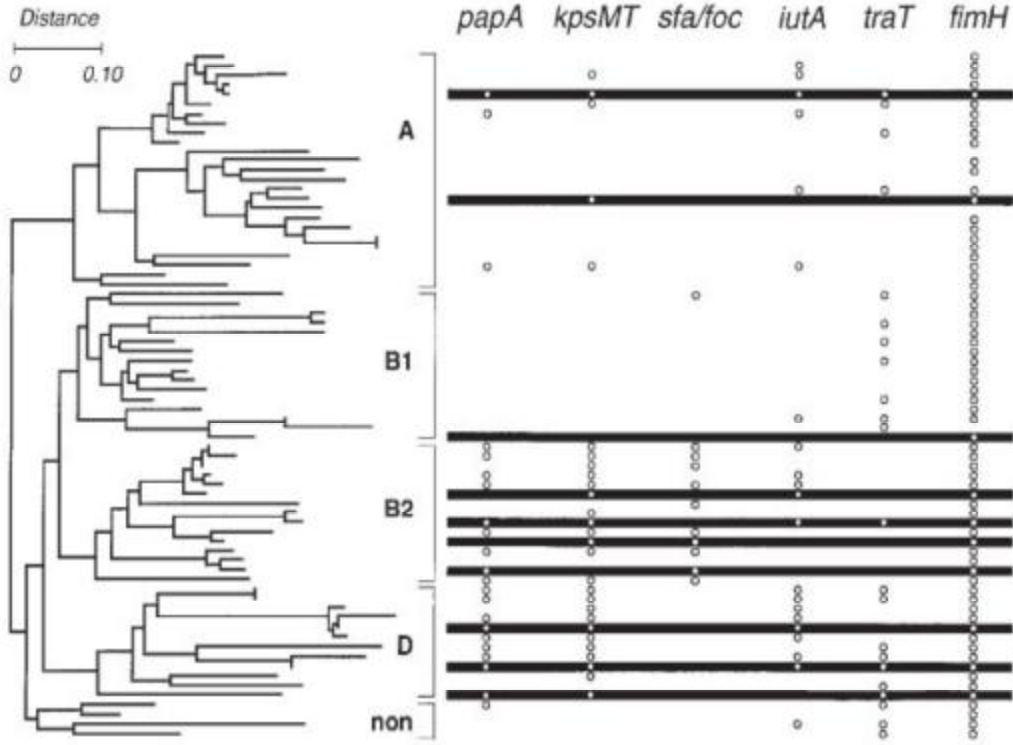
Şekil 2. 1. Diyarejenik *E. coli*'nin patojenik mekanizmaları (25)

### 2.1.1. Ekstraintestinal patojenik *Escherichia coli* (ExPEC)

Bağırsak patotiplerinin aksine, ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) önemli fakat az takdir gören sağlık tehdidini temsil etmektedir. ExPEC suşları, gastrointestinal sistem dışındaki toplum kaynaklı enfeksiyonların çoğundan sorumludur. Bu enfeksiyonlar, asemptomatik idrar yolu enfeksiyonlarından (İYE) pyelonefrit veya

sepsis gibi hayatı tehdit eden hastalıklara kadar değişebilir (26, 27). ExPEC'in ana alt tipi olan; üropatojenik *E. coli* (UPEC) suşlarının neden olduğu İYE, yüksek oranda morbiditeye, üretkenliğin azalmasına ve sağlık-bakım harcamalarının artmasına neden olan heterojen bir hastalık grubunu temsil eder. İYE; asemptomatik İYE'den ve zararsız sistitten ağır piyelonefrit gibi sistemik enfeksiyonlara kadar şiddetlerinde farklılık gösterebilir. ExPEC'in diğer patotipleri toplum-kökenli bakteriyeminin en yaygın nedeni olan sepsisle ilişkili patojenik *E. coli* (SPEC) suşları ve sıklıkla ciddi sekellerle ve ölümlerle sonuçlanan neonatal menenjit ve neonatal sepsisin önde gelen nedeni olan sepsis ve yeni doğan menenjitte ilişkili *E. coli* [NMEC]'dir (28). ExPEC suşları aynı zamanda intraabdominal enfeksiyonlarda ve nozokomiyal pnömonide göze çarpmaktadır ve arasına osteomyelit, selülit ve yara enfeksiyonları gibi diğer ekstraintestinal enfeksiyonlara da katılır (29).

Filogenetik analizler doğal *E. coli* izolatlarının temel olarak klonal olduğunu ve dört ana filogenetik gruba ayrıldığını ortaya çıkarmıştır: A, B1, B2 ve D. İmmün sistemi baskılanmamış konakta birçok ExPEC enfeksiyonundan sorumlu olan ExPEC suşları, kommensal *E. coli*'den farklı olduğu kadar intestinal patojenik *E. coli* tiplerinden de farklıdır (30). Klinik kaynakla ilişkili ExPEC virülans genlerinin filogenetik dağılımı Şekil 2.2'de gösterilmektedir. Birçok intestinal patojenik *E. coli* suşu, sadece nadiren ekstraintestinal hastalıklara neden olan, filogenetik grup A, B, veya D'den veya gruplandırılmamış soylardan köken alırken (31); Kommensal *E. coli* suşları tipik olarak A veya B1 filogenetik gruplarından türetilir ve çoğu virülans faktörü (VF'ler) genom yapılarında eksiktir (32, 33). İntestinal patojenik suşlar, spesifik diyare sendromlarının karakteristikleri olan belirgin virülans faktörlerine (örneğin, shigatoxin, ST, LT veya intimin) sahiptirler. Kommensal ve intestinal patojen *E. coli*'nin aksine, ExPEC ağırlıklı olarak filogenetik B2 ve daha az oranda D grubundan köken almaktadır (32). Ayrıca, belirli virülans genleri (cnf, cdt, papA, P fimbriae, kpsMT, grup II kapsül sentezi, sfa / foc, S ve F1C fimbriası, iutA, aerobactin reseptörü), ExPEC suşlarına bu VFlerin yüksek oranda ilişkili olduğunu gösteren B2 ve D filogenetik grup içerisinde toplanır.



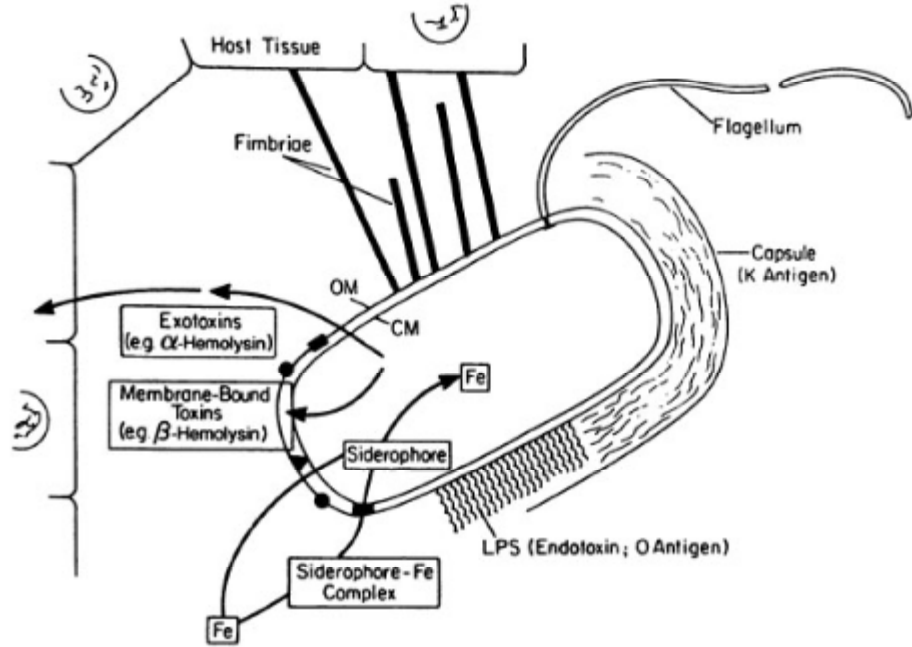
**Şekil 2. 2.** Klinik kaynakla ilişkili ExPEC virülans genlerinin filogenetik dağılımı Dendrogram, MLST ile çıkarılan *E. coli* referans suşlarının (ECOR) 72 üyesi için filogenetik ilişkiyi göstermektedir (29). Sağdaki yatay çubuklar, semptomatik İYE olan hastalardan gelen 10 ECOR suşunu göstermektedir. Kalan suşların çoğu, sağlıklı insan veya hayvan konaktan izole edilen dışkı izolatlarıdır.

Son çalışmalar; Çoğu ExPEC suşunun horizontal gen transferi yoluyla virülans faktörlerinin kademeli olarak akümüasyonu ile ata bir suştan evrildiğini göstermiştir (34, 35). Bu virülans faktörlerinin kazanımı ve ekspresyonu spesifik genetik geçmişi gerektirebilir (36, 37, 38). Bununla birlikte suşun konağa uyumu virülans faktörlerinin belirlenmesinde önemli katkı sağladığı için; Bir *E. coli* suşunun sadece belirli bir filogenetik grupla ilişkilendirilmesi o suşu patojenik veya non-patojenik bir hale getirmez (39, 40).

### 2.1.2.ExPEC'in virülans faktörleri

ExPEC suşları fekal *E. coli*'nin bir kısmını (% 20) oluştursa da, herhangi bir gastrointestinal hastalığa neden olmaz (41, 42, 43, 44). Bununla birlikte, ExPEC, gastrointestinal sistemin etkin şekilde kolonize edilmesine yönelik benzersiz bir kabiliyete sahiptir. ExPEC suşları, konak mukozal yüzeyine kolonizasyonu, lokal ve

sistemik konak defans mekanizmalarından kaçışı, demir gibi temel besin maddelerini alma ve oksidasyon redüksiyon potansiyelinin düzenlenmesi, epitel hücrelerde hasar oluşturma ve inflamatuvar cevabın uyarması gibi dokuda patolojilere yol açabilecek potent virülans faktörlerini bünyesinde barındırırlar (29). ExPEC'in karakteristik virülans faktörleri; polisakkarit kılıflar (lipopolisakkaritler ve kapsül gibi), toksinler, adezinler, invazinler, proteazlar, serum dirençli proteinler ve demir kazanım sistemleri (sideroforlar) gibi çeşitlilik gösterir (Şekil 2.3) (45). Bu virülans faktörleri ExPEC suşlarına lokal enfeksiyonlar kadar sistemik yayılımla genel enfeksiyonlar oluşturabilme yeteneği kazandırır. Bu VF'lerin çoğu patojenite adalarında (PAI) kodlanır (46). PAI'lar, komensatif *E. coli*'nin yoksun olduğu virulansa bağlı genleri barındıran, ayrı bir G + C içeriğine sahip kromozomal olarak eklenmiş genetik elementler olarak tanımlanır (47). PAI'ler karakteristik olarak patojenin evriminde anahtar rol oynayan yatay gen transferi yoluyla kazanılır. Bununla birlikte, PAI'lerin spesifik iletilebilirliği henüz gösterilmemiştir ve evrimsel kökenleri bilinmemektedir.



**Şekil 2. 3.** Bakteriye ait özellikleri vurgulayan, konakçı doku ile etkileşime giren bir *E. coli* hücresinin şematik gösterimi. (OM: Outer membrane, CM: cytoplasmic membrane, LPS: lipopolysaccharide) (48).

### 2.1.2.1. Polisakkarit kılıf

Bakteriyel yüzey kılıfları, yani, kapsüller polisakkaritler (K-antijenler), LPS ve LPS'nin (O-antijenleri) O polisakkarit kısımları, ekstraintestinal enfeksiyonlarda olası virülans belirleyicileri olarak dahil edilmiştir (49, 50). *E.coli*'de 176 farklı O-serogrup ve 80'den fazla K-antijeni bulunmaktadır. Buna ek olarak, birçok *E.coli* suşu, biyofilmlerin polisakkarit kılıflarının ana bileşeni olan kolonik asidi sentezleyebilmektedir (51). Kapsüller polisakkaritler, mikroorganizmayı saran, O-antijen tespitini engelleyen ve mikroorganizmayı konak savunma mekanizmalarından koruyan; tekrarlayan karbonhidrat altbirimlerinin doğrusal polimerleridir. *E.coli* her biri çok sayıda farklı türden oluşan dört çeşit kapsüler polisakkarit üretir (grup I ila IV) (52). Çoğu ExPEC suşunun kapsülü, grup II polisakkaritlerini tanımlayan ince, yamalı, asidik, termostabil ve oldukça anyonik özelliktedir. Bazı ExPEC kapsül tiplerinin (örneğin K1, K5, K10, K54) bu suşların patogeneze katkıda bulunduğu gösterilmiştir (53, 54, 55, 56, 57). Benzer şekilde, UPEC suşlarının O-antijen serotipleri olan; O1, O2, O4, O6, O16, O18, O22, O25 ve O75'e ait olması daha olasıdır (58, 49, 50, 59). UPEC CFT073 suşunda kapsüler polisakkarit ve LPS sentezinden sorumlu genler; *in vivo* olarak yüzey kılıflarının önemini gösteren deneysel üriner sistem enfeksiyonu sırasında yüksek oranda eksprese edilir (60). Bununla birlikte, bazı O-polisakkarit veya kapsüller antijenler asendan üriner sistem enfeksiyonuna katkıda bulunup bulunmadığı açık değildir. Bazı çalışmalar, bakteriyel kılıfların artmış serum direncinin sebebi olabileceğini ve dolayısıyla ExPEC'nin fagositozunun engellediğine dikkat çeker (53, 54, 57).

### 2.1.2.2. Aderans

Aderans, birçok patojen mikroorganizma için ortak bir özelliktir. Konağa ait yapılara bağlanarak, mikrobiyal patojenlerin normal vücut sıvı akışıyla (kan, idrar, bağırsak içeriği) ortadan kaldırılmasını önler. Tutunma, konak mukozal yüzeylerin kolonizasyonunda gerekli bir ilk adım ve invaziv enfeksiyona bir örnek olarak düşünülür. 1970'lerin sonlarında, üriner sistem enfeksiyonuna neden olan *E. coli* suşlarının tipik olarak mannoz varlığına (mannoza dirençli hemagglütinasyon) rağmen insan eritrositlerini aglutinleştirdiği ve insan ürotelyal hücrelerine yapıştığı ilk kez biliniyordu. Bununla birlikte, ürotelyal hücrelere aderans, yalnızca mannoz duyarlı

hemagglütinasyon sergileyen suşlar tarafından da mümkündür. Çoğu üriner izolatin her iki özelliğine de fimbria aracılı eder.

### 2.1.2.3. Fimbrial Adezinler

Mannoz-dirençli adezin ailesi; farklı türlerin ve kan gruplarının eritrositlerini aglütine etmek için kollektif özelliğe sahip P fimbria ve X adezinleri içerir.

P fimbria (pap, piyelonefritle ilişkili pili), P kan grubu antijenlerini, renal epitel hücrelerindeki glikolipid reseptörlerine Gal $\alpha$  (1-4) Gal $\beta$ 'ya spesifik bağlanma yoluyla tanıyan UPEC'e özgü adezinlerdir (61). Böylece, P fimbria, bakteriyel kolonizasyonu ve inflamasyonu stimüle ederek (kemokin aracılığında nötrofillerin UT içine alınması) idrar yolundaki (İY) epitelyal hücrelere aderense aracılık eder (62, 63). P fimbrialar pyelonefritle (% 70) sistit izolatlarına (% 36) veya fekal suşlara (% 19) göre daha sık ilişkilidir. Bu gözlemler, P fimbriaların ExPEC'in İYE'ye neden olma kabiliyetine katkıda bulunduğunu ve P fimbriyanın olmadığı suşların İY'de dezavantajlı olduğunu ortaya koymaktadır (64).

X adhesinlerin grubu, hepsi farklı reseptörlere bağlanan Dr adezin, S, F ve M fimbriyanın familyasını içerir. Dr adhesinleri afimbrial adhesinlerdir ve afimbrial adezivler bölümünde belirtilmiştir. S fimbriae ve FIC fimbriae, bazı üriner suş tarafından eksprese edilen üriner sistemle yakından ilişkili adezinlerdir. S fimbriae, insan eritrositlerinin terminal sialil galaktoz rezidülerine veya proksimal ve distal tübüllerin epitel hücrelerine, renal interstisyumunda ve böbrek vasküler endoteliumda toplama kanallarına ve glomerulusa bağlanır (65, 66). S fimbriae (sfa), İYE de dahil olmak üzere birçok hayvan modelinde virülansa katkıda bulunur (67). İnsanlarda, S-fimbriyalı suşlar, İYE'ye kıyasla menenjit ve bakteremi ile daha yakından ilişkilidir (68). FIC fimbrialarının (foc) İYE patogenezindeki rolü tartışmalıdır, çünkü sadece özellikle İYE'li olan hastalarda nadir olarak bulunurlar (69). Ayrıca, FIC fimbriyası sadece bukkal epitel hücrelerine ve bazı renal dokulara bağlanır ancak hemagglütinasyona veya ürotelyal hücre adersansına aracılık etmez (70).

P ve X fimbriaa'nın aksine, tip 1 pili mannoz duyarlıdır. Tip 1 fimbrialar (fim), İYE'nin tüm klinik kategorilerinden ve fekal suşlardan izole edilen E. coli suşları arasında yaygın olarak görülür (71). Tip I pililer, adeziv tip protein FimH aracılığıyla; konak ürotelyumu ve UPEC arasındaki yakın temasa aracı olan yüzey adeziv fiberleridir

(72). Tip I fimbrialar özellikle üriner sistemdeki hücrelere adere olurlar; ancak mesane kolonizasyonu veya enfeksiyonunda invaziv İYE'den daha önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca, tip 1 fimbriaların, kalıcı bir mesane kateteri uzun süreli kullanımı sırasında *E.coli* İYE'li hastalarda bakteriyel persistansa katkıda bulunabileceği bildirildi (73).

#### **2.1.2.4. Afimbrial Adezinler**

Dr adezinler (*dra*) diğer *E.coli* fimbrial adezinlerinden yapısal olarak farklı olan ve üriner sistem içindeki çeşitli Dr kan grubu antijenlerini bağlayan afimbrial adezinlerdir (74, 75, 76). P fimbrianın aksine, Dr adezinleri (örn. O75x, AFA-1, AFA-III) ağırlıklı olarak sistit suşlarıyla (% 50) ilişkilidir (71). Buna ek olarak, ExPEC suşları, *E.coli* O157: H7 izolatından tellürite dirençle ilişkili PAI'nın bir parçası olarak tanımlanan, non-hemolitik bir adezin olan IrgA homolog adezine (iha) sahiptir. ExPEC iha geni, *V.cholerae*'nin demirle kontrol edilen gen A (*irgA*) ile benzerdir (77, 78). *V.cholerae* IrgA'sının ikili fonksiyonu vardır; hem bir adeziv olarak hem de siderefor reseptörü olarak görev görür (79). Son çalışmalarda, Johnson ve arkadaşları, iha'nın ExPEC fenotipi ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu gösterdi (80, 81). Iha, aderent olmayan bir *E.coli*'ye in vitro ve in vivo'da üroepitelyal hücrelere adere olma kabiliyeti kazandırdı. Bununla birlikte, Iha'nın diğer bakteri bileşenleriyle uyumlu olarak direkt veya indirekt adersana katkıda bulunup bulunmadığı bilinmemektedir.

#### **2.1. 2.5. Motilite**

Şuana kadar; *E.coli* için 50'den fazla flagellar-antijeni (H-antijeni, *fliC*) tanımlanmıştır (82, 81). Enterik *E.coli* virülansının fonksiyonel flagellae ekspresyonuna bağımlı olduğu gösterilmiştir (83, 84). Buna ek olarak, flagellae'nin *E.coli*'nin biofilm oluşturulmasında adeziv organların gerekli olması beklenir (85, 51). Bununla birlikte, üriner sistem kolonizasyonunda motilite etkisi tartışmalıdır.

#### **2.1.2.6. Serum dirençli proteinler**

Taylor (86), tarafından incelendiği üzere bakteriler, komplement sisteminin litik aktivitesi ile normal insan serumu tarafından öldürülür. Serum tarafından öldürülmeye bakteri tarafından direnç gösterilmesi kapsüler polisakkarit, O-polisakkarit yan zincirleri

ve Iss (artmış serum direnci) veya TraT (dış membran lipoproteini) gibi yüzey proteinlerinin veya plazmid pColV'un tek veya kombine etkileri sonucunda olur (87).

#### **2.1.2.7. Proteazlar**

UPEC suşlarında genellikle farklı substrat spesifitesi ve işlevleri ile dört dış membran serin proteazı (Sat, PicU, Hbp ve OmpT) bulunur (88-91). Sat (*sat*), in vitro ve in vivo'da böbrek ve mesane epitelini üzerine sitopatik aktivite sergileyen bir serin ototransporter toksindir (92, 89, 93). PicU (*picU*), Shigella spp ve enteroagregatif *E.coli*'nin Pic (bağırsak kolonizasyonunda yer alan protein) proteini ile homologdur. Pic proteazlar, mukozal pepsin, spektrin ve müsin indirgeyerek mukozal engelleri bozarlar (94, 95, 91). Hemoglobin-proteaz Hbp (*hbp*), avian patojenik *E.coli* (APEC)'nin Tsh hemaglutinininin bir homologudur. Hbp ve Tsh, hemoglobin hedefli serin proteaz aktivitesi olan hema bağlayıcı proteinlerdir (96). ExPEC'in dördüncü dış membran endopeptidazı olan OmpT (*ompT*), Yersinia pestisinin plazminojen aktivatörü Pla ile homologdur ve epitel hücreleri ve makrofajlar tarafından salgılanan antimikrobiyal peptidleri degrade eder (97, 90).

#### **2.1.2.8. Sidereforlar**

ExPEC suşları, intraselüler olarak *hem* veya *hemoglobine* bağlı demiri şelatlayan siderefor sistemi ve siderofordan bağımsız sistem (hemin reseptörü) içeren birkaç farklı demir alım sistemine sahiptir (98). Son yapılan çalışmalarda siderofor sistemine sahip ExPEC suşlarının kommensal suşlardan daha prevalan olduğu (99, 100) ve bu özelliğin üriner sistem enfeksiyonların patogeneğinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (101, 28).

Demir; DNA replikasyonu, enerji üretimi ve oksitadif strese korunma gibi pekçok hücresel süreçte rol alan temel elementlerden biridir. Oksijen mevcut olduğunda, serbest ferröz demir (Fe<sup>2+</sup>) çözülmemeyen ferrik (Fe<sup>3+</sup>) demire hızlı bir şekilde okside edilir. ExPEC, indirgenmiş demir iyonunun biyoyararlanımını sağlamak için, hücre içi demir konsantrasyonunu 10<sup>-7</sup> ve 10<sup>-5</sup> M arasında sabit tutmak amacıyla demir moleküllerini toplama mekanizması geliştirmiştir (102). ExPEC suşlarının farklı çevre şartlarında hayatta kalmak ve çoğalmak için jenerasyon başına 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> Fe<sup>3+</sup> iyonu gerektiği tahmin edilmektedir (103). *E.coli*'de ferrik demir alımının temel



mekanizmasını demire çok yüksek afinite gösteren 4 farklı siderofor molekülünün sentezi oluşturmaktadır. Bunlar; yersiniabactin siderophore sistem (*irp-fyuA*), (ii) salmochelin sistem (*iroA*), (iii) aerobactin siderophore sistem (*iuc-iutA*) ve (iv) the hemin uptake (*chu*) sistemler olarak sıralanabilir. Bu siderofor moleküllerinin sentezinden sonra sideroforlar dış ortama sekrete edilir. Siderofor-demir kompleksi spesifik taşıyıcılar aracılığıyla alınır ve bakteriyel sitozelde demiri serbest bırakmak için degrade edilir (104). Bu farklı siderofor sistemlerinin eşzamanlı varlığı, ExPEC'e çoklu demir kaynaklarından faydalanması için imkan sağlayarak konak içinde büyümenin verimliliğini arttırmaktadır.

### 2.1.2.9. Toksinler

Çeşitli bakteriyel toksinler (endo- ve eksotoksinler) veya efektör proteinler, ExPEC'nin virülansında belirgin veya putatif role sahiptir. Bu toksinlerin çeşitli biyolojik rolleri ve aktiviteleri, örneğin hücre lizleri yoluyla demir birikimi, epitelin parçalanması yoluyla adezyon, hücre döngüsünün modülasyonu ve apoptozun indüklemesini içerir. ExPEC'te bu biyolojik rolleri ve aktiviteleri üstlenen *E.coli*'ye ekstraintestinal özellik kazandıran hücre döngüsünün modülasyonu ve apoptozun indüklemesine sebep olan çoğunlukla CNF ve CDT toksin grubudur.

**$\alpha$ -hemolizin (hlyA)**, sıklıkla ExPEC suşlarıyla ilişkili bir eksotokindir ve ExPEC patogenezinde rol oynayan en önemli virülans faktörlerinden biridir.  $\alpha$ -hemolizin RTX toksin ailesine aittir ve tip I sekresyon sistemi tarafından salgılanmaktadır.  $\alpha$ -hemolizinin sentezi, aktivasyonu ve salınımı, hlyCABD operon tarafından belirlenir (110).  $\alpha$ -hemolizin, 110 kDa'lık molekül ağırlığı ile inaktif bir formda sentezlenir ve sitoplazmada hemolitik olarak aktif forma HlyC (bir yağ asidi açıltransferaz) ile aktive edilir (111).  $\alpha$ -hemolizin, HlyB, HlyD ve TolC'den oluşan bir transmembran kanal vasıtasıyla sitoplazmadan hücre dışı ortama doğrudan salınır (112-114). Salgılanmış  $\alpha$ -hemolizinin, geniş bir yelpazedeki memeli hücre tiplerine karşı bir  $Ca^{2+}$  'ya bağımlı sitolitik ve / veya sitotoksik aktivitesi vardır (115). Ayrıca,  $\alpha$ -hemolizinin konak hücre zarı ile etkileşime girdiği ve hedef hücrelerdeki inflamatuvar cevabı (örneğin yüksek IL-6 ve IL-8 seviyeleri ile) modüle ettiği rapor edilmiştir (116-118).

**Üropatojenik spesifik protein (*usp*)** son zamanlarda putatif bir üropatojen virülans geni olarak tanımlanmıştır (119). *Usp*, *V.cholerae* zonula occludens toksin (*zot*)

genine homolog olup, ExPEC suşlarında (pyelonefritin% 93'ü ve sistit izolatlarının% 80'inde) yüksek prevalansa sahiptir, ancak sağlıklı bireylerin dışkı örneklerinde nadiren bulunur (% 24) (120). Bununla birlikte, bazı çalışmalar, *usp*'nin sadece İYE izolatlarıyla ilişkili olduğunu bildirmiştir (119). Kesin mekanizması belirsiz halde olmasına rağmen, *usp*'nin fare İYE modelinde belirgin derecede virülans oluşturduğu gösterilmiştir ve *P.aeruginosa* suşları tarafından üretilen S-tipi pyosinlere yüksek homoloji gösterdiği için endonükleaz olarak işlev gören bakteriyosin olduğu düşünülmektedir (121).

**Mikrosinler (mch) ve kolisinler (cva)**, Enterobacteriaceae familyasının çeşitli üyeleri tarafından salgılanan antimikrobiyal peptidlerdir (122, 123). Besin maddelerinin tükenmesi koşullarında üretilirler ve filogenetik olarak ilişkili mikrobik suşlara karşı aktiftirler. Mikrosin (mch) ve kolisinlerin (cva), enfektif popülasyon ve bağırsak florası içinde mikrobiyal rekabette önemli rol oynadıkları düşünülür (124, 60).

**Endotoksin (LPS)**; ExPEC suşlarıyla ilişkili tüm bu ekzotoksinlerin arasında, Gram-negatif bakteriyel dış zarın bir parçası olan lipopolisakkarit (LPS) yapıdaki endotoksin *E.coli*'nin temel virülans faktörlerinden biridir. Artan İYE'de, UPEC'in LPS'nin O-polisakarit kısmı, önemli bir düzenleyici fonksiyona sahiptir (125, 126). LPS, pro-enflamatuar mediyatörlerin (örneğin sitokinler ve kemokinler) ve hücrel nitrik oksit sentatazların üretimini uyaran konak hücreye ürotelyal ve enflamatuar Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) vasıtasıyla sinyalleri verir (127-129). LPS ile uyarılan sistemik enflamasyon, mukozal inertiyi bozar ve UPEC'e alttaki dokulara girmesi için izin verir. Birçok çalışma; LPS'ye bağımlı konak hücre sinyalinin, tip 1 ve / veya P fimbrialara bağımlı olduğunu bildirmiştir (130,131, 126).

### 2.1.3.Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs)

Rho ailesinin küçük GTP bağlayıcı proteinleri, bakteriyel toksinlerin ortak hedefleri olarak tanımlanmıştır. GTPazlar, hücre iskeletinin yeniden organizasyonu, endo- ve ekzositoz, hücre proliferasyonu ve apoptozu içeren çeşitli hücrel süreçlerin düzenlenmesinde yer alır (132). GTPazlar efektör moleküller tarafından tanınan GTP-bağlı durum-aktif ve GDP-bağlı durum-inaktif arasındaki dönüşümde “açma-kapama” anahtarları gibi davranırlar. Aktivasyon, bağımlı nükleotidin salınımı katalize eden guanin nükleotid değişim faktörleriyle (GEFler) ve dolayısıyla GTP için GDP'nin değişimiyle gerçekleşir. Tüm küçük GTPazlar gibi, Rho proteinleri de GTP'nin uyarılmış

hidroliziyle-GTPaz aktive edici protein (GAP) veya intrinsik olarak GDP-bağlı duruma geri döner.

Rho GTPaz aktivitesini ve fonksiyonunu düzenleyen ek faktörler, sitozolda GDP-bağlı Rho proteinlerini ayıran veya aktive edilmiş GTPaz'ların diğer hücrel yerlere nakledilmesine aracılık eden GDI'lardır (Guanine nükleotid Ayrılma İnhibitörleri) (133).

Rho GTPazları değiştirdiği bilinen ilk toksinler, proteinlerin tamamen inaktive edilmesine yol açtı. Clostridium botulinum, Clostridium limosum'den ve RhoA'nın Staphylococcus aureus ADP-ribosilat Asn41'den C3-benzeri toksinler. Bu modifikasyon, GDI'ya afiniteyi artırır ve böylece RhoA'ya bağımlı sinyal yollarının engellenmesine yol açan diğer etkilerin nükleotid değişimini engeller.

Rho GTPazları dominant olarak aktive ettiği açıklanan ilk toksin, patojen *E.coli* suşları tarafından üretilen Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1 (CNF1) idi. Toksin izole edildiğinde ve test edildiğinde tavşan cildi üzerindeki nekrotizan etkisinden ismini aldı (134). CNF1, aşağıda tarif edilen özdeş (CNF) veya benzer (DNT, Dermo nekrotik Toksin) aktiviteleri ile büyümekte olan toksin ailesinin en iyi analiz edilen üyesidir.

Üropatojenik *E. coli* (UPEC) üriner sistem enfeksiyon etkenlerinden izole edilen en yaygın suşlardan biridir (135,136). Genel olarak, UPEC suşlarının çoğunun kolonda normal flora elemanı olarak bulunması ve üretra yoluyla üriner sisteme girmesi kabul edilmektedir. Akut üriner sistem enfeksiyonları yaygın antibiyotiklerle tedavi edilebilirken, kronik tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonları daha büyük bir tehdittir. Kronik üriner sistem enfeksiyonu olan hasta bakterinin kan dolaşımına girmesi nedeniyle yüksek oranda septisemi riski taşırlar.

CNF1, UPEC suşlarının önemli bir virulans faktörüdür (137). Aerobactin, P fimbriae ve hemolizin gibi diğer birçok virülens faktörü ile ilişkilidir. Hemolizin geni, UPEC suşlarındaki *cnf1* ile güçlü bir korelasyon gösterir. *Cnf1* + suşlarının % 98'inde *hly* geninde pozitif olduğu bildirilmiştir (138). Rippere-Lampe ve ark. üriner sistem enfeksiyonu rat modelinde *Cnf1* + suşların, önemli ölçüde daha uzun yaşama kabiliyeti sergilediğini göstermiştir (139). *Cnf1* + UPEC ile enfeksiyon güçlü bir enflamasyon oranı eşlik eder (140). Bununla birlikte, yeni çalışmalar, CNF'nin sadece üropatojenlerle ilişkili olmadığını göstermektedir. Ayrıca deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarıyla ilişkilidir (141). Dahası, CNF1, ekstraintestinal *E. coli* (ExPEC)'de üretilir. *E. coli* K1

suşu için CNF1'in beyin mikrovasküler endotel hücrelerinin (BMEC) invazyonunu arttırdığı bildirilmiştir (142). Bu invazyon, RhoA'nın aktivasyonu nedeniyle hücre iskelet sisteminin yeniden düzenlenmesini gerektirir. *E. coli* K1 suşu yenidoğan menenjitine katılan önemli bir patojendir (136). Yapılan bir çalışmada, septisemi nedeniyle ölen 60 hastanın %22'sinin kanından CNF1 üreten *E. coli*'nin izole edildiği gösterilmiştir (143). CNF1, menenjit hastası çocuklardan izole edilen bakterilerde bulundu. CNF2, ishalleri buzağılardan ve kuzulardan izole edilen *E. coli*'de gösterilirken (144), CNF3, sağlıklı koyun ve keçilerden Nekrotoksigenik *Escherichia coli* (NTEC)'de tespit edilmiştir (145). Kromozomal olarak kodlanmış olan CNF1 ve CNF3'ün aksine, CNF2 iletililebilir bir plasmid üzerinde bulunur (146). PCR çalışmaları CNF1 geninin CNF2 geninden daha yaygın olduğunu göstermiştir (147).

Birçok çalışma, CNF1'i bakteriyel enfeksiyonlarda önemli bir virülans faktörü olarak tanımlamaktadır: CNF1 eksikliği olan *E. coli* suşlarının üriner sisteme kolonize olma potansiyeli daha düşüktür (148). Dahası, CNF1 doku hasarından sorumludur ve doku kültürü sistemlerinde epitel bariyer fonksiyonunu bozmaktadır (149,150) ve fagositozu bloke ederek immün hücrelerin fonksiyonunu etkilemektedir (151). Hücre kültüründe CNF1 intoksikasyonunun ardından afagositik hücrelerin fagositik davranış induksiyonu ve monositlerde fagositoz inhibisyonu gözlemlendi (148). CNF1, siklooksijenaz-2'nin (COX-2) ekspresyonunu indükler, nükleer faktör-kappa B'yi (NF- $\kappa$ B) aktive eder, hücre hareketliliğini artırır ve apoptozu inhibe eder; burada CNF1'in kanser gelişiminde rol oynayabildiğinin ipuçları vardır (152-154).

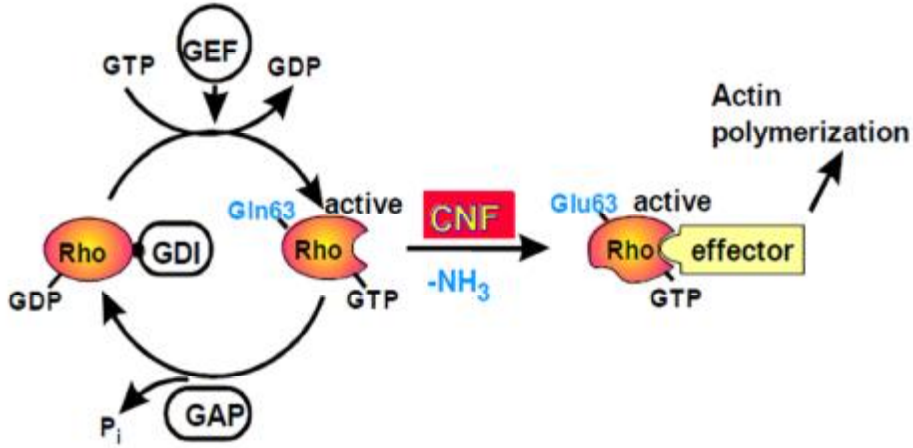
### 2.1.3.1. CNF Etki Şekli

Kovalent modifikasyon ile Rho GTPaz'ları aktive eden tüm toksinler, Rho GTPaz'larda aynı aminoasidini değiştirir (RhoA'daki glutamin 63 veya diğer Rho proteinlerindeki homologu, GTPaz aktivitesi için çok önemlidir). CNFler glutaminin deamidasyonunu katalize eder (155-156). Bu nedenle, GTP hidrolizi engellenir, bu da sürekli efektör aktivasyonuna neden olur (Şekil 1). Bu esnada, dört seri CNF izoformu bilinmektedir: *Escherichia coli*'den CNF1, CNF2 (CNF1 ile % 85-sekans idantitesi) ve CNF3 (CNF1 ile % 70-sekans idantitesi), *Yersinia pseudotuberculosis*'ten CNFY (CNF1 ile %61 sekans idantitesi).

Bordetella spp'deki Dermonekrotik Toksin (DNT), katalitik domainde CNF'ler ile

bir dizi homolojisine sahiptir ve RhoA'nın glutamin 63'ünü transamidize eder (Şekil 2.4). (157). DNT, RhoA'nın deamidasyonunu katalize edebilir, ancak transamidasyonu desteklemektedir (158, 159). Her iki modifikasyon intrinsek ve GAP ile uyarılan GTPaz aktivitesinin inhibisyonuna yol açar. Bununla birlikte, transamidasyon ile RhoA'ya primer bir aminin (ör., Spermidin, putresci veya lizin) tutturulması, deamidasyon ile indüklenen fenotipe kıyasla memeli hücrelerinde farklı bir fenotipe neden olur. Muhtemel sebebi bağlı aminin, bazı protein-protein etkileşimlerini inhibe etmesidir (160). Bazı in-vitro koşullar altında, CNF1 transamidasyonu katalize edebilir, ancak öncelikle bir deamidaz gibi davranır (161). Deamidasyona uğramış RhoA, beklenmedik bir şekilde, SDS-PAGE'de daha yüksek molekül ağırlığına geçer, ancak kitlenin deamidasyona bağlı artış sadece 1 Da'dır. Aynı kayma, rekombinant proteinler (vahşi tip RhoA ve RhoA-Q63E) ile de gözlemlenebilir. Açıkçası, canlı hücrede daha fazla modifikasyondan ziyade aminoasit kompozisyonu açıkça kitle artışının nedenidir. Aksine, çok daha yüksek kitlesel artışı olan transamidlenmiş RhoA daha düşük moleküler ağırlıkta göç eder (155). Rac1 veya Cdc42'nin modifikasyonu SDS-PAGE ile izlenemez.

Rho-GTPazların yapısal aktivasyonu nedeniyle, CNF1-intoksikasyonu, memeli hücrelerinde karakteristik morfolojik değişikliklere neden olur (162). En çarpıcı farklılıklar, aktin sitoskeletonun değişimiyle ortaya çıkar. RhoA'nın yapısal aktivasyonu, paralel aktin filamentleri ve miyozinin kontraktıl demetleri olan stres fiberlerinin oluşumuna neden olur. Rac aktivasyonu filamentöz aktinin net-benzeri bir organizasyonunu gerektiren lamellipodia oluşumuna yol açar. Toksinler ayrıca Cdc42'ye bağımlı yolakların aktivasyonu nedeniyle filopodiyayı (parmak benzeri yapıları) indükler. Vücut hücresinin aşırı düzleşmesinin yanı sıra, kültür hücreleri çok çekirdekli bir fenotip kazanırlar. Bunun, devam eden nükleer bölünme ile inhibe edilen sitokinezden kaynaklandığı düşünülür (163). Bununla birlikte, çekirdekler eşit olarak bölünmezler. Bölünme asimetrik ve anöploidi indüklenir (164).



Şekil 2. 4. CNFs tarafından Rho GTPaz'ların aktivasyonu (157)

Rho GTPazlar, çeşitli sinyal yollarında moleküler anahtarlar gibi davranırlar. Rho GTPazlar, GTP oluşumu için GDP'nin değişimini katalizleyen Guanin nükleotid değişim faktörleri (GEFler) ile bir GTPaz döngüsünde düzenlenirler. GTP hidrolizi, GTPaz aktive edici proteinler (GAPs) ile katalize edilir. Rho GTPaz'ları sitoplazmada tutan guanin nükleotid disosiasyon inhibitörlerinin (GDI'lar) kesin rolü tamamen net değildir. CNFler, glutamik asit üreten, RhoA'nın 63. glutaminini deamine ederler. Bu, GTP hidrolizinin engellenmesine ve G proteininin yapısal aktivasyonuna yol açar.

CNFler, Rho GTPaz'ların anahtar II bölgesindeki tek bir glutamin deaminasyona uğrattır. Bu glutamin, küçük GTPazların Ras süper ailesinin farklı üyeleri arasında korunur. Bununla birlikte, CNFler sadece Rho proteinlerini deamine eder. Substrat özgüllüğü CNF izoformları arasında değişir. CNFY, RhoA, B ve C için spesifiktir ve Rac veya Cdc42'yi deyiştirmez (165). CNF2'nin tercihen RhoA ve Rac (166) 'i deyiştirdiği bildirilirken, CNF1 ve CNF3 RhoA, Rac ve Cdc42'yi de deamine hale getirmektedir. Bununla birlikte, CNF3 RhoA'yı CNF1'den daha güçlü bir şekilde aktive eder (167).

Deaminasyona uğramış Rho GTPazlar GTP'yi hidrolize etmez ve bu nedenle yapısal aktivasyon beklenirken, bazı sinyal yollarının yalnızca geçici olarak aktive olduğu keşfedilmiştir. Bu geçişin nedeni, modifiye edilmiş GTPases'in kaderinde yatar.

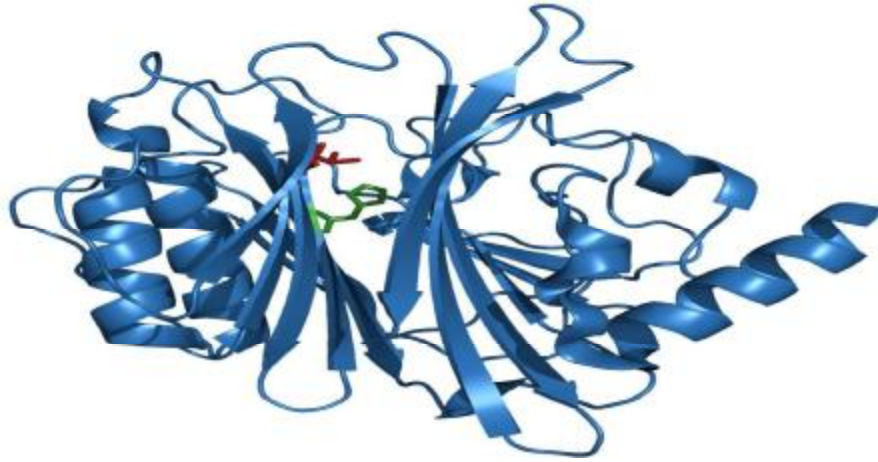
CNF1'in deamidasyonunu takiben, hüresel Rac'ın, ubikitleşmiş olduğu ve akabinde proteazom bağımlı bir mekanizma ile degrade olduğu bulundu (152, 168). Diğer Rho GTPazların degradasyonunun hücre tipine spesifik olduğu görülür. HUVEC

(insan umbilikal ven endotel hücrelerinde), CNF ile aktive olan RhoA ve Cdc42 de degrade edilir (169), oysa HeLa hücrelerinde Rac1 ubikitleştirilir ve degrade edilir, diğer aktive edilmiş GTPazların ise stabil olduğu bulunmuştur (170). Rac'ın degradasyonu hücre hareketliliğini arttırdığından ve bakterilerin internalizasyonunu arttırdığından, ardışık Rho GTPaz aktivasyonunun ve inaktivasyonunun inflamatuvar cevabı sınırladığı ve bakterilerin hayatta kalmasını sağladığı düşünülmektedir (152).

### 2.1.3.2.Yapı-Fonksiyon İlişkisi

Tüm CNF'lerin uzunluğu aynıdır (1013/1014 aa CNFY/CNF1, 2,3) ve bir N-terminal reseptör bağlama domenine sahip modüler bir yapı içerir. Merkezi translokasyon alanı ile bağlantılı olarak, hücresel girişe aracılık eder.

CNF1'in C-terminal kısmı (aa 720 ila 1014), tam katalitik aktiviteyi barındırır (171, 172). Sistein 866 ve histidin 881'in CNF1'in katalitik aktivitesi için kritik olduğu bulunmuştur (172). Kristal yapı, katalitik triadın üçüncü rezidüğünü, valin 833 belirledi (173). Dahası, CNF'lere özgü olduğu düşünülen daha önce bilinmeyen bir protein katını ortaya çıkarmıştır (Şekil 5). CNFY katalitik alanının CNF1 yapısı üzerinde modellenmesi, aynı katlanmayla sonuçlanmıştır (174). CNF1 ve CNFY'de katalitik domainin merkezi iki 2  $\beta$ -sac karışımı içeren bir  $\beta$ -sandviç ile oluşturulur. Katalitik domainin merkezi üzerinde oturan katalitik artıklar ile derin ve dar bir cebin girişini çizen dokuz döngü bölgesi ve  $\alpha$ -helezonlar ile çevrilidir (173) (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5. CNF1 katalitik domainin yapısı (710-1014 aa) (173).

Katalitik rezidüer Cys866 ve His881 (sırasıyla kırmızı ve yeşil yan zincirlerde gösterilmiştir), esnek bağlarla kaplı derin bir cebin tabanında bulunur ve bu da Rho bağlamında rol oynar

### 2.1.3.3.CNFs'nin Hücresel Alımı

CNF1, reseptör aracılı endositoz yoluyla konak hücrelere girer (176) (Şekil 2.6). Hücre yüzeyine olan etkileşime aracılık eden domain aa 53 ile 190 arasındadır ve hücrelere aşırı verildiğinde holotoksin aktivitesini inhibe edebilir (177). Bu reseptör bağlanma domaini kullanılarak, yaygın olarak eksprese edilen 37-kDa laminin reseptör prekürsörü (37LRP), CNF1 için bir etkileşim ortağı olarak tanımlanabilir (178). 37LRP'nin 67 kDa laminin reseptörü için bir prekürsör protein olduğu bilinmektedir. CNF1 ile yapılan bağlama çalışmaları, invaziv *E.coli* K1'de 67-kDa laminin reseptör kümelerinin ortaya çıktığını ortaya koymuştur. Bu kümelenme, bu patojenlerde CNF1 ekspresyonundan kaynaklanır ve hücrelere invazyonlarını teşvik eder (179). Bununla birlikte, CNF1 ve CNFY ile yapılan kompetisyon çalışmaları, CNF1'in laminin reseptörüne ek olarak bir ko-reseptöre sahip olduğunu belirtmektedir. Heparansülfat proteoglikan (HSPG) ekspresyonunun inhibisyonu, CNF1'in yavaşlamış (uzun etkili) hücre girişine neden olur ve CNFY alımını gerektirmez (180). Böylece, HSPG'ler sırasıyla CNFY için reseptörü ve CNF1 için co-reseptörü temsil edebilir. Bu bulgu, sırasıyla CNF1 ve CNFY tarafından intoksike edilen farklı hücre spektrumu ile de tutarlıdır. Dahası, yakın tarihli bir araştırma, 683 ila 730 aminoasitlerini içeren CNF1 dizisi içindeki ikinci bir reseptör bağlayıcı kısmı nedeniyle CNF1 için bir ko-reseptör daha olduğunu ileri sürmektedir (181).

CNF1 ve CNFY'nin veziküller içine alınması, kathrin ve kaveolin'den bağımsızdır (176, 180). İçselleştirilmiş veziküller vakuoler tip H<sup>+</sup>-ATPaz (v-ATPaz) ile pH 5.5-6.0 arasında asitleştirilir. Erken endozomal pH'nın düşürülmesi, toksin translokasyonunda önemli adımlarından biridir. Bu, diğer birçok AB tipi toksin için de gösterilmiştir. Endozomal asidifikasyon, veziküler proton pompalarını inhibe eden *Streptomyces griseus*'un bir bileşimi olan bafilomisin A1 tarafından bloke edilebilir (182). Endozomal asidifikasyonun önlenmesi, kültür hücreleri üzerine CNF aktivitesinin tam inhibisyonuna yol açar (176).

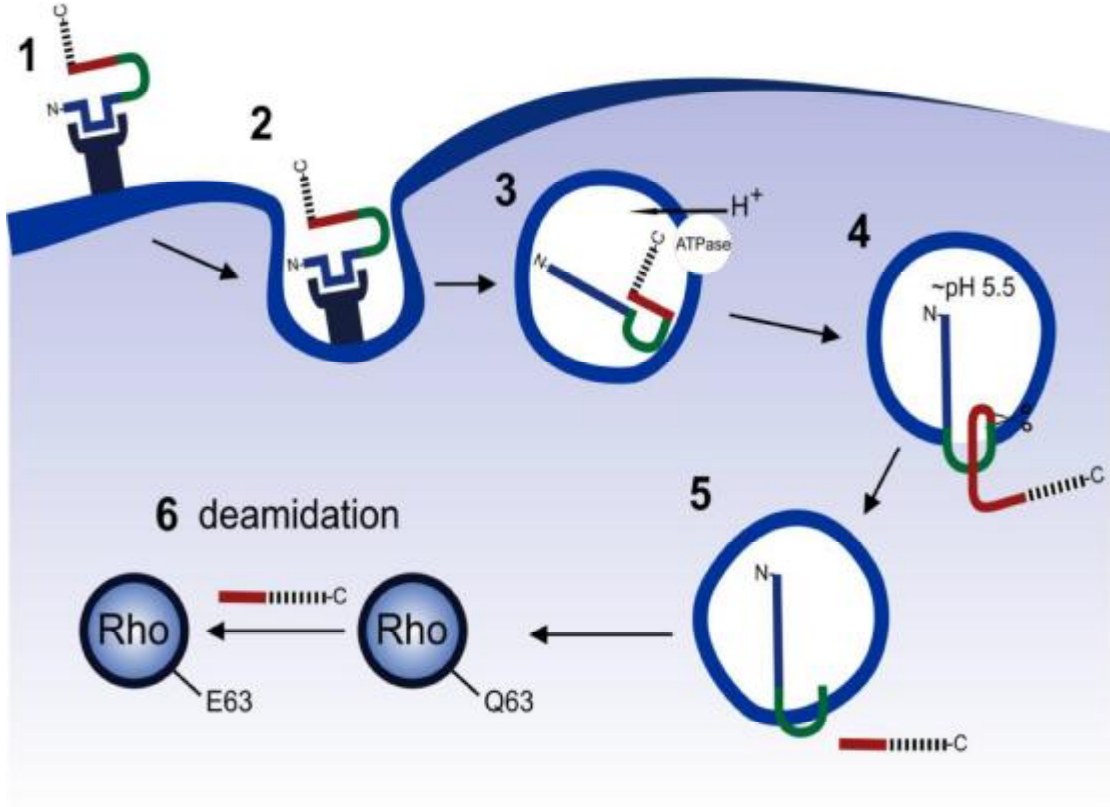
CNF1'in hidropati profili reseptör bağlayıcı ve katalitik domain (aa 300-400)



arasında potansiyel bir transmembran domaini gösterir. CNF1 primer yapısının difteri toksini (DT) ile karşılaştırılması DT'deki transmembran helezonları TH8 ve TH9'a göre iki kısa membran helikal H1 (350-372) ve H2 (387-412) varlığını işaret eder (183 ). H1 ve H2'yi ayıran hidrofilik lup, toksinin konak hücre sitosolüne translokasyonu için şarttır. Difteri toksini modeline göre endozomdaki asidik ortam, toksinin konformasyonel değişimine neden olur. Bu, translokasyon alanındaki hidrofobik bölgelerin maruziyetini zorlar (184).

Tesadüfen, lup bölgesinde bulunan asidik artıklar protonlanır ve endozomal membran içine heliks 1 ve heliks 2'nin insersiyonunu teşvik eder. Bu modele göre, lup bölgesinde asidik aminoasitlerin mutasyonları, toksin aktivitesinin azalmasına neden olur. Lup bölgesindeki bu rezidülerin sırası ve yükü, CNF1 translokasyonu için önemlidir (183).

CNF'lerin hedefi olan Rho GTPazlar sitozolde ve plazma zarında bulunur. Bu nedenle, katalitik domainin endozomal membrandan salınması gerekir. Endositozu takiben, CNF1'in katalitik domaini koparılır. Ayrılma bölgesi, bilinen proteaz alanlarına herhangi bir dizi benzerliği göstermeyen bir sekansta, 536 ve 542 aminoasitleri arasında bulunur (185). Bununla birlikte, serin proteaz inhibitörleri CNF1 deamidasyon aktivitesini ve bunun işlenmesini önleyebilir. Diğer AB toksinlerinden farklı olarak, otokatalitik bölünme tanımlanmadı, bu da bir endozomal proteazın CNF1 işleme sürecine karışabileceğini göstermekteydi. Kırılma bölgesinde eksik olan CNF1 mutantlarıyla yapılan deneyler, katalitik kısmın endozomlardan işlenip salınımının, tam biyolojik aktivite için esas olduğunu açıkça göstermektedir. Muhtemelen, bu salınım geç endozomlardan kaynaklanmaktadır. Erken endozomdan geç endozoma kadar olgunlaşma için gerekli olan mikrotübüllerin yok edilmesi, zayıf CNF1 toksisitesiyle sonuçlanır (176, 180).



Şekil 2. 6.CNF1'in hücresel alınımı (173)

(1) CNF1 N-terminusu vasıtasıyla 67 kDa laminin reseptörüne bağlanma. (2) Reseptör aracılı endositoz. (3) Erken endozomun asidifikasyonu. (4) Asidik ortamdan dolayı CNF1'in konformasyonel değişimi ve translokasyon domainin veziküler zar içine sokulması. (5) Toksinin bir serin proteaz tarafından kırılması ve katalitik olarak aktif C-ucunun salınması, (6) CNF1 tarafından Gln63 /61'de Rho proteinlerinin deamidasyonu (183).

#### 2.1.3.4.CNF'nin Hücresel Atılımı

Çoğu araştırma, PCR ile bakterilerde *cnf* varlığını ispatlamaktadır. Eksprese edilen protein miktarı çok düşüktür. Bu nedenle, bakteriden CNF'nin atılımı hakkında çok az şey biliniyor olabilir. CNF1 dizisinde hiçbir tipik sinyal peptidi bulunmamaktadır. İki grup, CNF1'in bakterilerden dış zar vesiküllerine sıkı sıkıya bağlı çevreleyerek ortama salındığını gösteriyor. Bu CNF1 içeren veziküller, biyolojik açıdan aktif CNF1'i memeli hücrelerine aktarır (186, 187). Menenjit oluşturan *E.coli*'de CNF1'in salgılanması için genetik determinantları araştıran Yu ve Kim, ferredoksinin

bakteri iç zarındaki CNF salınımı için gerekli olduğunu öne sürmektedir (188). Bununla birlikte, CNF'lerin kesin transport mekanizmasının analiz edilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak Rho GTPazlar, hücre iskeletinin ana düzenleyicileri olup esasen hücre göçü, adezyon, polarite, hücre bölünmesi, nöronal plastisite ve diğer birçok hücrel işlevlerde rol alır. Bu nedenle Rho GTPazlar çeşitli bakteriyel protein toksinlerinin hedefi olabilirler. Bu toksinler, Rho proteinlerini inhibe eder veya uyarırlar ve ökaryotik hedef hücrelerdeki aktif ve inaktif formlarının modelini ve oranını modüle ederler ve/veya Rho GTPazların ekspresyonunu ve hücrel kaderini değiştirirler. İlginç bir şekilde, Rho proteinlerinin inhibisyonunun, güçlü aktivasyonun yaptığı gibi, bakteri sağkalımı için aynı faydalı etkilere aracılık ettiği görünmektedir. Bakteriyel protein toksinleri bu arada geniş çapta analiz edilmekte ve Rho GTPazların fonksiyonlarını incelemek için önemli hücre biyolojik araçları olarak kullanılmaktadır. Rho deamidasyon toksinleri ailesi için bir prototip olarak CNF1'in hücrel girişi hakkında çok şey bilinmektedir. Bir hücrel protein reseptörüne bağlanır ve endositozu takiben serbest bırakılır ve sitozol içinde kırılır. CNF'lerin moleküler etkisi bilinmekte olup ve yapı fonksiyonu ilişkisi geniş olarak karakterize edilmektedir. CNFler esas olarak GTP hidrolizi için gerekli olan spesifik bir glutamin deaminasyonu vasıtasıyla Rho GTPazları aktif hale getirirler. Substrat özgüllüğü, farklı CNF izoformları arasında değişir. Rho proteinlerinin doğrudan aktivasyonu terapötik açıdan önemli olabilir ve öğrenmeye-hafızaya veya acıya etkisi açısından CNF1'i kullanmaya yönelik ilk girişimler yapılmıştır (189,190).

#### **2.1.4.Cytolethal Distending Toxins (CDTs)**

Çeşitli Gram-negatif patojen bakteriler tarafından üretilen CDT'ler, hedef hücrelerde DNA hasarına neden olduklarından, tanımlanan ilk bakteri genotoksinleridir. CDT, CdtA ve CdtC altbirimlerinin hedef hücrelerin yüzeyindeki bağlanmaya aracılık eden ve fonksiyonel olarak memeli deoksiribonükleaz I'e homolog olan aktif CdtB altbiriminin internalizasyonuna izin veren bir A-B<sub>2</sub> toksinidir. Yüzey reseptörünün doğası hala zayıf karakterizedir. Ancak CDT'nin bağlanması bozulmamış lipid bariyerlerini gerektirir ve dynamin'e bağımlı endositoz yoluyla internalizasyonu meydana gelir. Toksin, golgi kompleksi ve endoplazmik retikulum vasıtasıyla retrograd taşınır ve daha sonra toksik aktivite uyguladığı nükleer bölüme aktarılır. Hücrel intoksikasyon DNA

hasarına ve DNA hasar yanıtlarının aktivasyonuna neden olur. Bu durum hücre döngüsünün G1 ve/veya G2 fazlarındaki hedef hücrelerin arresti ve DNA tamir mekanizmalarının aktivasyonu ile sonuçlanır. Zararı onarmayı başaramayan hücreler yaşlanır ya da apoptozise uğrar.

CDT'ler; *E. coli*, *Aggregatibacter aktinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi*, *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter* sp., *Helicobacter* sp. ve *Salmonella enterica* gibi çeşitli Gr (-) bakteriler tarafından üretilen bir bakteriyel protein toksini familyasını içerir. CDT ve Colibactin kommensal *E. coli* suşları (191) tarafından üretilen varsayımsal bir hibrid peptid-poliketit genotoksin olan, hedef hücrelerde DNA hasarına neden olan benzersiz karakteristiğe sahip ilk bakteri genotoksinleridir. Bugüne kadar, sekiz tür-spesifik Cdt's teyit edildi. EcCdt (*E. coli* Cdt), çeşitli üyelerin cdt genleri klorozda, plazmitlerde veya bakteriyofajlarda bulunan bir alt aileyle temsil edilir. EcCdt'nin beş tipi, nükleik asit dizisi farklılıklarına dayanarak tanımlanmıştır (192, 193). AB toksinlerinin diğer sınıflarına kıyasla, Cdt alt grubu birkaç benzersiz özellik sergilemektedir:

(i) cdt genleri, birden çok Gram-negatif bakteri tarafından taşınır ve ifade edilir; (ii) cdt genleri büyük olasılıkla cinsler ve türler arasında horizontal gen aktarımı yoluyla yayılır; (iii) üç alt birimden türetilen amino asit dizileri ökaryotik proteinler veya polipeptidlere filogenetik ilişkilere sahiptir; (iv) cdt kompleksi, iki heterojen A altbirimi CdtA ve CdtC'yi (diğer AB toksinlerinde B zincirine eşdeğerdir) içerir; (v) cdtB altbirimi (diğer AB toksinlerinde A zincirine eşdeğerdir) birden fazla enzimatik aktivite sergileme potansiyeline sahiptir ve bu nedenle farklı hücresel prosesleri veya yolları etkileyebilir. (vi) cdt'nin majör etkisi, toksin hücre çekirdeğine girdiğinden ve konak hücre DNA'sına zarar verdiği için bir genotoksin eylemidir; (vii) cdt dolaylı olarak hücre döngüsünü düzenleyerek bir siklomodulin olarak davranır.

CDTler, ökaryotik hücre döngüsünü manipüle edebilen bakteriyel efektör molekülleridir (194). Bu toksinler, reseptör tanıma ve hedef hücrelerin çekirdeğine katalitik alanın verilmesi için gerekli olan katalitik alan (CdtB) ve taşıyıcı alt birimlerden oluşur (195). CdtB, hücresel DNA hasar sinyali yollarını aktive eden kromatin hasarına neden olur (196). CDT intoksikasyonuna karşı en yaygın olarak bildirilen yanıt, hücre döngüsünün geri döndürülemez bir blokajdır ancak CDT'lerin etkisi, hücre türüne (örn: Nekroz ve apoptozise) bağlı olarak değişir (197, 198). Bir

takım ExPEC suşları CDT'ler için pozitif olmasına rağmen, bu suşların patogeneziindeki fonksiyonları bilinmemektedir.

#### 2.1.4.1.CDT yapısı ve enzimatik aktivitesi

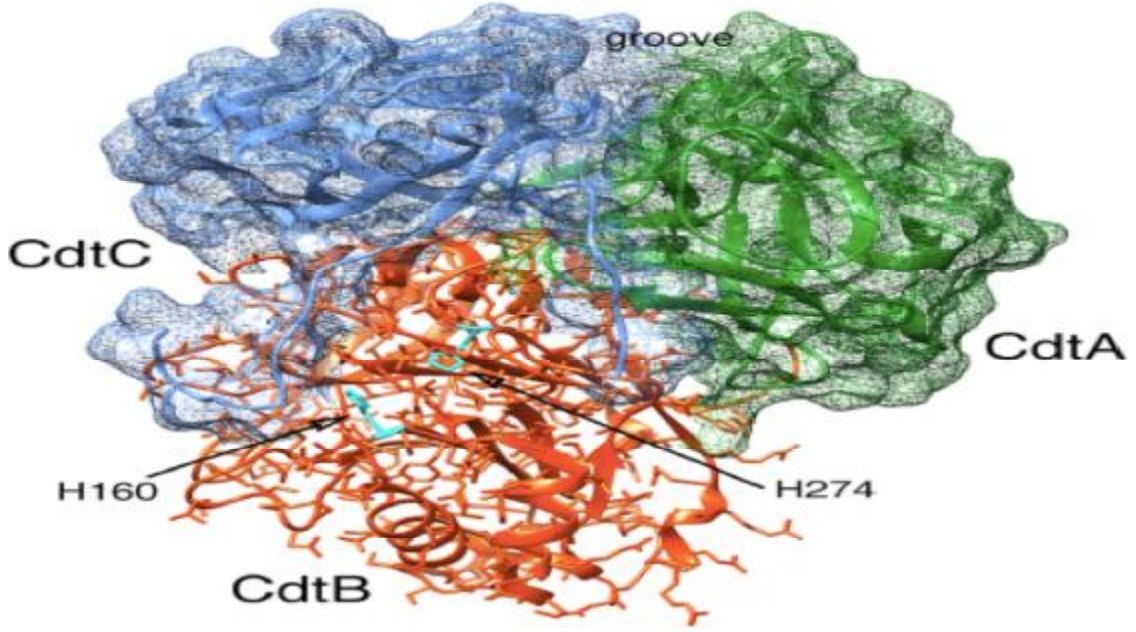
CDT üç proteini kodlayan bir operonun ürünüdür: CdtA, CdtB ve CdtC. Üç alt ünite, holotoksinin tam aktivitesini vermek için şarttır (199) (Şekil 2.7).

CdtB, CDT holotoksininin aktif alt birimi olarak düşünülür. CdtB'nin CdtA veya CdtC içermeyen duyarlı hücrelere mikro injeksiyonu, G2/M hücre döngüsünün durması ve CDT'nin sitoplazmik distansiyon karakteristiği ile sonuçlanır (200). CdtB'nin yapısı farklı bakteriler arasında iyi korunmuştur. CdtB altbirimi türler arasında sıralı olarak korunmuştur (201). CdtB'nin molekül ağırlığı, türe bağlı olarak 28 kDa ila 29 kDa arasında değişir (202). Aktif alt birim olarak CdtB, AB toksini modeline göre "A" alt birimi olarak adlandırılır (203).

CDT'nin kristal yapısı Nesic ve arkadaşları tarafından çözülmüş ve holotoksinin üçlü bir kompleks olduğunu ortaya koymuştur. CdtA ve CdtC altbirimleri, lektin tipi moleküller olup, bitki toksini risininin B-zinciri tekrarlarıyla yapısal homoloji göstermektedir. CdtB altbirimi, DNase I familyasının kanonik (standart) dört katmanlı tabakasını benimser (4). Kristal yapı, CdtB'nin memeli DNaz I'in aktif bölgesi ile beş korunmuş kalıntıyı paylaştığını ve in vitro olarak ve ektopik olarak ökaryotik hücrelerde mikro-enjekte edildiğinde DNAaz kapasitesine sahip olduğunu gösteren önceki verileri doğrular. Katalitik aktivite veya  $Mg^{2+}$  bağlanması için önemli olan herhangi bir korunmuş rezidüde mutasyon, CdtB'nin in vitro DNA'yı parçalamasını ve in vivo DNA hasar yanıtlarını indüklemeye kabiliyetini ortadan kaldırır (203-206).



Şekil 2. 7. CDT operon (207)



Şekil 2. 8. CDT protein yapısı (208)

CdtB altbirimi, tüm CDT üreten bakteriler arasında holotoksin'in en çok korunan bileşenidir. CdtA ve CdtC homologlarının tüm sekans benzerlikleri genel olarak %30'dan azdır. Bununla birlikte, EcCDT kristal yapısına dayanan modelleme çalışmaları, bir takım yapısal özelliklerin kayda değer ölçüde korunduğunu göstermiştir; örneğin oluk ve aromatik yamanın oluşumunda CdtA ve CdtC alt birimlerinin yakın etkileşimi ve ricin B zincirindeki iki lektin tekrarıyla konumlarının benzerliği gibi. Bu, CDT'nin bu iki bileşenin, hücre yüzeyinin bağlanmasına ve holotoksinin içselleşmesine aracılık etmek için birlikte çalıştığını ortaya koymaktadır (209).

Bu verilere dayanarak CDT, A-B2 toksini olarak kabul edilebilir, burada CdtA ve CdtC, holotoksini hedef hücrelerin plazma membranına bağlamak için gerekli olup, çekirdekte yer değiştiren ve DNA lezyonlarını indükleyebilen aktif CdtB'ye girmeye izin verir (209)( Şekil 2.8).

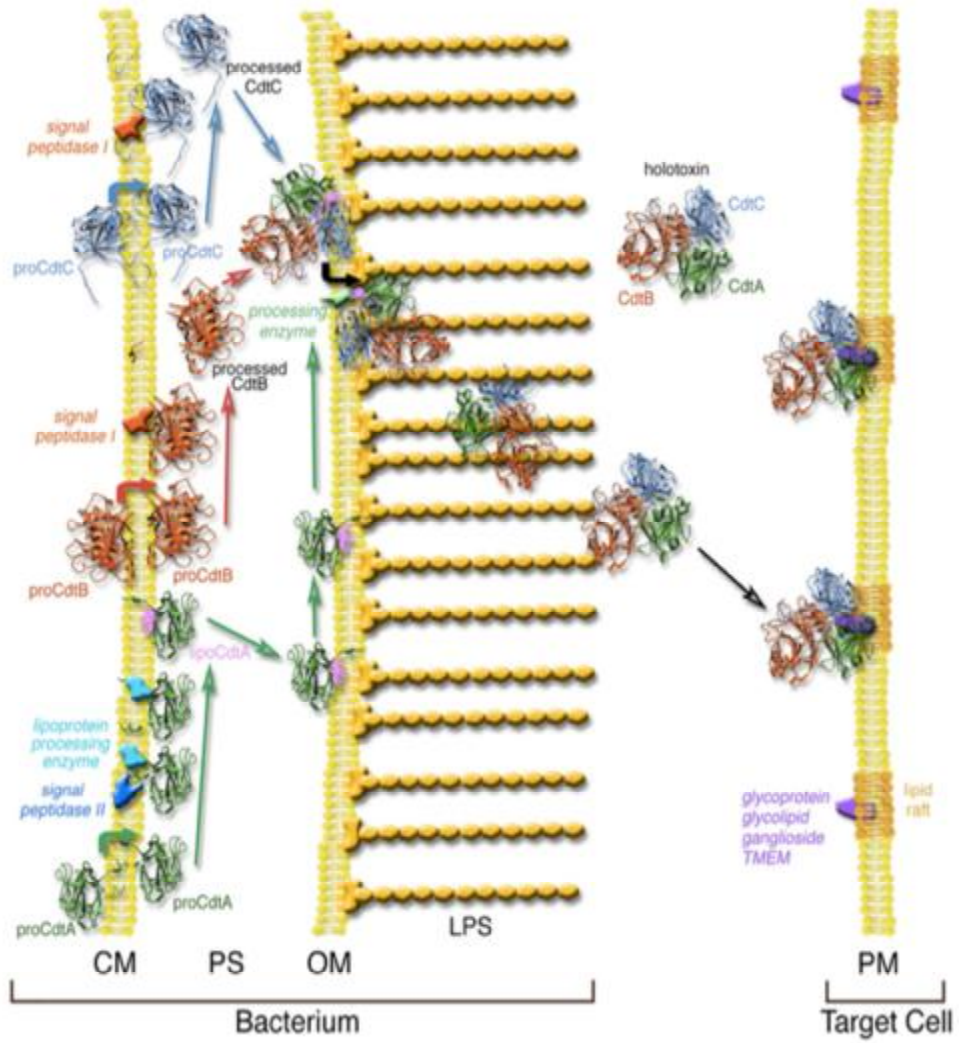
CDT biyogenezini incelemek için Ueno ve arkadaşları, cdtABC genlerini taşıyan bir *E. coli* suşu kullandılar. Membranla ilişkili CdtA'nın bir lipoprotein olduğunu göstermişlerdir. Periplazmada, CDT, CdtA, CdtB ve CdtC'den oluşan bir kompleks iken, kültür süpernatantındaki CDT, N-uçta kesik bir CdtA içerir. Bu, CdtA'nın, ihracat sürecinde lipid modifikasyonuna ve periplazmada CdtB ve CdtC ile kompleks oluşturduktan sonra N-terminalde işleme tabi tutulduğuna işaret etmektedir (210).

Dahası, EcCDT fukoza in vitro bağlar ve muhtemelen toksin reseptörüne bağlanmasını önleyerek, fukoza spesifik lektinler Ec-CDT aracılı hücre döngüsü bloke etmesini engeller. Bu bulgular, fukozun Ec-CDT için bağlayıcı bir belirteç olduğunu ileri sürmektedir (212).

#### **2.1.4.2.CDT sentezi ve sekresyonu**

Cdt sentezinin en ilginç özelliği, alt birimlerin hücre içinde bir araya toplanması (periplazmik boşluk) ve biyolojik açıdan aktif holotoksin olarak salgılanmasıdır. Üç alt-üniteden her biri, bir hidrofobik sinyal sekansı varlığına bağlı olarak sitoplazmik zar boyunca birbirinden bağımsız şekilde translokasyona tabi tutulmaktadır. Bu, salgılanan proteinlerin bakterilerin sitoplazmik zarı boyunca hareketi için standart bir mekanizmadır (211). Öncü proteinler hem sinyal peptidaz I'i hem de sinyal peptidazı II'yi içeren ortak bir yolla ihraç edilir (212). CdtA membrandan çıkarken, teorik bir lipoprotein işleme enzimi ile gliserolipid ile modifiye edilir.

*E. coli*'de CDT sentezi; üç alt birimin her biri, *E. coli* sitoplazmik zarını (CM) zikzak çizerek geçer ve bir sinyal sekansının çıkarılmasından sonra periplazmik boşluğa (PS) ulaşır. CdtA proteini dış zar (OM) üzerine bağlayan lipid ile modifiye edilir. Alt birimler kendiliğinden bir araya getirilir ve holotoksin, CdtA'dan lipidin çıkarılmasıyla membrandan salınır. Holotoxin, hücrenin dışında, muhtemelen, plazma membranında (PM) reseptör aracılı bir süreç yoluyla duyarlı hücrelerin yüzeyine bağlanmanın serbest olduğu yerde birikir (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9. E. coli'de Cdt sentezi ve sekresyon modeli (219)

### 2.1.4.3.İnternalizasyon

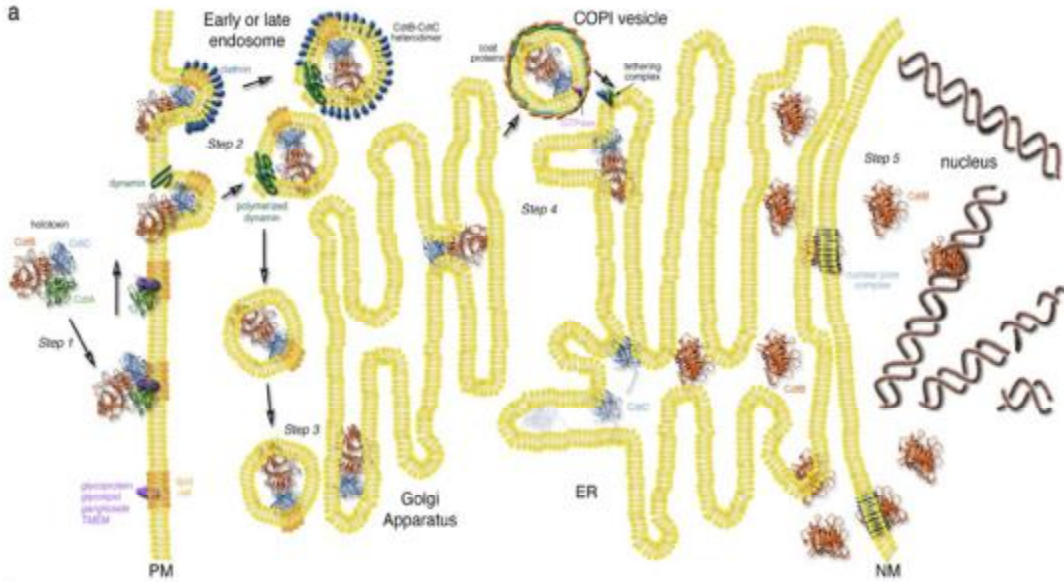
CDT, hedef hücrenin nükleusunda rol oynadığı bilinen ilk bakteriyel protein toksindir. Önceki paragrafta tartışıldığı gibi, plazma membranına bağlanma intoksikasyon için bir ön şarttır ve birçok diğer bakteriyel protein toksini gibi, CDT de nükleusa ulaşmak için plazma membranını geçmelidir. Bir sülfasyon bölgesi ya da bir sülfasyon ve üç ucu kısmen örtüşen C-ucunda N-bağlantılı glikozilasyon bölgeleri modifiye edilmiş bir CdtB altbirimine sahip bir holotoksin kullanılarak; aktif altbirim, sülfasyon meydana geldiğinde trans-golgi yoluyla transitleştiğini ve glikozile olduğu endoplazmik retikül (ER) vasıtasıyla retrograd translokasyona tabi tutulduğunu göstermek mümkündür (206). Birçok ER-translokasyon toksini, ER ile ilişkili



degradasyon (ERAD) yolağını ER'den sitozole geçmek için kullanır. Bununla birlikte, CDT intoksikasyonu, değişmiş bir ERAD sistemi taşıyan hücrelerde oluşur ve translokasyonu protein aılımlını gerektirmez (206, 217). Bütün bu veriler, muhtemelen CDT'nin aktif altbiriminin doğrudan ER'den çekirdeğe translokasyona uğradığını, bunun genotoksik aktivitesini uyguladığını göstermektedir (217).

CdtB alt biriminin nükleer translokasyonu nasıl gerçekleştiği hala açık bir sorundur. Nishikubo ve arkadaşları AaCdtB'nin amino terminal bölgesinde rekombinant His-işaretli CdtB-GFP'nin nükleer translokasyonu için gerekli olan atipik nükleer lokalizasyon sinyalinini (NLS) tespit ettiler. CdtB'nin NLS dizisindeki 11 amino asitin silinmesi intoksikasyonu ortadan kaldırır (218). Öte yandan, EcCdtB-II'nin karboksi-terminal bölgesinde NLS1 ve NLS2 olarak adlandırılan iki NLS dizisi tanımlanmıştır. Bu iki bölgenin silinmesi, in vitro deneylerde test edildiği gibi, DNase aktivitesini etkilemeden hücre döngüsünün durdurulması indüksiyonunu ve holotoksin'in nükleer lokalizasyonunu engeller (219).

Özetle internalizasyon CdtA altbirimi membran lipid bariyerlerinde varsayılan bir reseptöre bağlandıktan sonra yüzeyde kalır. Bir CdtB-CdtC heterodimeri, kltrin bağımlı veya bağımsız endositoz ile hücrenin içine girer. Endozomal veziküller, dynamin'in polimerizasyonu ile oluşur. Ya erken ya da geç endozomlar, CdtB-CdtC kompleksini Golgi'ye verirler. Toksinin enzimatik olarak aktif altbirimi olan CdtB, retrograd taşıma ile Golgiden ER'ye taşınır. Golgi kaynaklı COPI veziküller yüzeyini, GTPaz'ın yüzey proteinlerine bağlanması için coat proteinleri ile kaplar. Bağlayıcı bir kompleks tarafından ER'ye yönlendirilen COPI veziküller, ER zarıyla kaynaşırlar. CdtC proteini ER'de bozunur. Bununla birlikte, CdtB, endoplasmik retikulum ile ilişkili bozulma (ERAD) ya da ERAD olmayan yol ile ER'den translokasyona tbi tutulur. CdtB muhtemelen çekirdeğe, proteindeki bir NLS dizisini tanıyan bir nükleer gözenek kompleksi yoluyla girer. Bununla birlikte, CdtB'nin önce ER'den sitozole girmesi ve daha sonra bir nükleer gözenek kompleksi yoluyla nükleer zarı geçmesi olasıdır. CdtB, ekirdekte DNA'ya bağlanır ve tek ve çift sarmal kırılmalar getirerek DNA hasarını başlatır (şekil 2.10).



**Şekil 2. 10.** Memeli hücrelerinde Cdt toksikasyonunun mekanik modeli ve benzersiz özellikleri (219).

CDT proteini diğer AB2 protein toksinlere göre benzersiz bazı özelliklere sahiptir. i-bozulmamış holotoksin yerine CdtB ve CdtC'nin endositozu, (ii) erken endozom oluşumuna dynamin II katılımı, (iii) CdtB'nin ER'ye bağlı olmayan degradasyon (ERAD) yolu ile translokasyonu ve (iv) CdtB'nin bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) vasıtasıyla nükleer zar boyunca translokasyonudur (Şekil 2.10).

### 2.1.5. Tedavi

ExPEC suşları, daha çok toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarından sorumlu olmakla birlikte, hastane enfeksiyonu etkeni de olabilmektedir. Toplumdan kazanılmış ve yatan hastalarda gelişen çeşitli *E. coli* enfeksiyonlarında antibiyotik duyarlılıkları farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca bu enfeksiyonlarda tedavinin genellikle ampirik olarak başlatılması ve buna bağlı olarak da artan direnç problemi sebebi ile etkenlerin antibiyotik duyarlılıklarının bilinmesi gerekli hale gelmiştir (29). Dünya genelinde çeşitli yöntemlerle yapılan çok merkezli çalışmalarda farklı coğrafik bölgelerde *E. coli* suşlarında GSBL üretiminin %1-74 arasında değiştiği bildirilmektedir. Üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde en fazla kullanılan antimikrobiyaller amoksisilin, trimetoprim-sulfametoksazol, aminoglikozitler, sefalosporinler ve kinolonlardır (30).

Sistit tedavisinde birinci seçenek kotrimaksazoldür, ancak dirençli suşlarla gelişen

tabloda tedavi alternatif olarak kinolon grubu ile (norfloksasin, ofloksasin, ciprofloksasin) sağlanmaktadır (31) *E. coli* suşları arasında tüm önemli antibiyotik sınıflarına direnç mekanizmaları bulunmaktadır. Bu TEM, SHV, CMY, CTX-M türleri de dahil olmak üzere geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz (penisilinler ve sefalosporinler) ve karbapenemaz (NDM-1, oksa-48 tipi) üretimini içerir. Özellikle CTX-M-15 ExPEC arasında en sık görülen GSBL' dir (32). Florokinolonlara ve Aminoglikozidlere direnç plasmid veya kromozomal olarak kodlanmış transferazlar, ya da hücre içine antimikrobiyal alımını azaltma mekanizmaları ile gerçekleşir. *E. coli* O25b:ST131 dahil yeni dirençli ExPEC klonlarının, hızlı yayılması, ekstra-intestinal hastalığın lokalize salgınlarına yol açtığı bilinmektedir. Antibiyotiğe dirençli *E. coli* suşları giderek yaygınlaşmaktadır<sup>102</sup>. Antibiyotik dirençli ExPEC suşlarına bağlı İYE olguları tedavi süresini uzatmakta, prostat biyopsisi sonrasında komplikasyonları artırmakta ve bakteriyemili hastalarda kötü sonuç için bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle çalışmalar bakterinin antijenik yapılarını (O-polisakkarit) hedef alan aşı üretimine yönelmiştir. Son 15 yılda ExPEC ile ilişkili enfeksiyonlar %17,8'den %65,3'e (211) yükselmiştir. İdrar yolu enfeksiyonuna yol açan ExPEC suşlarında genellikle Genişletilmiş Spektrum  $\beta$ -laktamaz (ESBL) direnci vardır. ESBL üreten *E. coli*'lerden dolayı toplum kökenli idrar yolu enfeksiyonu insidansı dünya çapında artmıştır.

#### **2.1.6. Korunma ve Kontrol**

*E. coli* insan ve sıcak kanlı hayvanların kommensal olarak barsak florasında bulunması nedeni ile oldukça yaygın olup, et ve et ürünleri tüketimi ve su kaynaklarında çok hızlı üremesi sebebiyle bulaş yolları oldukça fazla ve korunması oldukça zordur. Ancak hijyen kurallarına uyulması, temiz su ve gıda özellikle az pişmiş et ve et ürünlerinin tüketilmemesi gibi önlemler korunmada faydalı olabilir. Bunların yanında ExPEC'ten korunmada adezinler, dış membran proteinleri ve detoksifiye edilmiş lipidA/lipopolisakkaritlerin kor sakkaritleriyle kombine polivalan subunit aşı ExPEC enfeksiyonlarının engellenmesi için geliştirilmesi önerilmektedir (29).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışmamızda Çukurova Üniversitesi Merkez Laboratuvarı da dahil olmak üzere bölge hastanelerinden Eylül 2014-Nisan 2016 tarihleri arasında çeşitli klinik ve polikliniklerden gönderilen intestinal sistem dışı enfeksiyonlara ait klinik materyallerden izole edilen 645 ExPEC suşu ile çalışılmıştır. Çalışmaya dahil edilen izolatlar konvensiyonel kültür yöntemleri, biyokimyasal testler (IMVIC) ve moleküler yöntemler (PCR) kullanılarak *E.coli* olduğu fenotipik ve genotipik olarak doğrulandıktan sonra ExPEC suşlarına ait CNF-1, CNF-2, CNF-3 ve CDT-1, CDT-2, CDT-3, CDT-4 toksin-faktör genlerini tespit etmek amacıyla bilinen gen bölgelerini hedef alan primerler kullanılarak PCR yöntemine tabii tutulmuştur ve PCR ile aynı genotipe sahip olduğu tespit edilen izolatlar arasındaki filogenetik ilişki PFGE yöntemiyle değerlendirilmiştir.

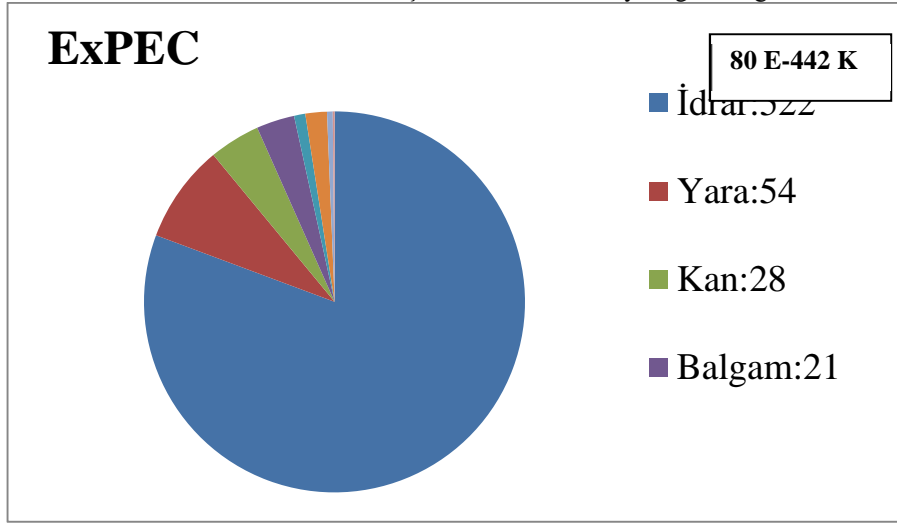
#### 3.1. Test Suşlarının; Klinik Materyale Göre Dağılımı

Çalışmamızda Çukurova Üniversitesi Merkez Laboratuvarı da dahil olmak üzere bölge hastanelerinden Eylül 2014-Nisan 2016 tarihleri arasında çeşitli klinik ve polikliniklerden gönderilen intestinal sistem dışı enfeksiyonlara ait klinik materyallerden izole edilen 645 ExPEC suşu ile çalışılmıştır. Bu 645 ExPEC suşunun 387'si ayaktan, 129'u ise yatan hastadan izole edilmiştir (Tablo 3.1). Örneklerin çoğu idrar olup en fazla örnek üroloji ve pediatri polikliniğinden alınmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.1. Toplum ve hastane kaynaklı ExPEC dağılımı

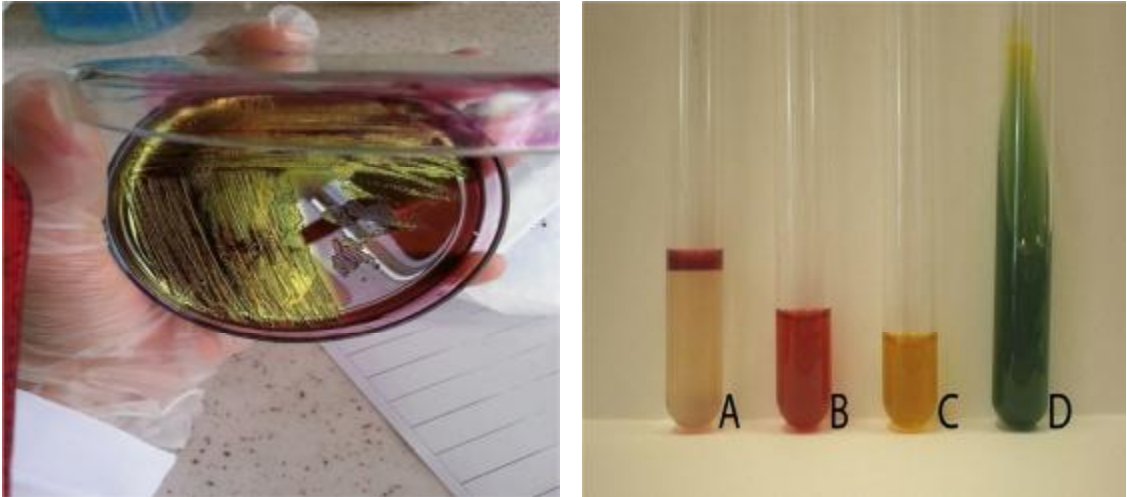
ExPEC	n
TK-ExPEC (Ayaktan)	387
HK-ExPEC (Yatan)	129
Toplam	645

**Tablo 3.2.** ExPEC suşlarının klinik materyale göre dağılımı



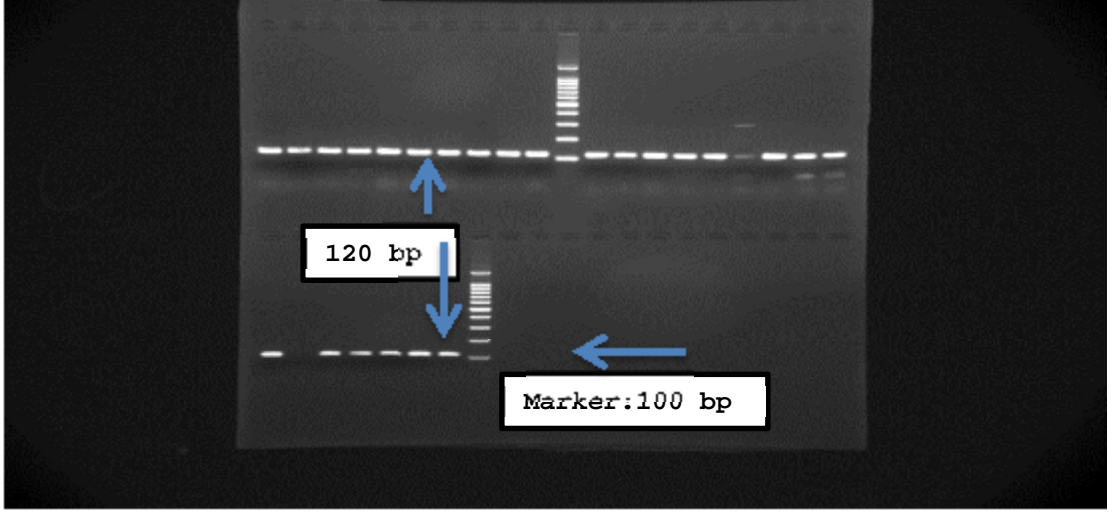
### 3.2. Test Suşlarının Çoğaltılması, Fenotipik ve Genotipik Özelliklerine Göre İdentifikasyonu

Test suşları %5 kanlı agar, ENDO agar ve EMB besiyerine ekilip, 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Suşlar IMVIC testi ile fenotipik olarak tanımlandıktan sonra genotipik olarak da *E. coli*’de yapısal olarak bulunan Beta-D-glukoronidaz enzimi kodlayan gen bölgesine PCR yöntemi ile bakılarak doğrulanmıştır (Şekil 3.1-3.2).



**Şekil 3.1.** *E. coli*’nin EMB agarda metalik refle vermesi ve IMVIC testi ile fenotipik olarak doğrulanması

Çalışmaya dahil edilen *E. coli* suşlarının Beta-D-glukoronidaz enzimi kodlayan 120 bp'lik gen bölgesi (*uidA*) kontrol edilerek genotipik olarak doğrulanmıştır. (Şekil 3.9)



Şekil 3. 2. 120 bp'lik *uidA* gen bölgesine ait bant profilini gösteren jel görüntüsü

### 3.3. Çalışmaya Dahil Edilen ExPEC suşları ve Virülans Genlerinin Tespiti

#### 3.3.1. PCR Bazlı çalışmalar için DNA Ekstraksiyon ve Amplifikasyon işlemlerinde kullanılan kimyasal solüsyonlar ve Enzimler

##### TE Buffer

Tris HCl (SIGMA T-3253): 0,1576 gr

EDTA (AMRESCO 0105-500): 0,0372 gr

Distile Su:100 ml

(pH 8.0)

##### dNTP Karışımı

(25µmol her biri) (Fermentas R0181)

(2,5 mM herbiri, toplam 10mM)

dATP (100 mM): 25 µl

dCTP (100 mM): 25 µl

dGTP (100 mM): 25 µl

dTTP (100 mM): 25 µl

Distile su: 900 µl.  
-20°C' de saklandı.

### **Marker**

Gene Ruler 200bp DNA Ladder Plus (Fermentas SM0323)

Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas SM0323)

Gene Ruler 50bp DNA Ladder (Fermentas SM0323)

### **Taq DNA polimeraz enzimi**

(Fermentas EP0402) 5U/ µl

10X PCR tampon çözelti

25 mM MgCl<sub>2</sub>

### **10xTBE Solüsyonu**

Tris-base (SIGMA T-1503): 108gr

Borik Asit (MERCK 1.00165.0500): 55gr

EDTA (AMRESCO 0105-500): 7,44gr

(pH 8.4 ) ve Ultra pure su ile 1000ml 'ye tamamlandı.

### **Etidyum bromid**

Etidyum bromid (Sigma E8751) (1000X, 5mg/ml): 0,5g

Distile su: 100ml

Işıktan korumak için aliminyum folyo ile kaplandı. +4°C' de saklandı.

## **3.3.2.Genotipik identifikasyon**

### **3.3.2.1. DNA ekstraksiyonu**

DNA ekstraksiyonu amacıyla cam boncuklarla mekanik lizis prensibine dayalı çalışan MICKLE (The Mickle Lab.Engineering Co. Ltda, Gomshall, Surrey, UK) cihazı kullanılmıştır.

1. Saf olarak elde edilen örnekler distile su ile Mc Farland 5 bulanıklığında süspanse edildi.
2. Hazırlanan bakteri süspanسیونundan 500µl ependorf tüpe alınarak, 8000 xg de 3 dakika oda ısısında santrifüj (HERAEUS Biofuge Primo R) edildi.
3. Üst sıvı atılıp ve pelletin üzerine 500 µl TE buffer (10mM TrisHCl, 0.1 mM

EDTA, pH7.5) eklendi.

4. Daha sonra 100°C'de, 10 dakika kuru ısı bloğunda (BİOSAN Termoblock TDB-120) tutuldu.
5. 500 µl bakteri süspansiyonuna 150 µl boncuk (SIGMA) konuldu ve Mickle cihazında (Mickle Tissue Disintegrator, Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd.) maksimum hızda 7 dakika mekanik lizise uğratıldı.
6. 12.000 xg de 10 dakika santrifüj edildi.
7. 200 µl süpernatant alınıp ve yeni bir ependorfa aktarıldı.
8. Ekstraksiyonu tamamlanan örneklerle işlemin başarılı olup olmadığını test etmek için Spektrofotometre (CHEBIOS s.r.l. Optimum-One UV-VIS Spectrophotometer) ile 260nm'de DNA ölçümü yapıldı. Ekstraksiyon sonucu elde edilen DNA konsantrasyonu 0.1-1.2 µg/µl arası olan örnekler çalışmaya dahil edildi.

### 3.3.2.2. PCR Yöntemi ile Beta-D-Glukorinidaz Enzim Aktivitesi ile CDT ve CNF Toksin Genlerinin Belirlenmesi

Beta-glukorinidaz enzim aktivitesini kodlayan gen bölgesi *uidA* için PCR yönteminde; Abid and Zuwainy (221) uyguladıkları protokole uyularak çalışıldı. *E coli* türlerinde yer alan bölgenin amplifikasyonu için *uidAF* 5-ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGT-3 *uidAR*-5-AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG-3 (120 bp) primerleri kullanıldı. Amplifikasyon; 12.5µl master mix, 0.2 µl *uidA-F* ve 0.2 µl *uidA-R* primeri, 5 µl Kalıp DNA, 7.1 µl distile su ile totalde 25 µl PCR karışımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşamaları Termal cycler (APPLIED BIOSYSTEMS 2720 Termal Cycler) termal döngü cihazında aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı.

94°C'de 5 dakika İlk denatürasyon	} 30 siklusda gerçekleştirildi.
94°C'de 1 dakika Denatürasyon	
55°C'de 1 dakika Bağlanma(Annealing)	
72°C'de 1 dakika Uzama(Extension)	
72°C'de 10 dakika Son Uzama	
4°C' de ∞	



CNF toksin gen bölgesini kodlayan *cnf1*, *cnf2*, *cnf3* için PCR yönteminde; Dubois et al (222) uyguladıkları protokole uyularak çalışıldı. *ExPEC* türlerinde yer alan bölgenin amplifikasyonu için *cnf1F* 5-GGGGGAAAGTACAGAAGAATTA-3 *cnf1R* 5-TTGCCGTCCACTCTCACCAGT-3 (1111bp) primerleri, *cnf-2F* 5-TATCATAACGGCAGGAGGAAGCACC-3 *cnf-2R* 5-GTCACAATAGACAATAATTTTCCG-3 (1240bp), *cnf3F* 5-TAACGTAATTAGCAAAGA-3 *cnf3R* 5-GTCTTCATTACTTACAGT-3 (757 bp) primerleri kullanıldı. Amplifikasyon; 12.5µl 2X Phire Green Hot Start II PCR Master Mix, 0.2 µl CNF-*F* ve 0.2 µl CNF-*R* primerleri, 5 µl Kalıp DNA, 7.1 µl distile su ile totalde 25 µl PCR karışımı ile totalde 25 µl PCR karışımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşamaları Termal cycler (APPLIED BIOSYSTEMS 2720 Termal Cycler) termal döngü cihazında aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı.

94°C' de 5 dakika İlk denatürasyon	} 30 siklusda gerçekleştirildi.
94°C' de 1 dakika Denatürasyon	
55°C' de 1 dakika Bağlanma(Annealing)	
72°C' de 1 dakika Uzama(Extension)	
72°C' de 10 dakika Son Uzama	
4°C' de ∞	

CNF toksin gen bölgesini kodlayan *cdt1*, *cdt2*, *cdt3*, *cdt4* için PCR yönteminde; Toth et al (223) uyguladıkları protokole uyularak çalışıldı. *ExPEC* türlerinde yer alan bölgenin amplifikasyonu için *cdt1F* 5-CAATAGTCGCCACAGGA-3 *cdt1R* 5-ATAATCAAGAACCACCAC-3 (411bp) primerleri, *cdt2F* 5-GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG-3 *cdt2R* 5-TTTGTGTTGCCGCGCTGGTGAAA-3 (556bp) *cdt3F* 5-GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG-3 *cdt3R* 5-TTTGTGTCGGTGCAGCAGGGAAAA-3 (555bp) *cdt4F* 5-CCTGATGGTTCAGGAGGCTGGTTC -3 *cdt4R* 5-TTGCTCCAGAATCTATACCT-3 (350bp) primerleri kullanıldı.

Amplifikasyon; 12.5µl 2X Phire Green Hot Start II PCR Master Mix, 0.2 µl CNF-*F* ve 0.2 µl CNF-*R* primerleri, 5 µl Kalıp DNA, 7.1 µl distile su ile totalde 25 µl PCR

karişımı ile totalde 25 µl PCR karişımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşamaları Termal cycler (APPLIED BIOSYSTEMS 2720 Termal Cycler) termal döngü cihazında aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı.

94°C’de 5 dakika İlk denatürasyon  
94°C’de 1 dakika Denatürasyon  
55°C’de 1 dakika Bağlanma(Annealing)  
72°C’de 1 dakika Uzama(Extension)  
72°C’de 10 dakika Son Uzama  
4°C’ de ∞

} 30 siklusda gerçekleştirildi.

PCR sonucunda oluşan bant profilleri *cdt1*, *cdt2*, *cdt3*, *cdt4* ve *uidA* için %2’lik agaroz jelde 120 V’da yaklaşık 1 saat yürütülerek görüntülendi ve değerlendirildi. **cnf1**, **cnf2**, **cnf3** için %1,8’ lik agaroz jelde tek tarak kullanarak 120 V’da yaklaşık 2 saat yürütülerek görüntülendi ve değerlendirildi.

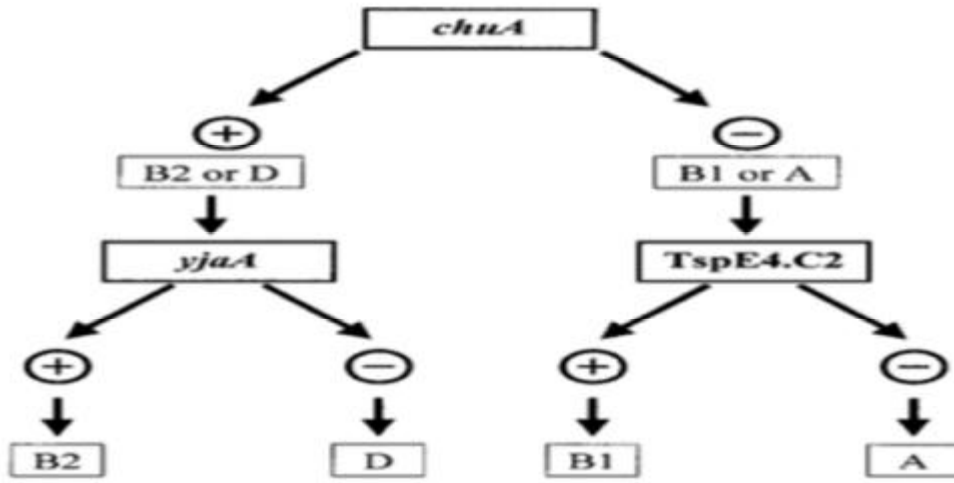
*E. coli* izolatlarının filogenetik sınıflandırılması için Clermont ve arkadaşlarının tripleks PCR-temelli filotipleme tekniği kullanıldı (224). Amplifikasyon için ChuAF 5 - GACGAACCAACGGTCAGGAT-3 ChuAR-5 TGCCGCCAGTACC AAAGACA-3, YjaAF 5 -TGAAGTGTCAGGAGACGCT G-3 YjaAR 5 - ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3 ve TspE4C2F 5 -GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3, TspE4C2R 5 -CGCGCCAACAAAGTATTACG-3, (sırasıyla 279-, 211-, and 152-bp fragmentler) primerleri kullanıldı. Amplifikasyon; 12.5µl master mix, 0.2 µl *uidA-F* ve 0.2 µl *uidA-R* primeri, 5 µl Kalıp DNA, 7.1 µl distile su ile totalde 25 µl PCR karişımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşamaları Termal cycler (APPLIED BIOSYSTEMS 2720 Termal Cycler) termal döngü cihazında aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı.

94°C’de 5 dakika İlk denatürasyon  
94°C’de 30saniye Denatürasyon  
55°C’de 30saniye Bağlanma(Annealing)  
72°C’de 30saniye Uzama(Extension)  
72°C’de 7dakika Son Uzama  
4°C’ de ∞

} 30 siklusda gerçekleştirildi.

PCR sonucunda oluşan bant profilleri *ChuA*, *YjaA*, *TspE4C2* için %2'lik agaroz jelde 120 V'da yaklaşık 1 saat yürütülerek görüntülendi ve değerlendirildi.

Sonuçlar, izolatların dört büyük filogrupdan (A, B1, B2 ya da D) herhangi birine sınıflandırılmasına izin verdi. Tüm amplifikasyon işlemleri en az üç kez tekrarlandı. Filogenetik gruplandırma, 3 DNA parçasının varlığı veya yokluğuna dayanarak aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi yapıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3. *ChuA* ve *yjaA* genlerinin ve *TSPE4.C2* DNA fragmanının PCR amplifikasyonunun sonuçlarını kullanarak bir *E. coli* suşunun filogenetik grubunu belirlemek için ikili karar ağacı (224).

### 3.4. Klonal ilişkinin *XbaI*-PFGE ile araştırılması

İzolatlar arasındaki filogenetik ilişkinin değerlendirilmesinde Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) yöntemi ile Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA (RAPD) yöntemi kullanılmıştır. Moleküler epidemiyolojik çalışmalar, hastanelerde ve toplum içinde enfeksiyon etkenlerinin yayılma dinamiğini anlama ve kontrol etmede PFGE, moleküler epidemiyolojik yöntemler arasında tiplendirebilirliği, tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü ile öne çıkan, kullanılabilen uygun bir yöntemdir bununla birlikte RAPD yönteminin de kullanılabilirliği çalışmamızda değerlendirilmiştir.

#### 3.4.1. *XbaI*-PFGE Protokolü

Çalışmamızda ExPEC suşlarının klonal ilişkisini tespit için kullandığımız ve altın

standart olarak kabul edilen PFGE yönteminde klinik materyallerden en sık izole edilen gram negatif çomaklar olan *Klebsiella*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *Acinetobacter* (KEPA) için kullanılan protokol uygulanmıştır.

#### **3.4.1.1. İzolatların hazırlanması**

- 1- Biyokimyasal ve/veya moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış bakterilerden tek koloni ekimi yapıldı.
- 2- Bir gecelik inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edildi.
- 3- Buradaki tek koloniden tekrar uygun besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde, pasaj yapılarak 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
- 4- Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, tüplerde 2 ml Hücre süspansiyon tamponu (HST) ile süspansiyon edilerek bakteri yoğunluğu yaklaşık McFarland 5-6 bulanıklığı olacak şekilde ayarlandı.
- 5- 1ml bakteri süspansiyonu 13000g x 3dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine 1ml HST eklenerek ve pipetaj yapıldı.

#### **3.4.1.2. İzolatların agaroz gömülmesi**

- 1- HST içerisinde %2' lik low melting agaroz hazırlandı. 0.2 g agaroz, 10 ml'lik balona konularak üzerine 9 ml HST eklendi, yavaşça karıştırılarak agarın erimesi sağlandı. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutuldu, çıkarıldıktan sonra hafifçe karıştırıldı ve tekrar 2-3 saniye mikrodalga fırınında tutuldu. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlandı. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosuna konuldu. %10 sodyum dodesil sülfat solüsyonundan 1 ml eklenerek ependorf tüplere, 200 µl dağıtıldı ve 45-50°C'deki su banyosunda (veya kuru ısı bloğunda) bakteri süspansiyonundan eklenene kadar bekletildi.
- 2- Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenip altları bantla kapatıldıktan sonra buz kalıplarına oturtularak -20 °C 15-20 dk bekletildi.
- 3- Bakteri süspansiyonundan (ependorflara dağıtılan agaroz miktarı ile eşit olacak şekilde 150-200 µl) 200 µl alınarak, 50°C'de tutulan ve içerisinde 200 µl düşük erime ısıları agaroz bulunan tüpe eklendi. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlandı

- 4- Bekletilmeden, hücre-agaroz karışımından 100 µl hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına dağıtıldı.
- 5- Kalıplar, agaroz katılacağına kadar +4°C'de, 20-30 dakika bekletildi. Bu aşamada agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir. Böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, agarozun homojen katılması sağlanmaktadır.

#### **3.4.1.3. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması**

- 1- 5 ml'lik steril kısa kapaklı tüplere, her örnek için 0,5 ml Lizis I solüsyonu konuldu ve 1,5mg/ml proteinaz K ve 2,5mg/ml lizozim eklendi.
- 2- İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan tüplere çıkarılarak üzerine hazırlanan lizis I solüsyonu eklendi ve 37°C'de, 1 saat çalkalamalı su banyosunda hafif yatık pozisyonda yerleştirilerek bekletildi.
- 3- Daha sonra içerisine 400ug/ml Proteinaz K eklenen Lizis II tamponuna alınarak 55°C de 2 saat inkübe edildi (su banyosunda).

#### **3.4.1.4. Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması**

- 1- Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılması için tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletildi ve dikkatlice lizis solüsyonu aspire edildi.
- 2- Daha sonra agaroz kalıpları önce 4 ml ultrapür saf su ile 3 defa, 50°C'de, 15 dakika ve 4 ml 1XTE tamponuyla 3 defa, 50°C'de 15 dakika süre ile yıkandı ve TE 'si değiştirildi.
- 3- Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu ve enzimle kesilene kadar +4°C'de muhafaza edildi.

#### **3.4.1.5 Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi:**

- 1- DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla 1/3 oranında kesildi. Parçalardan her biri, 100 µl 1x enzim tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10-15 dakika bekletir. (Diğer parçalar ise sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde +4 derece saklandı) 30 dk sonrasında sıvı aspire edildi.

- 2- Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı.
- 3- Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 30°C’de 4 saat inkübe edildi.
- 4- İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi.
- 5- Kalıplar elektroforez için hazır hâle getirildi.

**Tablo 3.3.** Agaroz Kalıplarda Kullanılan Enzim Tampon-Su Oranı

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>E. coli</i>
<b>Steril enjeksiyon su</b>	90ul	90ul	90ul	90ul
<b>Enzim tamponu</b>	10ul	10ul	10ul	10ul
$\Sigma$	100ul	100ul	100ul	100ul

**Tablo 3.4.** Agaroz Kalıplarda Kullanılan Enzim, Enzim Tamponu ve Su Oranı

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>E. coli</i>
<b>Steril enjeksiyon su</b>	87ul	87ul	87ul	87ul
<b>Enzim tamponu</b>	10ul	10ul	10ul	10ul
<b>Enzim</b>	<b>SpeI:</b>	<b>(ApaI:30U)</b> 3ul	<b>(XbaI: 30U)</b> 3ul	<b>(XbaI: 30U)</b> 3ul
$\Sigma$	100ul	100ul	100ul	100ul

#### 3.4.1.6. Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi

- 1- 100 ml 0.5x TBE (44.5 mM Trisma base, 44.5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH 8.0) içinde %1.1’lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı.
  - a- 1,1 g “pulsed-field certified agarose” balona konuldu Üzerine 100 ml 0.5 x TBE eklendi, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı.
  - b- Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalgada önce 60 saniye tutuldu daha sonra, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı ve tekrar 15 saniye mikrodalga fırınında tutuldu.

- c- Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C' lik su banyosuna konuldu.
- 2- Agaroz dökülecek kaset hazırlanarak, sızdırmaması için etrafı bantlandı. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konuldu.
  - 3- RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirildi. Tarağın iki kenarına ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna ait kalıplar veya moleküler standart marker yüklendi.
  - 4- Kurutma kâğıdı veya kağıt havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alınarak maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi.
  - 5- Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C (çok önemli) olan agaroz dikkati bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü.
  - 6- Oda ısısında 20–30 dakika katılaşmaya bırakıldı daha sonra tarak dikkatlice çıkarıldı (İstenirse çukurlar %1'lik agarozla doldurulabilir).
  - 7- Agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarıldı, tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900–2000 mililitre 0.5x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirilerek Elektroforeze tabi tutuldu.

**Tablo 3.5.** Elektroforez Şartları

<b>Elektroforez Şartları</b>	<b><i>E. coli, Acinetobacter, Klebsiella</i></b>
İnitial time	5sn
Final time	30sn
Voltaj	6v/cm
Süre	20 saat
Akım	150-160 mA

### 3.4.1.7. Sonucun analizi

- 1- Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınıp 20 dakika boyandı.
- 2- Sonra UV ışığı altında görüntülendi.
- 3- Gel logic 1500 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kayıt edildi.
- 4- GelCompar II yazılım sistemi (version 5.0 Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart (1, 7, 15. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. “Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)” kullanılarak PFGE profillerinin dendrogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre şuşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, %1,5 olarak alındı. Bant profilleri %80 benzerlik gösteren izolatlar aynı küme içinde değerlendirildi ve büyük harfle isimlendirildi. Aynı küme içerisindeki subtipler ise rakamlar ile gösterildi.

### 3.3.1.8. PFGE Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

Pulsed field jel elektroforez yönteminde kullanılan solüsyonlar laboratuvarımızda aşağıda tarif edildiği gibi hazırlandı.

- a- Hücre süspansiyon Tamponu (1x/100ml) pH:8,0: 100mM Tris-HCl: 1,576gr, 100mM EDTA: 3,722gr, 100 ml ultra pure su ile tamamlanır. NaOH pelleti ile pH ayarlanır.
- b- Lizis I solüsyonu (1x/100ml) pH:8,0: 50mM Tris-HCl: 0,788gr, 50mM EDTA: 1,861gr, 100 ml ultra pure su ile tamamlanır. NaOH pelleti ile pH ayarlanır.  
\*\*\*\*PFGE kalıpları bu solüsyonda lizisten önce 2,5mg/ml lizozim ve 1,5mg/ml Proteinaz K eklenmelidir.
- c- Lizis II solüsyonu (1x/100ml) pH:8,5: 500mM EDTA:18,61gr, 100 ml ultra pure su ile tamamlanır. Ancak EDTA'nın çözülebilmesi için NaOH pelleti eklenir. Ph 8,22ye ayarlandığında 1gr N-lauryl sarkozin eklenir.  
\*\*\*\*Bu solüsyona 400ug/ml proteinaz K eklenmelidir.



d- TE solüsyonu (1x/1000ml) pH:7,6

10mMTris-HCl 1,576gr

0,1mM EDTA 0,0372gr

100 ml ultra pure su ile tamamlanır. NaOH pelleti ile pH ayarlanır.

e- TBE solüsyonu (10x/1L)

Tris base 107,8gr

Borik Asit 55gr

EDTA 7,44gr

1L ultra pure su ile tamamlanır.

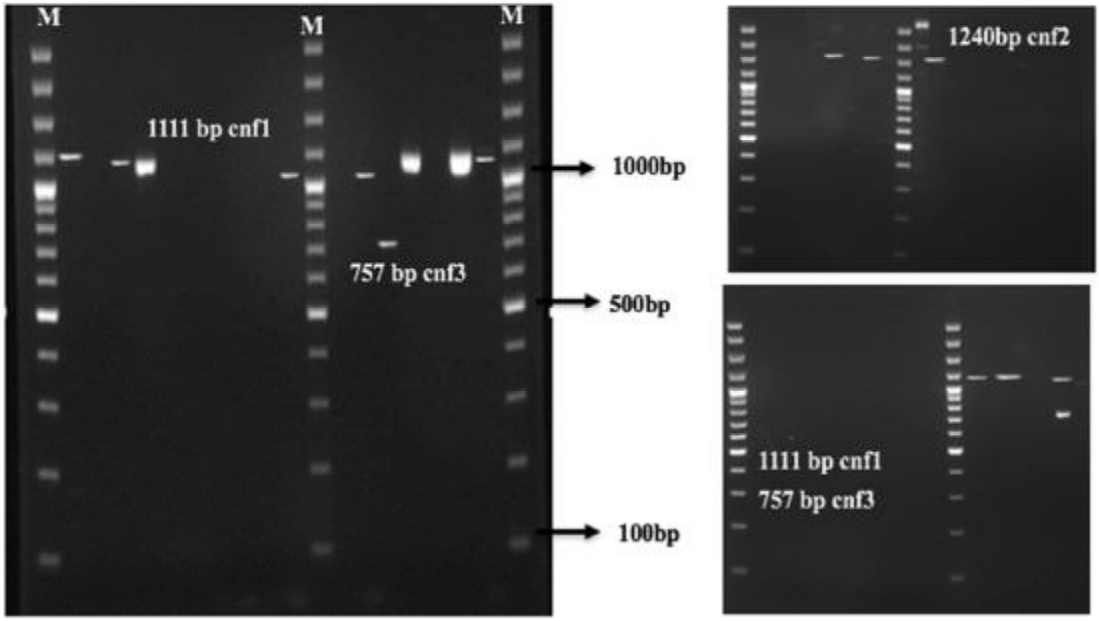
a- %10 SDS Solüsyonu

## 4. BULGULAR

İntestinal sistem dışı klinik yakınması olan hastalardan alınan idrar, kan, balgam, yara, aspirat gibi klinik orjinleri farklı klinik materyallerden izole edilen *E. coli* suşlarında ExPEC için spesifik markerlar olan CNF-CDT prevalansının belirlenmesi ve dolayısı ile ExPEC suşlarının klinik yakınmalar ile ilişkisini tespit amacı ile yapılan bu çalışmada 3 yıllık periyotta toplam 645 hasta örneği değerlendirildi. Çalışmada ayrıca ExPEC suşları arasındaki klonal ilişkide XbaI-PFGE yöntemi ile sorgulanarak bu suşların orijinleri hakkında bilgi edinilmesi amaçlandı.

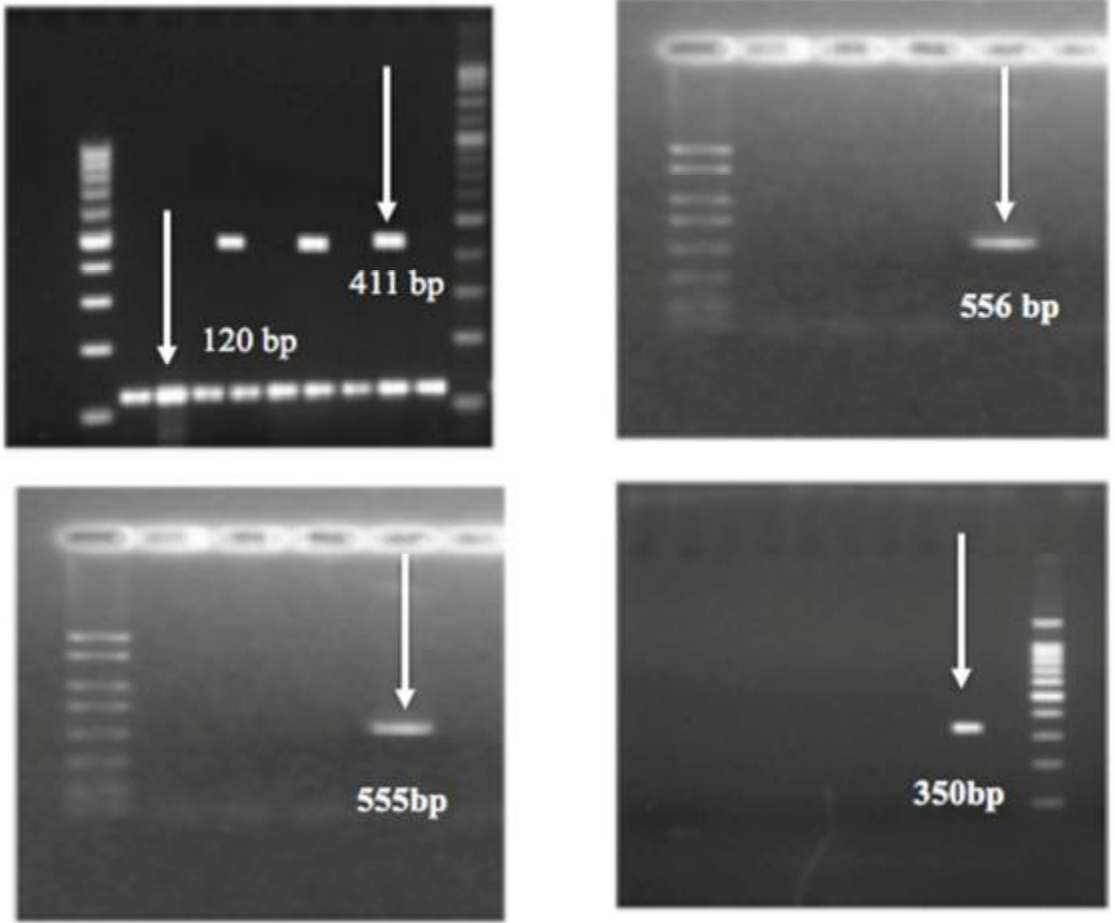
Bu çalışma; Çukurova Üniversitesi Merkez Laboratuvarı ile bölge hastanelerinin Mikrobiyoloji laboratuvarlarında; 522'si idrar, 54'ü yara, 28'i kan, 21'i balgam, 6'sı aspirat, 12'si steril vücut sıvısı 3'ü vajen ve 1'i ürosepsisli hasta örneklerinden izole edilen ve laboratuvarımıza transport besiyerleri içerisinde taşınan toplam 645 *E. coli* suşu ile gerçekleştirilmiştir. *E. coli* test suşları önce IMVIC testleri ile fenotipik olarak, daha sonra da beta-glukorinidaz geni (*uidA*) içerisinde belirlenen 120bp uzunluğundaki spesifik bir fragment PCR yöntemi ile amplifiye edilerek doğrulanmıştır. (Şekil 3.2).

CNF genlerinin amplifikasyonunda multipleks PCR yöntemi kullanılmıştır. Spesifik primerler ile yapılan amplifikasyon sonunda; **cnf1** için 1112bp, **cnf2** için 1241bp ve **cnf3** için de 757bp uzunluğunda bir fragmentin görülmesi hedeflenmiş ve amplikonların agaroz jel elektroforezi ile separasyonu sonucunda örneklerden 81'inde **cnf1**, 20'sinin **cnf2** ve 18'nin ise **cnf3** geni ile uyumlu fragmentlerin varlığı tespit edilmiştir. (Şekil 4.1).



**Şekil 4. 1.** 1111 bp'lik cnf1, 1240 bp'lik cnf2, 757 bp'lik cnf3 kodlayan gen bölgesine ait bant profilini gösteren jel görüntüsü

In-house PCR yöntemiyle yapılan değerlendirmede, CDT gen bölgesinin amplifiye edilmesiyle **cdt1** için 411bp, **cdt2** için 556bp, **cdt3** için 555bp ve **cdt4** için 350bp uzunluğunda fragment görülmesi hedeflenmiş ve amplikonların agaroz jel elektroforezi ile separasyonu sonucunda örneklerden 20'si **cdt1**, 4'ü **cdt2**, 4'ü **cdt3** ve 4'ünün **cdt4** geni ile uyumlu fragmentlerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. Sırasıyla cdt1, cdt2, cdt3, cdt4 genlerini kodlayan gen bölgesine ait bant profilini gösteren jel görüntüleri

PCR sonrasında oluşan fragmentleri agaroz jel elektroforezi ile görüntülenerek örneklerden en az 2 virülans geni içeren; ikili kombinler ise **cnf1-cnf3**(n=6), **cnf1-cdt1**(n=6), **cdt1-cdt4**(n=6) olarak tespit edildi.

PCR yöntemi ile 645 *E. coli* suşunda ExPEC için tanımlanan virülans genlerinden (**cnf1**, **cnf2**, **cnf3-cdt1**, **cdt2**, **cdt3**, **cdt4**) en az biri pozitif olan, 156 suş bulundu. Burada prevalansı en yüksek olan virülans faktörünün 78 (%12,09) izolatta tek başına 12 (%2) izolatta da diğer virülans faktörleri ile birlikte olmak üzere toplam 90(%14,09) izolatta **cnf1** olduğu tespit edildi (Tablo-4.1).

**Tablo 4.1.** İzole edilen tüm ExPEC suşlarındaki CDT ve CNF Toksin Genlerinin dağılımı

VFs	N	n/toplam	%
<b>cnf1</b>	78	<b>78/645</b>	%12,09
<b>cnf2</b>	12	<b>12/645</b>	%1,86
<b>cnf3</b>	18	<b>18/645</b>	%2,79
<b>cdt1</b>	20	<b>20/645</b>	%3,1
<b>cdt2</b>	4	<b>4/645</b>	%0,6
<b>cdt3</b>	4	<b>4/645</b>	%0,6
<b>cdt4</b>	4	<b>4/645</b>	%0,6
<b>cnf1-cnfn3</b>	6	<b>6/645</b>	%0,93
<b>cnf1-cdt1</b>	6	<b>6/645</b>	%0,93
<b>cdt1-cdt3</b>	4	<b>4/645</b>	%0,6
<b>Toplam</b>	<b>156</b>	<b>156/645</b>	<b>%24,18</b>

ExPEC için tanımlanan virülans genlerinden (**cnf1**, **cnf2**, **cnf3-cdt1**, **cdt2**, **cdt3**, **cdt4**) en az biri pozitif olan ve bu sebeplede ExPEC olarak tanımlanabilecek 156 *E. coli* izolatında diğer virülans genlerinden prevalansı en yüksek olanı da %50'lik oranı+ ikili kombinlerde %7,6'lık oranı ile **cnf1**'di. Bunu %12,8'lik + ikili kombinlerde %2,5'luk oranıyla **cdt1** takip etmiştir. (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** CDT ve CNF pozitif ExPEC suşlarındaki Toksin Genlerinin dağılımı

Virülans faktör	<b>cnf1</b>	<b>cnf2</b>	<b>cnf3</b>	<b>cdt1</b>	<b>cdt2</b>	<b>cdt3</b>	<b>cdt4</b>	<b>cnf1-cnfn3</b>	<b>cnf1-cdt1</b>	<b>cdt1-cdt3</b>
Toplam (n=156)	78	12	18	20	4	4	4	6	6	4
<b>n/toplam</b>	<b>78/156</b>	<b>12/156</b>	<b>18/156</b>	<b>20/156</b>	<b>4/156</b>	<b>4/156</b>	<b>4/156</b>	<b>6/156</b>	<b>6/156</b>	<b>4/156</b>
<b>%</b>	<b>50</b>	<b>7,6</b>	<b>11,5</b>	<b>12,8</b>	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>	<b>3,8</b>	<b>3,8</b>	<b>2,5</b>

Bu suşlarda tespit edilmiş virülans gen/gen kombinasyonları ile suşların izole edildikleri klinik materyallere göre dağılımında; en az 1 virülans geninin pozitif olduğu 156 suştan 121(%77,56)'inin üriner sistem ilişkili olduğu, kalan 35(%22,44)'nin ise üriner sistem dışı ekstraintestinal enfeksiyon odaklarından izole edildikleri görüldü. (Tablo 4.3-4.4).

**Tablo 4.3.** Klinik orjinlerine göre 156 ExPEC izolatının faktör-toksin genleri dağılımı.

İzolatlar	İdrar (n=121)	Yara (n=11)	Kan (n=9)	Balgam (n=7)	Aspirat (n=5)	BOS (n=1)	Periton SIVISI (n=1)	Ürosepsis (n=1)
<b>cnf1</b> (n=78)	62	4	4	3	1	1	1	1
<b>cnf2</b> (n=12)	10	1	1	-	-	-	-	-
<b>cnf3</b> (n=18)	14	2	1	1	-	-	-	-
<b>cdt1</b> (n=20)	15	-	1	2	2	-	-	-
<b>cdt2</b> (n=4)	2	1	1	-	-	-	-	-
<b>cdt3</b> (n=4)	2	-	-	1	1	-	-	-
<b>cdt4</b> (n=4)	2	1	-	-	1	-	-	-
<b>cnf1-cnf3</b> (n=6)	5	-	1	-	-	-	-	-
<b>cnf1-cdt1</b> (n=6)	4	2	-	-	-	-	-	-
<b>cdt1-cdt3</b> (n=4)	4	-	-	-	-	-	-	-

Üriner sistem kaynaklı 121 klinik materyalde virülans genotiplerinden en yaygın olanı %71,07'lik (86/121) + ikili kombinler %7 (9/121) oranıyla toplam %78'lik oranıyla CNF gen ailesiydi. CDT gen ailesi ise %17,35 (21/121)'di. **cnf1** pozitif 78 suşun %79,48'i üriner sistem kaynaklıyken; %20,52'lik kısmı diğer ekstraintestinal enfeksiyon odaklarından izole edilmiştir. İkili kombinlerde ise **cnf1** toplam 12 izolattan 9'u üriner sisteme aitken 3'ü üriner sistem dışı enfeksiyon odaklarından izole edilmiştir. Benzer oranlar **cnf2** ve **cnf3** içinde geçerlidir; fakat **cdt1**, **cdt2**, **cdt3**, **cdt4** pozitif genlerde yalnızca **cdt1** %75'lik oranla üriner sistemde üstünlüğünü kanıtlarken diğer 3'ü eşit yüzdelerde bulunmuştur. En az 2 gen bölgesi bulduran suşların ise üriner sistem enfeksiyonundan izole edilen suşlarda ağırlıklı olduğu görülmüştür (Tablo 4.4-4.5).

**Tablo 4.4.** CDT ve CNF pozitif ExPEC suşlarında üriner sistem ve üriner sistem dışı enfeksiyon odaklarındaki virülans faktör dağılımları

Klinik Materyal	Üriner sistem (n=121) %77,56 (121/156) %18,75 (121/645)	Üriner sistem dışı (n=35) %22,44 (35/156) %5,42 (35/645)	Üriner sistem %	Üriner sistem dışı enfeksiyon odakları %
VF's				
<b>cnf1</b> (n=78)	62	16	%79,48 (62/78)	%20,52 (16/78)
<b>cnf2</b> (n=12)	10	2	%83,33 (10/12)	%16,66 (2/12)
<b>cnf3</b> (n=18)	14	4	%77,78 (14/18)	%22,22 (4/18)
<b>cdt1</b> (n=20)	15	5	%75 (15/20)	%25 (5/20)
<b>cdt2</b> (n=4)	2	2	%50 (2/4)	%50 (2/4)
<b>cdt3</b> (n=4)	2	2	%50 (2/4)	%50 (2/4)
<b>cdt4</b> (n=4)	2	2	%50 (2/4)	%50 (2/4)
<b>cnf1-cn3</b> (n=6)	5	1	%83,33 (5/6)	%16,66 (1/6)
<b>cnf1-cdt1</b> (n=6)	4	2	%66,66 (4/6)	%33,33 (2/6)
<b>cdt1-cdt3</b> (n=4)	4	0	%100 (4/4)	0

**Tablo 4.5.** İzole edilen ExPEC suşlarında üriner sistem ve üriner sistem dışı virülans faktör dağılımları

Klinik Materyal	Üriner sistem (n=522)	Üriner sistem dışı (n=123)
VFs		
<b>cnf1</b> (n=78)	86 (86/522) (%16,47)	22 22/123 (%17,88)
<b>cnf2</b> (n=12)		
<b>cnf3</b> (n=18)		
<b>cdt1</b> (n=20)	21 (21/522) (%4,02)	11 (11/123) (%8,9)
<b>cdt2</b> (n=4)		
<b>cdt3</b> (n=4)		
<b>cdt4</b> (n=4)		
<b>cnf1-cnf3</b> (n=6)	13 (13/522) (%2,49)	3 (3/123) (%2,43)
<b>cnf1-cdt1</b> (n=6)		
<b>cdt1-cdt3</b> (n=4)		

Filogenetik analizler *E. coli*'nin dört ana filogenetik gruptan (A, B1, B2 ve D) oluştuğunu ve virulent ekstraintestinal suşların ağırlıklı olarak B2 ve D gruplarında yer aldığı göstermiştir. Aslında filogenetik gruplar, MLST veya ribotiplendirme ile belirlenebilir; ancak her ikisi de karmaşık, zaman harcayan tekniklerdir. Tripleks PCR dayanan basit ve hızlı bir filogenetik gruplama tekniği ile iki gen bölgesi **chuA** ve **yjaA** ve eşsiz bir DNA fragmentinin bir kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen yöntem



ile en az bir virülans genine sahip 156 ExPEC suşundan %60,8 oranıyla virülansla en çok ilişkili bulunan grup B2'dir. Bunu %30,7'lik oranla grup D takip etmektedir. A ve B1 grupları ise sırasıyla %5,12 ve %3,2'di (Tablo 4.6).

**Tablo 4.6.** Virülans geni taşıyan 156 izolatın filogenetik gruplarının dağılımı.

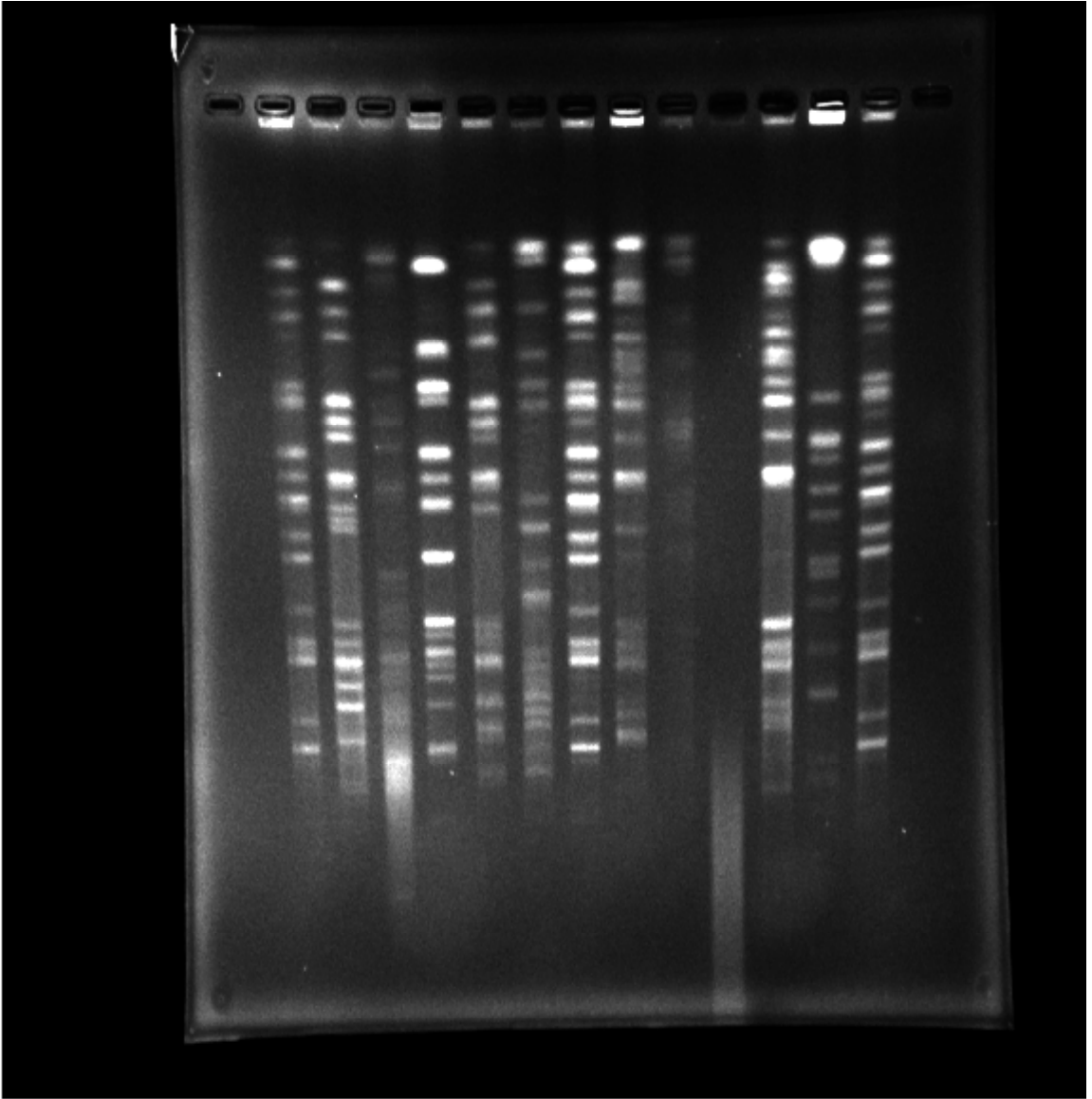
Filogenetik grup	Virülans gen profili	İzolatlar (n)	%
B1 (n=5)	<b>cdt4</b>	2	%3,20 (5/156)
	<b>cnf1</b>	3	
A (n=8)	<b>cnf2</b>	3	%5,12 (8/156)
	<b>cdt1</b>	1	
	<b>cnf3</b>	4	
B2 (n=95)	<b>cnf1</b>	39	%60,89 (95/156)
	<b>cnf2</b>	9	
	<b>cnf3</b>	14	
	<b>cdt1</b>	19	
	<b>cdt4</b>	2	
	<b>cnf1-cn3</b>	6	
D (n=48)	<b>cnf1-cdt1</b>	6	%30,76
	<b>cdt1-cdt4</b>	4	
	<b>cdt2</b>	4	
	<b>cdt3</b>	4	
	<b>cnf1</b>	36	

Genel olarak, üriner sistem suşlarının **cnf1**'e üriner sistem dışı suşlara göre anlamlı derecede yüksek prevalansı görüldü (%79,48'e karşın %20,52) (Tablo 4.6). Bu nedenle **cnf1** geni üropatogenezde rol alabilir; Bununla birlikte, filogrup B2 üriner sistem suşları **cnf1**'i, filogrup B2 üriner sistem dışı suşlardan anlamlı derecede daha sık bulunduğu görüldü (Tablo 4.7).

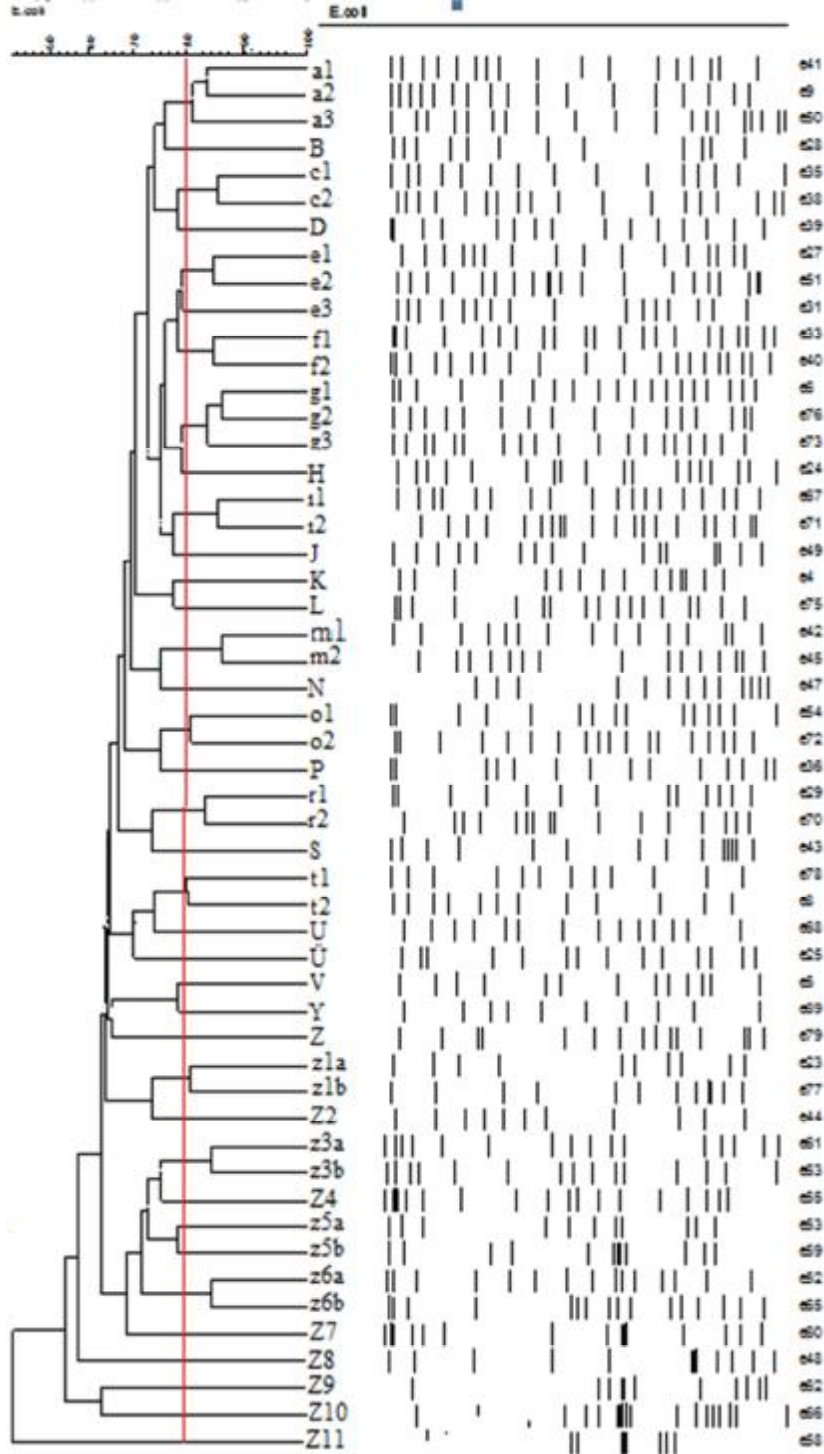
**Tablo 4.7.** Filogenetik grup ve klinik orjinine göre 156 ExPEC izolatının virülans genlerinin dağılımı

Klinik Materyal	Üriner sistem(ÜS) (n=121)	Üriner sistem dışı (ÜSD) (n=35)	Grup A (n=8)		Grup b1 (n=5)		Grup b2 (n=95)		Grup D (n=48)	
			ÜS/	ÜSD	ÜS/	ÜSD	ÜS/	ÜSD	ÜS /	ÜSD
<b>cnf1</b> (n=78)	62	16	0	0	0	3	33	6	33	3
<b>cnf2</b> (n=12)	10	2	3	0	0	0	8	1	0	0
<b>cnf3</b> (n=18)	14	4	2	2	0	0	13	1	0	0
<b>cdt1</b> (n=20)	15	5	0	1	0	0	10	9	0	0
<b>cdt2</b> (n=4)	2	2	0	0	0	0	0	0	1	3
<b>cdt3</b> (n=4)	2	2	0	0	0	0	0	0	2	2
<b>cdt4</b> (n=4)	2	2	0	0	2	0	2	0	0	0
<b>cnf1-cn3</b> (n=6)	5	1	0	0	0	0	6	0	0	0
<b>cnf1-cdt1</b> (n=6)	4	2	0	0	0	0	5	1	0	0
<b>cdt1-cdt4</b> (n=4)	4	0	0	0	0	0	0	0	1	3
Toplam	121	35	5	3	2	3	77	18	37	11

ExPEC olduğu bilinen 156 suşun filogenetik ilişkileri tespit etmek amacıyla, XbaI- PFGE ile yapılan tüm genom DNA fragment polimorfizm analizinde %80 benzerlik baz alındığında test izolatlarının en büyüğü 5 üyeli olmak üzere 106 büyük küme, %85 benzerlik baz alındığında ise en büyüğü 3 üyeli olmak üzere 128 büyük küme içerisine dağıldıkları görüldü. Ancak %85 benzerlik ile elde edilen küme sayısının daha diskriminatif olmasına karşılık kıyas zorluğuna yol açacağı düşüncesi ile %80 benzerliğin esas alındığı PFGE sonuçları klonal ilişkilendirmede kullanıldı (Şekil 4.3).



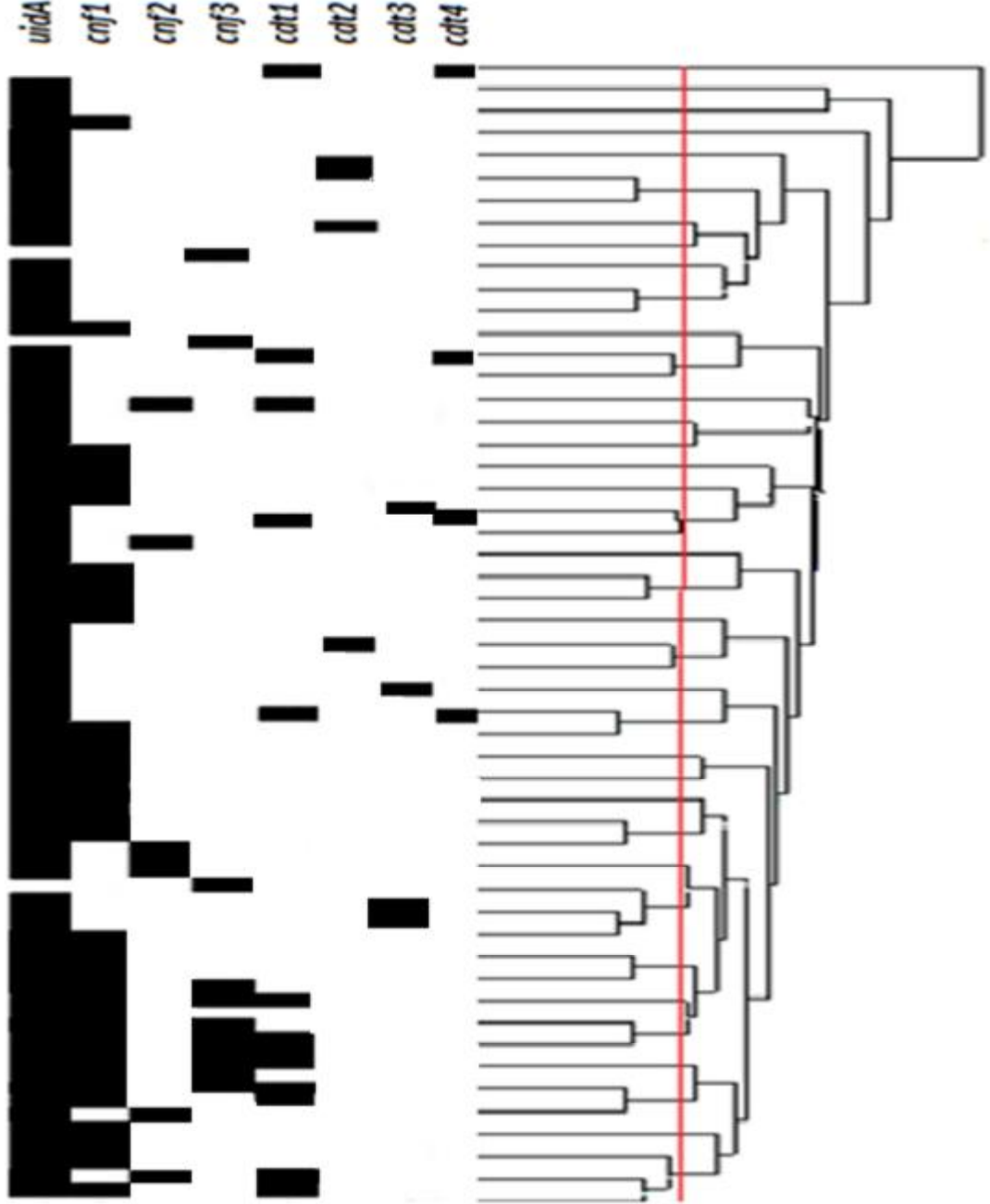
**Şekil 4. 3.** PFGE Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri



Şekil 4. 4. PFGE Sonucu Elde Edilen Dendrogram

ExPEC olduğu bilinen 156 suş 106 küme içerisinde toplandığı görüldü. Test suşlarının dört tane (Z23, Z25, Z36, Z38) 5 üyeli, 8 tane (A,E,G,Z60,Z64,Z80,Z83 ve Z88) üç üyeli ve 15 tane de iki üyeli (C,F,I,M,O,R,Z2,Z3,Z5,Z6,Z24,Z56,Z58,Z73 ve

Z76) , olmak üzere kümelendikleri görüldü. Buna karşılık 81 suş tek üyeli kümelere dağıldı (Şekil 4.4). Tek Üyeli Küme ve Aynı Alt Küme İçinde toplanan Suşların Virülans Faktörleri Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 5. Virülans genotiplendirmesinin kümelenmesi.

## 5. TARTIŞMA

*E. coli* insan intestinal florasındaki en yaygın mikroorganizmalardan birisidir. Kalın bağırsağın normal florasında kommensal olarak bulunan bu bakteri virülans faktörlerini kodlayan genlerin kazanılmasıyla intestinal (InPEC) ve intestinal sistem dışında patojen (ExPEC) hale gelmekte, yarattığı morbiditenin yanı sıra ciddi tedavi maliyetlerine sebep olmaktadır.

ExPEC, her yaşta insanı etkileyen çeşitli hastalıklara neden olan evrensel bir patojendir. ExPEC suşları kodladıkları virülans faktörlerine göre patogenetik çeşitlilik gösterirler. İdrar yolu enfeksiyonlarından ölümcül bakteriyemiye kadar geniş bir yelpazedeki hastalık spektrumları sahip oldukları virülans faktörleri ile ilişkilidir. İlginç olarak son 10 yılda, Dünya’da ve ülkemizde ExPEC suşları ile oluşan enfeksiyon bildirimlerinde artışlar kaydedilmiştir. CDC verilerine göre ABD’de her yıl milyarlarca dolar ulusal sağlık harcamasına ve yüz binlerce insanın ölmesine sebep olan ExPEC’e bağlı ekstraintestinal enfeksiyonlardaki artışın muhtemel sebepleri arasında antibiyotiklerin irrasyonel kullanımı önemlidir. Bu varsayım doğru ise ExPEC suşları bir taraftan geniş spektrumlu antibiyotiklerde dahil farklı antibiyotik gruplarına karşı direnç geliştirirken diğer taraftanda stres şartlarında yaşayabilmek için farklı bakterilerden mobil genetik elemanlar ile yeni virulan özelliklerde kazanabilirler. Sonuç olarak daha virulan ve kemoterapötiklere dirençli yeni ExPEC suşlar ve enfeksiyonlarının artış trendine girmeleri beklenen sonuç olur.

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda ExPEC suşlarını InPEC ve kommensal suşlardan farklı kılan çoğu putative çok sayıda virülans faktörünün varlığı ileri sürülmüştür. Ancak; konak hücreye adezyon, invazyon ve hücre ölümünden sorumlu iki önemli faktör/toksinin CNF ve CDT genotipleri polimorfizmi üzerinde en çok durulan ve virülans ile ilişkileri kesin olarak ispatlanmış faktörlerdir. ExPEC suşlarındaki virülans faktör polimorfizmine dayalı genotiplerin tespitine yönelik çalışmalar; bir taraftan bu suşların evrim özelliklerine ışık tutmayı amaçlarken, diğer taraftanda özellikle hastanede kazanılan enfeksiyonların sürveyansı ve prognozu için prediktiv öneme sahiptir. Bu sebeple çalışmamızda klinik örneklerden izole edilen ExPEC suşlarının virülans faktörleri ve polimorfik özellikleri ile prevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır ve bu suşlarda intestinal sistem dışına kolonizasyonu arttırdığı ispatlanan

CNF ve CDT'ye özgü primeler kullanılmıştır.

Çalışmamızda ExPEC açısından mikroorganizmaya bağlı muhtemel virülans faktörlerini kodlayan genlerin polimorfizmi sorgulanırken yorum zorluğu ve özel bilgilere ulaşma güçlüğü sebebi ile konağa bağlı faktörler irdelenemedi. Klinik patoloji ile ExPEC virülans gen polimorfizmi arasındaki anlamlı ilişkiler hastalıkların tedavisi ve prognozu konusunda prediktiv bulgu olarak değerlendirildi. Ayrıca virülans faktör genotiplerinin hızlı ExPEC tanısı amacıyla spesifik bir markır olarak kullanılıp kullanılmayacağı sorgulandı.

CDT'ler, hedef hücrelerde DNA hasarına yol açabilen genotoksinlerdir. CDT, ilk kez 1987'de *E. coli*'den Johnson ve Lior tarafından tanımlandığından beri (225), birtakım çalışmalar CDT'nin diğer intestinal (226) ve ekstraintestinal (227) patojenik bakterilere ait suşlar tarafından üretilebileceğini bildirmiştir. CDT üreten *E. coli*, sepsis de dahil ekstraintestinal enfeksiyonları olan hastalardan düşük oranda izole edilmektedir (222-228). CDT üreten suşlar arasında ekstraintestinal menşeli suş oldukça fazla bulunduğu için ExPEC suşlarının bir koleksiyonu **cdt** için tarandı ve **cdt** genotipleri kayıt altına alındı. Çalışmamızda CDT prevalansını %6,2 (40/645) olarak bulduk. Bu oran Dubois et al. (222) ürosepsis ilişkili ExPEC suşlarıyla yaptıkları çalışmada CDT genleri için bildirdiği %6'lık (14/197), Toth ve arkadaşlarının intestinal sistem dışı enfeksiyonlardan izole ettikleri ExPEC suşları için bildirdiği (223) %7,46 (18/241)'lık ile Kadhum ve arkadaşlarının (9) sepsis ilişkili ExPEC suşları ile yaptıkları çalışmada bildirdikleri %8 (22/266)'lık oranlar ile hemen hemen benzer iken, Curova ve arkadaşlarının (229) sepsis ilişkili ExPEC suşları ile yaptıkları çalışmada bildirdikleri %2,5 (2/80)'lık ve Lopez-Banda ve arkadaşlarının (230) üriner sistem enfeksiyonundan izole ettikleri *E. coli* suşlarında bildirdikleri %0,9'luk CDT oranından daha yüksektir. CDT genlerinin özellikle sepsisle ilişkili ExPEC suşlarında diğer enfeksiyon bölgelerinden, mesela üriner sistem enfeksiyonlarından, izole edilen ExPEC suşlarına göre daha yüksek prevalansa sahip olması bizim çalışmamız ve diğer çalışmalardaki test suşlarının farklı enfeksiyon alanlarından izole edilmiş olmaları ile izah edilebilir. Nitekim Lopez-Banda ve arkadaşlarının üriner sistem enfeksiyonlarından izole ettikleri ExPEC suşlarındaki düşük CDT oranı ile de izah edilebilir. Burada *E. coli*'ye bağlı üriner sistem enfeksiyonlarının kadın hastalarda daha prevalan oluşu intestinal suşların komşuluk ilişkisi ile üriner sisteme invaze olup kolay koonize olmaları ve farklı stres

faktörleri altındaki konakda ekstra bir virülans faktörüne ihtiyaç duymadan kolaylıkla hastalık oluşturabilmeleri şeklinde de izah edilebilir. Ancak hücre bütünlüğünün bozulmasına yol açan CDT'in intestinal lümeninde mukozal epitel bütünlüğünün bozması sonucu bu faktöre sahip ExPEC suşlarının barsaklardan önce lamina propria'ya oradan da genel dolaşım ve hemotejen metastaz ile uzak dokulara kolaylıkla translokasyon göstererek yayılma sepsis başta olmak üzere uzak doku enfeksiyonlarına yol açmaları muhtemeldir. Bu da sepsisli hastalardan izole edilen ExPEC suşlarında CDT prevalansının neden yüksek olduğunu açıklayabilir.

*E. coli* *cdt* operonunun dizi analizi, bu operonun **cdtA**, **cdtB**, **cdtC**'yi okuduğunu, yani (231) aktif CDT'nin üretimi için bu 3 genin okunmasının gerektiğini göstermiştir. *E. coli*'de bu 3 genin kodladığı aminoasit sekansları büyük ölçüde identiktir. **cdtB** nükleazları içeren fosfodiesteraz sınıfının protein ailesinin bir üyesi olan *CdtB*'yi kodlar. *CdtA* ve *CdtC* ise duyarlı hücre üzerine CDT reseptörünün bağlanmasına aracılık eden aksesuar proteinlerdir. Kısacası **cdtB** enzimatik olarak aktif protein subunitlerini kodlarken; **cdtA** ve **cdtC** tarafından kodlanan polipeptitler hedef hücreye CDT'nin bağlanması için gerekli olan heterodimerik subunitlerdir. *E. coli*'de **cdtB**'nin **cdt1**, **cdt2**, **cdt3**, **cdt4** olarak tanımlanan 4 tipi bulunmuştur (232). **cdt4** ile **cdt1** %84 homoloji gösterirken **cdt2** ve **cdt3** ile daha az homolojiye sahiptir (223). **cdt1** ve **cdt4** menajit, UTI ve sepsis gibi farklı ekstraintestinal enfeksiyonlara sebep olan ExPEC suşlarının yanı sıra ishali hastalardan izole edilen EPEC, shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) suşlarında da gösterilmiştir (10). Çalışmamızda, ExPEC suşlarının 20'sinde tek başına 6'sında **cnf1** ile 4'ünde de **cdt4** ile birlikte olmak üzere toplam toplam 30 izolatta **cdt1**, gen alleli tespit edilmişken, 4'ünde tek başına olmak üzere toplam 8 izolatta **cdt4**, 4 izolatta **cdt2** ve 4 izolatta da **cdt3** alleli tespit edilmiştir. Bu bulgular ExPEC test suşlarımızda *cdt1* ve *cdt4* prevalansının **cdt2** ve **cdt3** prevalansından daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Dubois ve arkadaşları (222) çalışmalarında **cdt2** ve **cdt3** allel pozitif suş bulamadıklarını, buna karşılık 5 izolatta **cdt1** ve 6 izolattada *cdt4* alleli tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Toth ve arkadaşları da (223) 2003 yılında yaptıkları çalışmada toplam 18 **cdt** pozitif suşun 4'ünde **cdt1**, 14'ünde de **cdt4** alleli tespit ettiklerini bildirirken ExPEC test suşlarında **cdt2** ve **cdt3** allellerini bulamadıklarını bildirmişlerdir. Kadhum ve arkadaşları ise (234) çalışmaya dahil ettikleri sepsis ile ilişkili ExPEC suşlarında **cdt2** ve **cdt3** alleli bulamadıklarını ancak 16



suşda *cdt1* ve 2 suşda da *cdt4* alleli tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada Curova ve arkadaşları da (229) sepsis ilişkili ExPEC suşların 1'inde **cdt1** 1'inde de **cdt4** alleli tespit ettiklerini suşların hiç birisinde **cdt2** ve **cdt3** alleli tespit edemediklerini belirtmişlerdir. Bu bulgular CDT genlerinden **cdt1** ve **cdt4** allellerinin oldukça yaygın ve yakın homoloji gösterdiklerini ve lambdoid profaj genleri ile çerçevelenen bu iki genin (234) faj transdüksiyonuyla ortak bir atadan edinilmiş olabileceğini ima etmektedir. Johnson ve arkadaşları (238) neoatal bakteriyel menenjit (NBM) olan bebeklerden izole ettikleri ExPEC suşları arasında *cdtB* gen prevalansının diğer virülans genlerinden daha yüksek olduğunu göstermişler ve NBM ile *cdtB* gen polimorfizmi gösteren ExPEC suşları arasındaki güçlü ilişkiye dikkat çekmişlerdir. Bu suşları *cdtB* allelleri yönünden değerlendiren Toth ve arkadaşları suşların **cdt1** veya **cdt4** allotipi olduğunu diğer allelere rastlanmadığını bildirmişlerdir. Hindistan (235) ve Brezilya'daki (236) ExPEC suşlarıyla yapılan çalışmalarda dikkat çekici bir şekilde, **cdt** genlerinin çoğunun **cdt4** alleli olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda kullandığımız ExPEC suşlarımızın çoğunda **cdt1** alleli görüldü. Ancak diğer çalışmalarda *cdt1* alleleline yakın sıklıkta bulunan **cdt4** alleli bizim suşlarımızda da ikinci sıklıkta tespit edilen allel olmuştur. Literatürde de bizim bulgumuzu destekler görüşler bulunmakta bu görüşlerde eski epidemiyolojik raporlarda daha sık bildirilen **cdt4** allelinin giderek azlamakta olduğu iddia edilmektedir. Bu bağlamda Toth ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışmada 14 suşda tespit ettiklerini bildirdikleri *cdt4* allelinin 2008 yılında yaptıkları çalışmada çok daha düşük olduğunu belirttikleri çalışmaları (237) önemlidir. Bizim bu gruplardan farklı olarak *cdt2* ve *cdt3* allo tiplerini bulmamız yani allelik zenginliğimiz test suşlarını izole ettiğimiz vaka gruplarımızın çeşitliliği kadar lokal stres farklılıkları gibi birçok faktör ile izah edilebilir.

CDT üreten suşların daha ileri karakterizasyonunun gerekli olduğunu ileri süren Toth ve arkadaşları (232) farklı CDT gen polimorfizmine sahip suşların bakteri lisatları ve süpernatantlarının sitotoksik aktivitesini karşılaştırmışlar, **cdt1** üreten suşların, **cdt4** üreten suşlardan daha güçlü toksik aktiviteye sahip olduğunu, **cdt2** ve **cdt3** üreten suşların toksik aktivitelerinin de neredeyse aynı olduğunu bulmuşlardır. **cdt4** üreten suşların hiçbirisinin süpernatantında toksik aktivite tespit edemediklerini buna karşılık **cdt1** pozitif suşların tamamının süpernatantında CDT aktivitesinin tespit edildiğini bildirmişlerdir. Bu *in vitro* sonuçlar, **cdt1**'in CDT'nin en güçlü allelik tipi olduğunu

göstermektedir. **cdt4** üreten 6 suşun tamamında hücre lizatlarında CDT aktivitesinin olduğunu ancak bu suşların hiçbirisinin HeLa hücre kültürlerinde toksik aktivite göstermediklerini belirtmişlerdir. Benzer bir çalışma ile Clark ve arkadaşları (239) bazı CDT üreten suşların süpernatantlarının **cdt1**, **cdt2** veya **cdt3** delete suşların hücre kültüründe toksik aktivite gösterdiklerini tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu son iki çalışmanın sonuçlarına dayanarak ExPEC suşları arasında bilinenlerden farklı **cdt** allellerinin de var olabileceği veya bazı suşlarda **cdt4** allelinin bazı özel şartlarda hücre kültürlerinde toksik aktivite gösterebilen CDT üretebileceğini düşündürmüştür.

Toth ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmalarında (223), üriner sistem enfeksiyonlu hastalardan izole ettikleri 190 suş ile üriner sistem dışı enfeksiyonlardan izole ettikleri 51 ExPEC suşunu sağlıklı bireylerden izole ettikleri 112 intestinal suş ile karşılaştırmışlar 190 UPEC suşunun 15'inde (%7,9) **cdt** alleleri, üriner sistem dışı enfeksiyonlardan izole ettikleri suşlarında 3'ünde (%5,9) **cdt** alleleri tespit etmişler buna karşılık sağlıklı bireylerin intestinal örneklerinden izole ettikleri suşların sadece 1'inde (%0,9) **cdt** pozitifliği tespit etmişlerdir. Bizim **cdt** allel pozitifliği oranlarımız bu grubun bildirdiği oranlara benzer olup, üriner sistem enfeksiyonlu hastalardan izole edilen 522 suşun 29 (%5)'u ile üriner sistem dışı enfeksiyonlardan izole edilen 123 suşun 13'ünde (%10) *cdt* geni bulunmuştur. Özellikle üriner sistem dışı enfeksiyonlardan izole edilen ExPEC suşlarındaki nispi yükseklik gösteren **cdt** pozitiflik oranımız suş sayımızın fazlalığından da kaynaklanan gerçeğe daha yakın prevalansı ifade ediyor olabilir.

Diğer taraftan patojen *E. coli* suşları tarafından üretilen ve Rho GTPazları dominant olarak aktive ettiği bildirilen ilk toksin CNF'dir. Bu toksin tavşan cildi üzerindeki nekrotizan etkisi sebebi ile bu ismi almıştır (134).

Çalışmaya dahil ettiğimiz 645 *E. coli* izolatından 120'sinin (%18,60) en az bir **cnf** alleli taşıdığını tespit ettik. Bu oran, Landraud ve arkadaşları (240) tarafından üriner sistem ilişkili *E. coli* izolatlarında bildirilmiş %34'lük oran ile Kadjum ve arkadaşları tarafından sepsis ilişkili *E. coli* izolatlarında bildirilen %20 (52/266)'lik pozitiflik oranlarından nispeten daha düşük, Rahman and Deka (241) tarafından üriner sistem ilişkili *E. coli* suşlarında bildirilen %15,27 (84/550)'lik oran ile Koga ve arkadaşları tarafından sepsis ilişkili *E. coli* izolatlarında bildirilen %5'lik **cnf** oranlarından daha yüksektir. Ancak genel itibarı ile test suşları sayısı ve bildirilmeyen hasta

özelliklerinden kaynaklanabilecek sapmalar dikkate alındığında oranların birbirlerine benzer olduğu söylenebilir.

Birçok çalışma, **cnf1** allelini *E. coli* enfeksiyonlarında önemli bir virülans faktörü olarak tanımlamaktadır. **cnf1** doku hasarından sorumludur ve doku kültürü sistemlerinde epitel bariyer fonksiyonunu bozmakta (149,150) ve fagositozu bloke ederek immün hücrelerin fonksiyonunu etkilemektedir (151). CNF1, siklooksijenaz-2'nin (COX-2) ekspresyonunu indükler, nükleer faktör-kappa B'yi (NF-κB) aktive eder, hücre hareketliliğini artırır ve apoptozu inhibe eder. **cnf1**'in kanser gelişiminde rol oynayabileceğine dair güçlü bulgular elde edilmiştir. (152-154). **cnf1** delete mutantların üriner sisteme kolonize olma potansiyelinin daha düşük olduğu gösterilmiştir. (148).

Çalışmamızda 120 olarak tespit edilen nekrotoksijenik *E. coli* izolatının 78'i (%65) **cnf1**, 12'si (%10) **cnf2** ve 18'i (%15) **cnf3** ve 12'si (%10) 2'li kombinlerde **cnf1-cnf3**, **cnf1-cdt1** allelleri taşıyordu. Bulgularımız **cnf1** için Rahman ve Deka'nın %61,9'luk oranından yüksek, **cnf2**'nin %27,4'lük ve ikili kombinasyonlarda %10,7'lik oranından düşüktür. Ananias ve arkadaşları sepsis ilişkili 60 hastanın %22'sinin kanından **cnf1** üreten *E. coli*'nin izole edildiği göstermiştir (143). Koga ve arkadaşları (242) sepsis ilişkili *E. coli* suşlarında **cnf1** bulamazken; **cnf2**'yi %5 oranında bulmuştur. Kadhum ve arkadaşları (243) sepsis ilişkili *E. coli* suşlarında **cnf2** negatifken; **cnf1** üreten %19,54 oranında *E. coli* izolatı tespit etmişlerdir. Lopez-Banda ve arkadaşları (244) UPEC suşlarında yaptıkları çalışmada %16,5 oranında **cnf1** pozitif suş bulmuşlardır. Curova ve arkadaşları (229) sepsis ilişkili *E. coli* suşlarında yaptıkları çalışmada **cnf1** %23,75 oranında bulmuştur. Dubois ve arkadaşları (222) ürosepsisli hastalarla yaptığı çalışmada multiplex PCR ile gerçekleştirdikleri CNF tiplendirmesi; **cnf2** ve **cnf3** negatifken, %44 (64/146) oranıyla yalnızca **cnf1** genleri pozitifti. Fekal örneklerde ise **cnf1** prevalansı sadece 2 suşta tespit edilmiş ve %4 (2/51) oranında bulunmuştur. Çalışmamızda %65 oranında tespit edilen **cnf1**'e kıyasla %10 ile **cnf2** ve %15 ile **cnf3** daha az oranda bulunmuştur. Bu, **cnf2** ve **cnf3**'ün hayvan kökenli olmalarına ve insanlarda az rastlanır olmasıyla açıklanabilir. Fakat diğer çalışmalara kıyasla çalışmamızda **cnf2**, **cnf3** prevalansımız yüksektir (222, 233).

Bu sonuçlar **cnf1**'in virülans suşlar için özellikle üriner sistem ve sepsis ilişkili ExPEC için spesifik bir marker olabileceğini gösterir.

*E. coli* insan ve hayvanlarda gastrointestinal sistemin yaygın flora elemanı

olduğundan çevre, su ve gıdada bulunması beklenen bir durumdur. Koyun ya da kuzu eti ayrıca kanatlı hayvanlar insanlar için *E. coli* enfeksiyonunun önemli bir kaynağıdır ve hayvansal orijinli yiyecekler, hastalığın önemli yollarından biridir. Halk sağlığı önemi ve gıda güvenliği açısından **cdt** ve **cnf** gibi *E. coli* virülans faktörünün varlığını bulmak insan enfeksiyon kaynağının tespiti açısından önem arz etmektedir. Mehdipour ve arkadaşlarının (245) yaptıkları çalışmada İran'da toplam 150 suş *E. coli* DNA varlığı açısından incelenmiş ve pozitif izolatlar **cdt** ve **cnf** genlerinin açısından spesifik primerler kullanılarak araştırılmıştır. Mevcut çalışmada, koyun eti örneklerinden %21,33'ünde *E. coli* bulunmuş olup, örneklerin %31,25'inde **cdt**, %50'sinde **cnf** ve %18,75'inde her iki gen gösterilmiştir. Çalışmamızda **cnf** %18,6 (120/645), **cdt** %6,5 oranında bulundu. Kuzey İrlanda'da 2006 yılında et örneklerinden yaptıkları çalışmada **cnf** prevalansı %13,33, **cdt** prevalansı %80, **cnf-cdt** prevalansı ise %6,66 olarak bulunmuştur (246). Bu bulgular, koyundan izole *E. coli*'nin virulent faktörlerin (**cdt** ve **cnf**) önemli bir varlığını göstermiştir. Santo ve arkadaşları (247) 2007'de yaptıkları benzer bir çalışmada Brezilya'nın Taquaritinga kentindeki kasaplarda ekstraintestinal patojen *E. coli* varlığını araştırmış, perakende satılan gıdaların ekstraintestinal patojen *E. coli*'nin toplumlarda yaygınlaştırılması için önemli bir araç oluşturabileceğini ve endişe sebeplerini açıklamışlardır. Elde edilen sonuçlar, *E. coli* gibi zoonotik ve sindirim sistemi hastalıklarını içeren ajanları insanlara aktaran gıdanın önemini tanımlamakta ve mevcut araştırmaların bulgularını doğrulamaktadır (247). Bununla birlikte, virülansa katkıda bulunan çeşitli faktörlere sahip suşların et ürünlerinde hayatta kalabileceği ve potansiyel olarak insanlara bulaşabileceği sonucuna varılmıştır.

Filogenetik analizler doğal *E. coli* izolatlarının A, B1, B2 ve D olmak üzere dört ana filogenetik gruba ayrıldığını ortaya çıkarmıştır. Filogenetik gruplar, MLST veya ribotiplendirme ile belirlenebilir; ancak her ikisi de karmaşık ve zaman harcayan tekniklerdir.

Tripleks PCR dayanan basit ve hızlı bir filogenetik gruplama tekniği ile iki gen bölgesi **chuA** ve **yjaA** ve eşsiz bir DNA fragmentinin **TspE4.C2** kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen yöntem ile en az bir virülans genine sahip 156 ExPEC suşundan %60,8 oranıyla virülansla en çok ilişkili bulunan grup B2'dir. Bunu %30,7'lik oranla grup D takip etmektedir. A ve B1 grupları ise sırasıyla %5,12 ve %3,2'dir. Filogenetik grup dağılımı Lopez-Banda ve arkadaşları (230) UPEC suşlarıyla yaptıkları

çalışmada A-%30,6, B1-%9,3, B2-%55,6, D-%4,6; Curova ve arkadaşları (229) sepsis ilişkili *E. coli* suşlarında yaptıkları çalışmada A-%11,25, B1-%8,75, B2-%56,25, D-%23,75; Clermont ve arkadaşlarının (224) neonatal menenjit ile ilişkili *E. coli* suşlarında yaptıkları çalışmada A-%5, B1-%3, B2-%60, D-%18; Giray ve arkadaşlarının (248) UPEC suşlarıyla yaptıkları çalışmada A-%27, B1-%7, B2-%41, D-%25, Koga ve arkadaşlarının (242) sepsis ilişkili *E. coli* suşlarında yaptıkları çalışmada A-%30, B1-%20, B2-%40, D-%10 ve son olarak Dubois ve arkadaşlarının (222) ürosepsis suşlarıyla yaptıkları çalışmada A-%18,49, B1-%4,79, B2-%54,10, D-%22,60 olarak bulunmuştur. Dubois ve arkadaşları **cdt** pozitif suşların %75'nin filogrup B2'ye ait olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise bu oran %70 (28/40) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda **cdt1** ve **cdt4**, 21 suş ile çoğunlukla filogrup B2'de görüldü. Bunu **cdt2** ve **cdt3** pozitif 6 suşla filogrup D, **cdt4** pozitif 2 suşla grup B1 ve son olarak **cdt** pozitif 1 suşla grup A'nın takip ettiği belirlendi. Bu sonuçlar, kommensal *E. coli* suşlarının tipik olarak A veya B1 filogenetik gruplarından türetildiğini ve çoğu virülans faktörünün (VF'ler) genom yapılarında eksik olduğunu gösterebilir. Genel olarak kommensal ve intestinal patojen *E. coli*'nin aksine, ExPEC'in ağırlıklı olarak filogenetik B2 ve daha az oranda D grubundan köken aldığı söylenebilir.

Çalışmamızda CNF-CDT pozitif suşlarda *E. coli* suşlarının delesyon, rekombinasyon mutasyonları sonucunda mı yoksa bir ata suştan evrilerek mi ExPEC özelliği kazandığı anlamak için PFGE yöntemi kullanıldı. ExPEC olduğu bilinen 156 suşun filogenetik ilişkileri tespitinde XbaI-PFGE ile yapılan tüm genom DNA fragment polimorfizm analizinde %80 benzerlik baz alındığında test izolatlarının en büyüğü 5 üyeli olmak üzere 106 büyük kümede dağıldıkları görüldü. Oloomi ve arkadaşları (249) CNF-CDT (+) *E. coli* suşlarının yüksek oranda heterojen olduğunu bulmuşlardır. Mora ve arkadaşları (250) sepsis, menenjit ve üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen 59 ExPEC suşuyla gerçekleştirdikleri çalışmada %85 benzerlik esas alınmış olup; 59 suşun 36'sının 12 kümede toplandığını; buna karşılık 23 suş tek üyeli kümelere dağıldığını bulmuşlardır. Toplam 59 suşun 35 kümede toplandıklarını bulmuşlardır. Çalışmamızda ise bu oran %85 benzerlik baz alındığında ise en büyüğü 3 üyeli olmak üzere 128 büyük küme içerisine dağıldıkları görüldü. Ancak %85 benzerlik ile elde edilen küme sayısının daha diskriminatif olmasına karşılık kıyas zorluğuna yol açacağı düşüncesi ile %80 benzerlik esas alındı. XbaI-PFGE sonuçları klonal ilişkilendirmede kullanıldı. Mora ve

arkadaşları (250) son zamanlarda ortak bir atadan uzaklaştığı gösterilen ExPEC izolatlarının XbaI-PFGE profillerinin önemli benzerliklerine dayanarak homojen bir klonal grubu oluşturduğu sonucuna varmıştır. Çalışmamızda ise *E. coli* suşlarının antibiyotik baskısında dahil olmak üzere karşılaştıkları olumsuz şartlarda delesyon, rekombinasyon mutasyonları sonucunda farklı virülans genlerini kazanarak ExPEC özelliği kazandığı sonucuna varılmıştır. Küme sayımızdaki yükseklik ve suşlar arasındaki düşük benzerlik oranımız suş sayımızın fazlalığından da kaynaklanan gerçeğe daha yakın heterojeniteyi ifade ediyor olabilir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ekstraintestinal Enfeksiyonlardan İzole Edilen *Escherichia coli* (ExPEC) Suşlarında Cytotoxic Necrotizing Factor (**cnf1**, **cnf2**, **cnf3**) ve Cytolethal Distending Toxin (**cdt1**, **cdt2**, **cdt3**, **cdt4**) Dağılımı ve Filogenetik İlişkilerinin PFGE ile Tespitinin sorgulandığı çalışma sonunda;

- 1- CNF gen ailesinin özellikle üriner sistemde *E. coli* kolonizasyonunu arttırdığı ve *E. coli* gen havuzundaki bu genler ile, yeni ortamlarda insan idrar yolu gibi hayatta kalma yeteneği kazandığı,
- 2- *E. coli*'de **cnf** geninin yaygın difüzyonu, kommensal suşlardan ExPEC'i ayırmaya yardımcı olabileceği ve bu genlerin, non-kommensal *E. coli* için spesifik bir marker olabileceği,
- 3- *E. coli* 4 filogrubundan (A, B1, B2, D); özellikle B2 ve D'nin ExPEC suşları, A ve B1'in ise kommensal suşlardan oluştuğu ve patojen-nonpatojen ayırımında kullanılabiliceği,
- 4- Virülans genleri açısından pozitif olan 156 suşun PFGE ile 106 büyük küme içerisinde dağıldıkları, yani filogenetik ilişkilerinin çok zayıf olduğu tespit edilerek;
  - a- *E. coli* suşlarının antibiyotik baskısında dahil olmak üzere karşılaştıkları olumsuz şartlarda delesyon, rekombinasyon mutasyonları sonucunda farklı virülans genlerini kazanarak ExPEC özelliği kazandığı,
  - b- Bu sebeple ExPEC suşları arasında çoklu ilaç direncinin yaygın görüldüğü ve tedavide başarısızlıklarının yaşanmasına yol açtığı
  - c- Dirençli suşlar ile oluşan ExPEC enfeksiyonlarının da farklı sebepler ile immun sistemi baskılanmış yatan hastada daha ciddi problemler yaratacağı kanaatine varılmış olup, ülkemizde aşı çalışmalarında dahil olmak üzere ExPEC suşlarının moleküler epidemiyolojik özelliklerinin takip edilmesinin uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004.** 2:123–140.
2. **Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen.** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000.** 66:4555–4558.
3. **Gordon, D. M., O. Clermont, H. Tolley, and E. Denamur.** Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ. Microbiol.* **2008.** 10:2484–2496
4. **Ochman, H., and R. K. Selander.** Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* **1984.**157:690–693
5. **Nowrouzian, F. L., A. E. Wold, and I. Adlerberth.** *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *J. Infect. Dis.* **2005.** 191:1078–1083.
6. **Picard, B., J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahim, E. Bingen, J. Elion, and E. Denamur.** The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* **1999.** 67:546–553.
7. **Bingen-Bidois, M., O. Clermont, S. Bonacorsi, M. Terki, N. Brahim, C. Loukil, D. Barraud, and E. Bingen.** Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect. Immun.* **2002.**70:3216–3226
8. **Johnson, J.R., M.A. Kuskowski, A. Gajewski, S. Soto, J.P. Horcajada, M.T. Jimenez de Anta, and J. Vila.** Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J. Infect. Dis.* **2005.**191:46–50.
9. **Johnson, J.R., K. Owens, A. Gajewski, and M.A. Kuskowski.** Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. *J. Clin. Microbiol.* **2005.** 43:6064–6072.
10. **Johnson, J. R., F. Scheutz, P. Ulleryd, M. A. Kuskowski, T. T. O’ Bryan, and T. Sandberg.** Host-pathogen relationships among *Escherichia coli* isolates recovered from men with febrile urinary tract infection. *Clin. Infect. Dis.* **2005.**40:813–822
11. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004.** 2:123–140.
12. **Wiles, T. J., R. R. Kulesus, and M. A. Mulvey.** Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.* **2008.**85:11–19.
13. **Nougayrède, J. P., S. Homburg, F. Taieb, M. Boury, E. Brzuszkiewicz, G. Gottschalk, C. Buchrieser, J. Hacker, U. Dobrindt, and E. Oswald.** *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* **2006.** 313:848–851
14. **Pe’rès, S. Y., O. Marches, F. Daigle, J. P. Nougayrède, F. Herault, C. Tasca, J. De Rycke, and E. Oswald.** A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.* **1997.** 24:1095–1107
15. **Hacker, J., U. Hentschel, and U. Dobrindt.** Prokaryotic chromosomes and disease. *Science* **2003.** 301:790–793



16. **Bentley,R. and Meganathan,R.** Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol. Rev.* (1982). 46, 241-280.
17. **Reid,G., Howard,J., and Gan,B.S.** Can bacterial interference prevent infection? *Trends Microbiol.* (2001). 9, 424-428.
18. **Farthing,M.J.** Bugs and the gut: an unstable marriage. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* (2004). 18, 233-239.
19. **Levine,M.M., Xu,J.G., Kaper,J.B., Lior,H., Prado,V., Tall,B., Nataro,J., Karch,H., and Wachsmuth,K.** A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* (1987). 156, 175-182.
20. **Clarke,S.C., Haigh,R.D., Freestone,P.P., and Williams,P.H.** Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* (2003). 16, 365378.
21. **Hudault,S., Guignot,J., and Servin,A.L.** *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. (2001). *Gut* 49, 47-55.
22. **Caprioli,J., Peng,L., and Remuzzi,G.** The hemolytic uremic syndromes. *Curr. Opin. Crit Care* (2005). 11, 487-492.
23. **Donnenberg MS. Enterobacteriaceae.** In: **Mandell GL, Bennett JE, Dolin R.** eds. *Mandell Douglas and Bennett's Principles and Practise of Infectious Diseases*, 6th ed Philadelphia:Churchill Livinstone, 2005; 2567-2587.
24. **Şahin İ, Başoğlu B.** *Gıda Mikrobiyolojisi*, 2. Baskı. Bursa, Dora Basım- Yayın Dağıtım Ltd. Şti. 2011; 34- 38.
25. **Nataro,J.P. and Kaper,J.B.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* (1998). 11, 142-201.
26. **Johnson,J.R. and Stell,A.L.** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* (2000). 181, 261-272.
27. **Picard,B., Garcia,J.S., Gouriou,S., Duriez,P., Brahimi,N., Bingen,E., Elion,J., and Denamur,E.** The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun.* (1999). 67, 546-553.
28. **Russo,T.A. and Johnson,J.R.** Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes. Infect.* (2003). 5, 449-456
29. **Johnson,J.R. and Russo,T.A.** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". *J. Lab Clin. Med.* (2002). 139, 155-162
30. **Russo,T.A. and Johnson,J.R.** Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* (2000). 181, 1753-1754.
31. **Pupo,G.M., Karaolis,D.K., Lan,R., and Reeves,P.R.** Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect. Immun.* (1997). 65, 2685-2692.
32. **Johnson,J.R., Delavari,P., Kuskowski,M., and Stell,A.L.** Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* (2001a). 183, 78-88.

33. **Herzer,P.J., Inouye,S., Inouye,M., and Whittam,T.S.** Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (1990). 172, 6175-6181.
34. **Dobrindt,U. and Hacker,J.** Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* (2001). 4, 550-557.
35. **Bidet,P., Bonacorsi,S., Clermont,O., De Montille,C., Brahimi,N., and Bingen,E.** Multiple insertional events, restricted by the genetic background, have led to acquisition of pathogenicity island III96-like domains among *Escherichia coli* strains of different clinical origins. *Infect. Immun.* (2005). 73, 4081-4087.
36. **Dobrindt,U., Blum-Oehler,G., Nagy,G., Schneider,G., Johann,A., Gottschalk,G., and Hacker,J.** Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* (2002). 70, 6365-6372.
37. **Le Gall,T., Darlu,P., Escobar-Paramo,P., Picard,B., and Denamur,E.** Selection-driven transcriptome polymorphism in *Escherichia coli*/*Shigella* species. *Genome Res.* (2005). 15, 260-268.
38. **Picard,B., Garcia,J.S., Gouriou,S., Duriez,P., Brahimi,N., Bingen,E., Elion,J., and Denamur,E.** The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun.* (1999). 67, 546-553.
39. **Souza,V., Rocha,M., Valera,A., and Eguiarte,L.E.** Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl. Environ. Microbiol.* (1999). 65, 3373-3385.
40. **Duriez,P., Clermont,O., Bonacorsi,S., Bingen,E., Chaventre,A., Elion,J., Picard,B., and Denamur,E.** Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* (2001). 147, 1671-1676.
41. **Murray,A.C., Kuskowski,M.A., and Johnson,J.R.** Virulence factors predict *Escherichia coli* colonization patterns among human and animal household members. *Ann. Intern. Med.* (2004). 140, 848-849.
42. **Nowrouzian,F.L., Wold,A.E., and Adlerberth,I.** *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *J. Infect. Dis.* (2005). 191, 1078-1083.
43. **Siitonen,A.** *Escherichia coli* in fecal flora of healthy adults: serotypes, P and type 1C fimbriae, non-P mannose-resistant adhesins, and hemolytic activity. *J Infect Dis* (1992). 166, 1058-1065.
44. **Johnson,J.R., Brown,J.J., Carlino,U.B., and Russo,T.A.** Colonization with and acquisition of uropathogenic *Escherichia coli* as revealed by polymerase chain reaction-based detection. *J. Infect. Dis.* (1998). 177, 1120-1124.
45. **Hochhut,B., Dobrindt,U., and Hacker,J.** Pathogenicity islands and their role in bacterial virulence and survival. *Contrib. Microbiol.* (2005). 12, 234-254.
46. **Groisman,E.A. and Ochman,H.** Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* (1996).87, 791-794.
47. **Hacker,J., Bender,L., Ott,M., Wingender,J., Lund,B., Marre,R., and Goebel,W.** Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathog.* (1990). 8, 213-225.

48. **Johnson,J.R.** Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. Clin Microbiol Rev. (1991). 4, 80-128.
49. **Kusecek,B., Wloch,H., Mercer,A., Vaisanen,V., Pluschke,G., Korhonen,T., and Achtman,M.** Lipopolysaccharide, capsule, and fimbriae as virulence factors among O1, O7, O16, O18, or O75 and K1, K5, or K100 Escherichia coli. Infect. Immun. (1984). 43, 368-379.
50. **Russo,T., Brown,J.J., Jodush,S.T., and Johnson,J.R.** The O4 specific antigen moiety of lipopolysaccharide but not the K54 group 2 capsule is important for urovirulence of an extraintestinal isolate of Escherichia coli. Infect. Immun. (1996). 64, 2343-2348.
51. **Reisner,A., Haagensen,J.A., Schembri,M.A., Zechner,E.L., and Molin,S.** Development and maturation of Escherichia coli K-12 biofilms. Mol. Microbiol. (2003). 48, 933-946.
52. **Keenleyside,W.J., Bronner,D., Jann,K., Jann,B., and Whitfield,C.** Coexpression of colanic acid and serotype-specific capsular polysaccharides in Escherichia coli strains with group II K antigens. J. Bacteriol. (1993). 175, 6725-6730.
53. **Horwitz,M.A. and Silverstein,S.C.** Influence of the Escherichia coli capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. J. Clin. Invest(1980). 65, 82-94.
54. **Pluschke,G., Mayden,J., Achtman,M., and Levine,R.P.** Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 Escherichia coli to complement-mediated killing. Infect. Immun. (1983a). 42, 907-913.
55. **Pluschke,G., Mercer,A., Kusecek,B., Pohl,A., and Achtman,M.** Induction of bacteremia in newborn rats by Escherichia coli K1 is correlated with only certain O (lipopolysaccharide) antigen types. Infect. Immun. (1983b). 39, 599-608.
56. **Schneider,G., Dobrindt,U., Bruggemann,H., Nagy,G., Janke,B., Blum-Oehler,G., Buchrieser,C., Gottschalk,G., Emody,L., and Hacker,J.** The pathogenicity island-associated K15 capsule determinant exhibits a novel genetic structure and correlates with virulence in uropathogenic Escherichia coli strain 536. Infect. Immun. (2004). 72, 5993-6001.
57. **Suerbaum,S., Friedrich,S., Leying,H., and Opferkuch,W.** Expression of capsular polysaccharide determines serum resistance in Escherichia coli K92. Zentralbl. Bakteriол. (1994). 281, 146-157.
58. **Korhonen,T.K., Valtonen,M.V., Parkkinen,J., Vaisanen-Rhen,V., Finne,J., Orskov,F., Orskov,I., Svenson,S.B., and Makela,P.H.** Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of Escherichia coli strains associated with neonatal sepsis and meningitis. Infect. Immun. (1985). 48, 486-491.
59. **Johnson,J.R., Orskov,I., Orskov,F., Goulet,P., Picard,B., Moseley,S.L., Roberts,P.L., and Stamm,W.E.** O, K, and H antigens predict virulence factors, carboxylesterase B pattern, antimicrobial resistance, and host compromise among Escherichia coli strains causing urosepsis. J. Infect. Dis. (1994). 169, 119-126.
60. **Snyder,J.A., Haugen,B.J., Buckles,E.L., Lockatell,C.V., Johnson,D.E., Donnenberg,M.S., Welch,R.A., and Mobley,H.L.** Transcriptome of uropathogenic Escherichia coli during urinary tract infection. Infect Immun. (2004). 72, 6373-6381.
61. **Korhonen,T.K., Vaisanen,V., Saxen,H., Hultberg,H., and Svenson,S.B.** Pantigen-recognizing fimbriae from human uropathogenic Escherichia coli strains. Infect. Immun. (1982). 37, 286-291.

62. **Wullt,B., Bergsten,G., Connell,H., Rollano,P., Gebretsadik,N., Hull,R., and Svanborg,C.** P fimbriae enhance the early establishment of *Escherichia coli* in the human urinary tract. *Mol. Microbiol.* (2000). 38, 456-464.
63. **Wullt,B., Bergsten,G., Samuelsson,M., and Svanborg,C.** The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. *Int. J Antimicrob. Agents* (2002). 19, 522-538.
64. **Ofek,I., Goldhar,J., Eshdat,Y., and Sharon,N.** The importance of mannose specific adhesins (lectins) in infections caused by *Escherichia coli*. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl* (1982). 33, 61-67.
65. **Korhonen,T.K., Vaisanen-Rhen,V., Rhen,M., Pere,A., Parkkinen,J., and Finne,J.** *Escherichia coli* fimbriae recognizing sialyl galactosides. *J. Bacteriol.* (1984). 159, 762-766.
66. **Parkkinen,J., Ristimaki,A., and Westerlund,B.** Binding of *Escherichia coli* S fimbriae to cultured human endothelial cells. *Infect. Immun.* (1989). 57, 2256-2259.
67. **Marre,R., Hacker,J., Henkel,W., and Goebel,W.** Contribution of cloned virulence factors from uropathogenic *Escherichia coli* strains to nephropathogenicity in an experimental rat pyelonephritis model. *Infect. Immun.* (1986). 54, 761-767.
68. **Ott,M., Hacker,J., Schmoll,T., Jarchau,T., Korhonen,T.K., and Goebel,W.** Analysis of the genetic determinants coding for the S-fimbrial adhesin (sfa) in different *Escherichia coli* strains causing meningitis or urinary tract infections. *Infect. Immun.* (1986). 54, 646-653.
69. **Pere,A., Nowicki,B., Saxen,H., Siitonen,A., and Korhonen,T.K.** Expression of P, type-1, and type-1C fimbriae of *Escherichia coli* in the urine of patients with acute urinary tract infection. *J. Infect. Dis.* (1987). 156, 567-574.
70. **Orskov,I. and Orskov,F.** *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. *J. Hyg. (Lond)* (1985). 95, 551-575.
71. **Arthur,M., Johnson,C.E., Rubin,R.H., Arbeit,R.D., Campanelli,C., Kim,C., Steinbach,S., Agarwal,M., Wilkinson,R., and Goldstein,R.** Molecular epidemiology of adhesin and hemolysin virulence factors among uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* (1989). 57, 303-313.
72. **Abraham,S.N., Sun,D., Dale,J.B., and Beachey,E.H.** Conservation of the Dmannose-adhesion protein among type 1 fimbriated members of the family Enterobacteriaceae. *Nature* (1988). 336, 682-684.
73. **Mobley,H.L., Chippendale,G.R., Tenney,J.H., Hull,R.A., and Warren,J.W.** Expression of type 1 fimbriae may be required for persistence of *Escherichia coli* in the catheterized urinary tract. *J. Clin. Microbiol.* (1987). 25, 2253-2257.
74. **Labigne-Roussel,A. and Falkow,S.** Distribution and degree of heterogeneity of the afimbrial-adhesin-encoding operon (afa) among uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Infect. Immun.* (1988). 56, 640-648.
75. **Nowicki,B., Svanborg-Eden,C., Hull,R., and Hull,S.** Molecular analysis and epidemiology of the Dr hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* (1989). 57, 446-451.
76. **Nowicki,B., Labigne,A., Moseley,S., Hull,R., Hull,S., and Moulds,J.** The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. *Infect. Immun.* (1990). 58, 279-281.

77. **Goldberg,M.B., Boyko,S.A., Butterton,J.R., Stoebner,J.A., Payne,S.M., and Calderwood,S.B.** Characterization of a *Vibrio cholerae* virulence factor homologous to the family of TonB-dependent proteins. *Mol. Microbiol.* (1992). 6, 2407-2418.
78. **Tarr,P.I., Bilge,S.S., Vary,J.C., Jr., Jelacic,S., Habeeb,R.L., Ward,T.R., Baylor,M.R., and Besser,T.E.** Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect. Immun.* (2000). 68, 1400-1407.
79. **Mey,A.R., Wyckoff,E.E., Oglesby,A.G., Rab,E., Taylor,R.K., and Payne,S.M.** Identification of the *Vibrio cholerae* enterobactin receptors VctA and IrgA: IrgA is not required for virulence. *Infect. Immun.* (2002). 70, 3419-3426.
80. **Kanamaru,S., Kurazono,H., Ishitoya,S., Terai,A., Habuchi,T., Nakano,M., Ogawa,O., and Yamamoto,S.** Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors *iroN*, *iha*, *kpsMT*, *ompT* and *usp* in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. *J. Urol.* (2003). 170, 2490-2493.
81. **Johnson,J.R., Jelacic,S., Schoening,L.M., Clabots,C., Shaikh,N., Mobley,H.L., and Tarr,P.I.** The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infect. Immun.* (2005a). 73, 965-971.
82. **Prager,R., Strutz,U., Fruth,A., and Tschape,H.** Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)-antigens: serotyping versus *fliC* polymorphisms. *Int. J. Med. Microbiol.* (2003). 292, 477-486.
83. **Nougayrede,J.P., Fernandes,P.J., and Donnenberg,M.S.** Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol.* (2003). 5, 359-372.
84. **Best,A., La Ragione,R.M., Sayers,A.R., and Woodward,M.J.** Role for flagella but not intimin in the persistent infection of the gastrointestinal tissues of specificpathogen-free chicks by shiga toxin-negative *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* (2005). 73, 1836-1846.
85. **Tenorio,E., Saeki,T., Fujita,K., Kitakawa,M., Baba,T., Mori,H., and Isono,K.** Systematic characterization of *Escherichia coli* genes/ORFs affecting biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* (2003). 225, 107-114.
86. **Taylor,P.W.** Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gramnegative bacteria. *Microbiol. Rev.* (1983). 47, 46-83.
87. **Perez-Casal,J.F. and Crosa,J.H.** Aerobactin iron uptake sequences in plasmid ColV-K30 are flanked by inverted IS1-like elements and replication regions. *J. Bacteriol.* (1984). 160, 256-265
88. **Otto,B.R., van Dooren,S.J., Nuijens,J.H., Luirink,J., and Oudega,B.** Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. *J. Exp. Med.* (1998). 188, 1091-1103.
89. **Guyer,D.M., Radulovic,S., Jones,F.E., and Mobley,H.L.** Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect. Immun.* (2002). 70, 4539-4546.
90. **Kukkonen,M. and Korhonen,T.K.** The *ompT* family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *Int. J. Med. Microbiol.* (2004). 294, 7-14.
91. **Parham,N.J., Srinivasan,U., Desvaux,M., Foxman,B., Marrs,C.F., and Henderson,I.R.** PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* (2004). 230, 73-83.

92. **Guyer,D.M., Henderson,I.R., Nataro,J.P., and Mobley,H.L.** Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol* (2000). 38, 53-66.
93. **Anderson,G.G., Dodson,K.W., Hooton,T.M., and Hultgren,S.J.** Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol* (2004). 12, 424-430.
94. **Bellini,E.M., Elias,W.P., Gomes,T.A., Tanaka,T.L., Taddei,C.R., Huerta,R., NavarroGarcia,F., and Martinez,M.B.** Antibody response against plasmid-encoded toxin (Pet) and the protein involved in intestinal colonization (Pic) in children with diarrhea produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (2005). 43, 259-264.
95. **Henderson,I.R., Czczulin,J., Eslava,C., Noriega,F., and Nataro,J.P.** Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* (1999). 67, 5587-5596.
96. **Tivendale,K.A., Allen,J.L., Ginns,C.A., Crabb,B.S., and Browning,G.F.** Association of iss and iucA, but not tsh, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* (2004). 72, 6554-6560.
97. **Grodberg,J., Lundrigan,M.D., Toledo,D.L., Mangel,W.F., and Dunn,J.J.** Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the ompT gene of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* (1988). 16, 1209.
98. **Braun,V.** Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci.* (2003). 8, s1409-s1421.
99. **Johnson,J.R., Kuskowski,M.A., Gajewski,A., Soto,S., Horcajada,J.P., Jimenez de Anta,M.T., and Vila,J.** Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J Infect Dis.* (2005b). 191, 46-50.
100. **Schubert,S., Rakin,A., Karch,H., Carniel,E., and Heesemann,J.** Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun.* (1998). 66, 480-485.
101. **Johnson,J.R., Scheutz,F., Ulleryd,P., Kuskowski,M.A., O'Bryan,T.T., and Sandberg,T.** Phylogenetic and pathotypic comparison of concurrent urine and rectal *Escherichia coli* isolates from men with febrile urinary tract infection. *J Clin Microbiol.* (2005c). 43, 3895-3900.
102. **Garenaux A, Caza M, Dozois CM,** The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbial.* (2011). Nov 21;153(1-2):89-98.
103. **Braun,V.** Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci.* (2003). 8, s1409-s1421.
104. **Garenaux A, Caza M, Dozois CM,** The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbial.* (2011). Nov 21;153(1-2):89-98
105. **Leveille,S., Caza,M., Johnson,J.R., Clabots,C., Sabri,M., and Dozois,C.M.** Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catechol siderophore receptor. *Infect Immun.* (2006). 74, 3427-3436.
106. **Baumler,A.J., Norris,T.L., Lasco,T., Voight,W., Reissbrodt,R., Rabsch,W., and Heffron,F.** *IroN*, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* (1998). 180, 1446-1453.

107. **Russo,T.A., Carlino,U.B., and Johnson,J.R.** Identification of a new ironregulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* (2001). 69, 6209-6216.
108. **Russo,T.A., McFadden,C.D., Carlino-MacDonald,U.B., Beanan,J.M., Barnard,T.J., and Johnson,J.R.** *IroN* functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* (2002). 70, 7156-7160.
109. **Anderson,G.G., Palermo,J.J., Schilling,J.D., Roth,R., Heuser,J., and Hultgren,S.J.** Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* (2003). 301, 105-107.
110. **Welch,R.A.** Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol* (1991). 5, 521-528.
111. **Stanley,P., Koronakis,V., and Hughes,C.** Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (1998). 62, 309-333.
112. **Koronakis,V.** TolC--the bacterial exit duct for proteins and drugs. *FEBS Lett.* (2003). 555, 66-71.
113. **Thanabalu,T., Koronakis,E., Hughes,C., and Koronakis,V.** Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E.coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J* (1998). 17, 64876496.
114. **Wandersman,C. and Delepelaire,P.** TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (1990). 87, 47764780.
115. **Lally,E.T., Hill,R.B., Kieba,I.R., and Korostoff,J.** The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol.* (1999). 7, 356-361.
116. **Laestadius,A., Soderblom,T., Aperia,A., and Richter-Dahlfors,A.** Developmental aspects of *Escherichia coli*-induced innate responses in rat renal epithelial cells. *Pediatr. Res.* (2003). 54, 536-541.
117. **Soderblom,T., Laestadius,A., Oxhamre,C., Aperia,A., and Richter-Dahlfors,A.** Toxin-induced calcium oscillations: a novel strategy to affect gene regulation in target cells. *Int. J. Med. Microbiol.* (2002). 291, 511-515.
118. **Uhlen,P., Laestadius,A., Jahnukainen,T., Soderblom,T., Backhed,F., Celsi,G., Brismar,H., Normark,S., Aperia,A., and Richter-Dahlfors,A.** Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca<sup>2+</sup> oscillations in renal epithelial cells. *Nature* (2000). 405, 694-697.
119. **Bauer,R.J., Zhang,L., Foxman,B., Siitonen,A., Jantunen,M.E., Saxen,H., and Marrs,C.F.** Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *iroN*(*E. coli*). *J Infect Dis* (2002). 185, 1521-1524.
120. **Kurazono,H., Yamamoto,S., Nakano,M., Nair,G.B., Terai,A., Chaicumpa,W., and Hayashi,H.** Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenicspecific protein. *Microb. Pathog.* (2000). 28, 183-189.
121. **Parret,A.H. and De Mot,R.** *Escherichia coli*'s uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity? *Microbiology* (2002). 148, 1604-1606.
122. **Gillor,O., Kirkup,B.C., and Riley,M.A.** Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Adv. Appl. Microbiol.* (2004). 54, 129-146.

123. **Patzer,S.I., Baquero,M.R., Bravo,D., Moreno,F., and Hantke,K.** The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and Iron. *Microbiology* (2003). 149, 25572570.
124. **Azpiroz,M.F., Rodriguez,E., and Lavina,M.** The structure, function, and origin of the microcin H47 ATP-binding cassette exporter indicate its relatedness to that of colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2001). 45, 969-972.
125. **Svanborg,C., Frendeus,B., Godaly,G., Hang,L., Hedlund,M., and Wachtler,C.** Toll-like receptor signaling and chemokine receptor expression influence the severity of urinary tract infection. *J. Infect. Dis.* (2001). 183 Suppl 1, S61-S65.
126. **Fischer,H., Yamamoto,M., Akira,S., Beutler,B., and Svanborg,C.** Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *Eur. J. Immunol.* (2006). 36, 267-277.
127. **Cross,A., Asher,L., Seguin,M., Yuan,L., Kelly,N., Hammack,C., Sadoff,J., and Gemski,P., Jr.** The importance of a lipopolysaccharide-initiated, cytokine-mediated host defense mechanism in mice against extraintestinally invasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest* (1995). 96, 676-686.
128. **Austin,P.F., Casale,A.J., Cain,M.P., Rink,R.C., and Weintraub,S.J.** Lipopolysaccharide and inflammatory cytokines cause an inducible nitric oxide synthase-dependent bladder smooth muscle fibrotic response. *J. Urol.* (2003). 170, 645-648.
129. **Backhed,F., Normark,S., Schweda,E.K., Oscarson,S., and Richter-Dahlfors,A.** Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes. Infect.* (2003). 5, 1057-1063.
130. **Blomgran,R., Zheng,L., and Stendahl,O.** Uropathogenic *Escherichia coli* triggers oxygen-dependent apoptosis in human neutrophils through the cooperative effect of type 1 fimbriae and lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* (2004). 72, 4570-4578.
131. **Hedlund,M., Frendeus,B., Wachtler,C., Hang,L., Fischer,H., and Svanborg,C.** Type 1 fimbriae deliver an LPS- and TLR4-dependent activation signal to CD14-negative cells. *Mol. Microbiol.* (2001). 39, 542-552.
132. **Villalonga, P.; Ridley, A.J.** Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors* 2006, 24, 159-164.
133. **Aktorics, K.; Schmidt, G.;** Just, I. Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol. Chem.* 2000, 381, 421-426.
134. **Caprioli, A.; Falbo, V.; Roda, L.G.; Ruggeri, F.M.; Zona, C.** Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.* 1983, 39, 1300-1306.
135. **Foxman, B.; Zhang, L.; Palin, K.; Tallman, P.; Marrs, C.F.** Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection. *J. Infect. Dis.* 1995, 171, 1514-1521.
136. **Foxman, B.** Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am. J. Med.* 2002, 113 Suppl 1A, 5S-13S.
137. **Landraud, L.; Gauthier, M.; Boquet, P.** Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. *Lett. Appl. Microbiol.* 2000, 30, 213-216.



138. **Yamamoto, S.; Tsukamoto, T.; Terai, A.; Kurazono, H.; Takeda, Y.; Yoshida, O.** Distribution of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from urine of cystitis patients. *Microbiol. Immunol.* **1995**, *39*, 401–404.
139. **Rippere-Lampe, K.E.; O'Brien, A.D.; Conran, R.; Lockman, H.A.** Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (cnf1) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 3954–3964.
140. **Fournout, S.; Dozois, C.M.; Odin, M.; Desautels, C.; Pérès, S.; Hérault, F.; Daigle, F.; Segafredo, C.; Laffitte, J.; Oswald, E.; Fairbrother, J.M.; Oswald, I.P.** Lack of a role of cytotoxic necrotizing factor 1 toxin from *Escherichia coli* in bacterial pathogenicity and host cytokine response in infected germfree piglets. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 839–847.
141. **Petkovsek, Z.; Elersic, K.; Gubina, M.; Zgur-Bertok, D.; Starcic, E.M.** Virulence potential of *Escherichia coli* isolates from skin and soft tissue infections. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 1811–1817.
142. **Khan, N.A.; Wang, Y.; Kim, K.J.; Chung, J.W.; Wass, C.A.; Kim, K.S.** Cytotoxic necrotizing factor-1 contributes to *Escherichia coli* K1 invasion of the central nervous system. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15607–15612.
143. **Ananias, M.; Yano, T.** Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2008**, *41*, 877–883.
144. **Oswald, E.; de Rycke, J.; Guillot, J.F.; Boivin, R.** Cytotoxic effect of multinucleation in HeLa cell cultures associated with the presence of Vir plasmid in *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **1989**, *58*, 95–100.
145. **Orden, J.A.; Dominguez-Bernal, G.; Martinez-Pulgarin, S.; Blanco, M.; Blanco, J.E.; Mora, A.; Blanco, J.; Blanco, J.; de la, F.R.** Necrotoxicogenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes. *Int. Microbiol.* **2007**, *10*, 47–55.
146. **Oswald, E.; de Rycke, J.** A single protein of 110 kDa is associated with the multinucleating and necrotizing activity coded by the Vir plasmid of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1990**, *68*, 279–284.
147. **Kadhun, H.J.; Finlay, D.; Rowe, M.T.; Wilson, I.G.; Ball, H.J.** Occurrence and characteristics of cytotoxic necrotizing factors, cytolethal distending toxins and other virulence factors in *Escherichia coli* from human blood and faecal samples. *Epidemiol. Infect.* **2008**, *136*, 752–760.
148. **Falzano, L.; Fiorentini, C.; Donelli, G.; Michel, E.; Kocks, C.; Cossart, P.; Cabanié, L.; Oswald, E.; Boquet, P.** Induction of phagocytic behaviour in human epithelial cells by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor type 1. *Mol. Microbiol.* **1993**, *9*, 1247–1254.
149. **Rippere-Lampe, K.E.; Lang, M.; Ceri, H.; Olson, M.; Lockman, H.A.; O'Brien, A.D.** Cytotoxic necrotizing factor type 1-positive *Escherichia coli* causes increased inflammation and tissue damage to the prostate in a rat prostatitis model. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 6515–6519.
150. **Hopkins, A.M.; Walsh, S.V.; Verkade, P.; Boquet, P.; Nusrat, A.** Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 725–742.
151. **Hofmann, P.; Le Negrate, G.; Mograbi, B.; Hofmann, V.; Brest, P.; Alliana-Schmid, A.; Flatau, G.; Boquet, P.; Rossi, B.** *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1) increases the adherence to epithelia and the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes but decreases bacteria phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* **2000**, *68*, 522–528.

152. **Doye, A.; Mettouchi, A.; Bossis, G.; Clément, R.; Buisson-Touati, C.; Flatau, G.; Gagnoux, L.; Piechaczyk, M.; Boquet, P.; Lemichez, E.** CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* **2002**, 111, 553–564.
153. **Lax, A.J.** Bacterial toxins and cancer—A case to answer? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 343–349.
154. **Miraglia, A.G.; Travaglione, S.; Meschini, S.; Falzano, L.; Matarrese, P.; Quaranta, M.G.; Viora, M.; Fiorentini, C.; Fabbri, A.** Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/IkappaB kinase pathway: role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol. Biol. Cell* **2007**, 18, 2735–2744.
155. **Schmidt, G.; Sehr, P.; Wilm, M.; Selzer, J.; Mann, M.; Aktories, K.** Gln63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1. *Nature* **1997**, 387, 725–729.
156. **Flatau, G.; Lemichez, E.; Gauthier, M.; Chardin, P.; Paris, S.; Fiorentini, C.; Boquet, P.** Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* **1997**, 387, 729–733.
157. **Horiguchi, Y.; Nakai, T.; Kume, K.** Purification and characterization of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin. *Microb. Pathogen.* **1989**, 6, 361–368.
158. **Masuda, M.; Betancourt, L.; Matsuzawa, T.; Kashimoto, T.; Takao, T.; Shimonishi, Y.; Horiguchi, Y.** Activation of Rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin. *EMBO J.* **2000**, 19, 521–530.
159. **Schmidt, G.; Goehring, U.-M.; Schirmer, J.; Uttenweiler-Joseph, S.; Wilm, M.; Lohmann, M.; Giese, A.; Schmalzing, G.; Aktories, K.** Lysine and polyamines are substrates for transglutamination of Rho by the *Bordetella* dermonecrotic toxin. *Infect. Immun.* **2001**, 69, 7663–7670.
160. **McNichol, B.A.; Rasmussen, S.B.; Meysick, K.C.; O'Brien, A.D.** A single amino acid substitution in the enzymatic domain of cytotoxic necrotizing factor type 1 of *Escherichia coli* alters the tissue culture phenotype to that of the dermonecrotic toxin of *Bordetella* spp. *Mol. Microbiol.* **2006**, 60, 939–950.
161. **Schmidt, G.; Goehring, U.-M.; Schirmer, J.; Lerm, M.; Aktories, K.** Identification of the C-terminal part of *Bordetella* dermonecrotic toxin as a transglutaminase for Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 31875–31881.
162. **Fiorentini, C.; Fabbri, A.; Flatau, G.; Donelli, G.; Matarrese, P.; Lemichez, E.; Falzano, L.; Boquet, P.** *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1), a toxin that activates the Rho GTPase. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 19532–19537.
163. **Denko, N.; Langland, R.; Barton, M.; Lieberman, M.A.** Uncoupling of S-phase and mitosis by recombinant cytotoxic necrotizing factor 2 (CNF2). *Exp. Cell Res.* **1997**, 234, 132–138.
164. **Malorni, W.; Fiorentini, C.** Is the Rac GTPase-activating toxin CNF1 a smart hijacker of host cell fate? *FASEB J.* **2006**, 20, 606–609.
165. **Hoffmann, C.; Pop, M.; Leemhuis, J.; Schirmer, J.; Aktories, K.; Schmidt, G.** The *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxic necrotizing factor (CNFY) selectively activates RhoA. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 16026–16032.


166. **Sugai, M.; Hatazaki, K.; Mogami, A.; Ohta, H.; Pérès, S.Y.; Hérault, F.; Horiguchi, Y.; Masuda, M.; Ueno, Y.; Komatsuzawa, H.; Suginaka, H.; Oswald, E.** Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by pathogenic *Escherichia coli* deamidates a Gln residue in the conserved G-3 domain of the Rho family and preferentially inhibits the GTPase activity of RhoA and Rac1. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 6550–6557.
167. **Stoll, T.; Markwirth, G.; Reipschlager, S.; Schmidt, G.** A new member of a growing toxin family *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 3 (CNF3). *Toxicon* **2009**, *54*, 745–753.
168. **Lerm, M.; Pop, M.; Fritz, G.; Aktories, K.; Schmidt, G.** Proteasomal degradation of cytotoxic necrotizing factor 1-activated Rac. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 4053–4058.
169. **Munro, P.; Flatau, G.; Doye, A.; Boyer, L.; Oregioni, O.; Mege, J.L.; Landraud, L.; Lemichez, E.** Activation and proteasomal degradation of Rho GTPases by CNF1 elicit a controlled inflammatory response. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35849–35857.
170. **Pop, M.; Aktories, K.; Schmidt, G.** Isotype-specific degradation of Rac activated by the cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1). *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35840–35848.
171. **Lemichez, E.; Flatau, G.; Bruzzone, M.; Boquet, P.; Gauthier, M.** Molecular localization of the *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor CNF1 cell-binding and catalytic domains. *Mol. Microbiol.* **1997**, *24*, 1061–1070.
172. **Schmidt, G.; Selzer, J.; Lerm, M.; Aktories, K.** The Rho-deamidating cytotoxic-necrotizing factor CNF1 from *Escherichia coli* possesses transglutaminase activity - cysteine-866 and histidine-881 are essential for enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13669–13674.
173. **Buetow, L.; Flatau, G.; Chiu, K.; Boquet, P.; Ghosh, P.** Structure of the Rho-activating domain of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 584–588.
174. **Hoffmann, C.; Aktories, K.; Schmidt, G.** Change in substrate specificity of Cytotoxic Necrotizing Factor (CNF) unmasks proteasome-independent down-regulation of constitutively active RhoA. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 10826–10832.
175. **Buetow, L.; Ghosh, P.** Structural elements required for deamidation of RhoA by cytotoxic necrotizing factor 1. *Biochemistry* **2003**, *42*, 12784–12791.
176. **Contamin, S.; Galmiche, A.; Doye, A.; Flatau, G.; Benmerah, A.; Boquet, P.** The p21 Rhoactivating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 is endocytosed by a clathrin-independent mechanism and enters the cytosol by an acidic-dependent membrane translocation step. *Mol. Biol. Cell* **2000**, *11*, 1775–1787.
177. **Fabbri, A.; Gauthier, M.; Boquet, P.** The 5' region of *cnf1* harbours a translational regulatory mechanism for CNF1 synthesis and encodes the cell-binding domain of the toxin. *Mol Microbiol* **1999**, *33*, 108–118.
178. **Chung, J.W.; Hong, S.J.; Kim, K.J.; Goti, D.; Stins, M.F.; Shin, S.; Dawson, V.L.; Dawson, T.M.; Kim, K.S.** 37 kDa laminin receptor precursor modulates cytotoxic necrotizing factor 1-mediated RhoA activation and bacterial uptake. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 16857–16862.
179. **Kim, K.J.; Chung, J.W.; Kim, K.S.** 67-kDa laminin receptor promotes internalization of cytotoxic necrotizing factor 1-expressing *Escherichia coli* K1 into human brain microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 1360–1368.
180. **Blumenthal, B.; Hoffmann, C.; Aktories, K.; Backert, S.; Schmidt, G.** The Cytotoxic Necrotizing Factors from *Yersinia pseudotuberculosis* and from *Escherichia coli* Bind to Different Cellular Receptors but Take the Same Route to the Cytosol. *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 3344–3353.

181. **McNichol, B.A.; Rasmussen, S.B.; Carvalho, H.M.; Meysick, K.C.; O'Brien, A.D.** Two domains of cytotoxic necrotizing factor type 1 bind the cellular receptor, laminin receptor precursor protein. *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 5095–5104.
182. **Werner, G.; Hagenmaier, H.; Drautz, H.; Baumgartner, A.; Zahner, H.** Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity. *J. Antibiotics* **1984**, *37*, 110–117.
183. **Pei, S.; Doye, A.; Boquet, P.** Mutation of specific acidic residues of the CNF1 T domain into lysine alters cell membrane translocation of the toxin. *Mol. Microbiol.* **2001**, *41*, 1237–1247.
184. **O'Keefe, D.O.; Cabiaux, V.; Choe, S.; Eisenberg, D.; Collier, R.J.** pH-dependent insertion of proteins into membranes: B-chain mutation of diphtheria toxin inhibits membrane translocation, Glu-349 » *Lys. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6202–6206
185. **Knust, Z.; Blumenthal, B.; Aktories, K.; Schmidt, G.** Cleavage of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 is required for full biologic activity. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 1835–1841.
186. **Kouokam, J.C.; Wai, S.N.; Fallman, M.; Dobrindt, U.; Hacker, J.; Uhlin, B.E.** Active cytotoxic necrotizing factor 1 associated with outer membrane vesicles from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 2022–2030.
187. **Davis, J.M.; Carvalho, H.M.; Rasmussen, S.B.; O'Brien, A.D.** Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 4401–4408.
188. **Yu Hao; Kim, K.S.** Ferredoxin is involved in secretion of cytotoxic necrotizing factor 1 across the cytoplasmic membrane in *Escherichia coli* K1. *Infect. Immun.* **2009**, doi.10.1128/IAI.00674–09.
189. **Diana, G.; Valentini, G.; Travaglione, S.; Falzano, L.; Pieri, M.; Zona, C.; Meschini, S.; Fabbri, A.; Fiorentini, C.** Enhancement of learning and memory after activation of cerebral Rho GTPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 636–641.
190. **Pavone, F.; Luvisetto, S.; Marinelli, S.; Straface, E.; Fabbri, A.; Falzano, L.; Fiorentini, C.; Malorni, W.** The Rac GTPase-activating bacterial protein toxin CNF1 induces analgesia upregulating mu-opioid receptors. *Pain* **2009**, *145*, 219–229.
191. **Nougayrede, J.P.; Homburg, S.; Taieb, F.; Boury, M.; Brzuszkiewicz, E.; Gottschalk, G.; Buchrieser, C.; Hacker, J.; Dobrindt, U.; Oswald, E.** *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* **2006**, *313*, 848–851.
192. **Spano, S.; Ugalde, J.E.; Galan, J.E.** Delivery of a *Salmonella typhi* exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe* **2008**, *3*, 30–38.
193. **Cortes-Bratti, X.; Chaves-Olarte, E.; Lagergård, T.; Thelestam, M.** Cellular internalization of cytolethal distending toxin from *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 6903–6911.
194. **DA Scott and JB Kaper.** Cloning and Sequencing of The *Escherichia coli* Cytolethal Distending Toxin. *Infection and Immunity*, **1994**; *62*(1): 244–251.
195. **Rasika N Jindasa, Stephen E. Bloom, Robert S. Weiss and Gerald E. Duhamel.** Cytolethal Distending Toxin: a Conserved Bacterial Genotoxin That Blocks Cell Cycle Progression, Leading to Apoptosis of a Broad Range of Mammalian Cell Lineages. *Microbiology*, **2011**; *157*(7): 1851–1875. Doi: 10.1099/Mic.0.049536-0.

196. **Maria Lara-Tejero, Jorge E. Galan.** CdtA, CdtB and CdtC form a Tripartite Complex that is Required for Cytolethal Distending Toxin Activity. *Infectious Immunity*, **2001**; 69 (7):4358–4365. doi:10.1128/IAI.69.7.4358-4365.2001. PMC 98507. PMID 11401974.
197. **Dreyfus, Lawrence, A.** "Cytolethal Distending Toxin", in D. Burns; et al. *Bacterial Protein Toxins*, Washington, DC: ASM Press, **2003**; 257–270.
198. **Lina Guerra, Ximena Cortes-Bratti, Riccardo Guidi, Teresa Frisan.** The Biology of Cytolethal Distending Toxins. **2011**; 3(3): 172–190.
199. **Lina Guerra, Ximena Cortes-Bratti, Riccardo Guidi, Teresa Frisan.** The Biology of Cytolethal Distending Toxins. **2011**; 3(3): 172–190. doi:10.3390/toxins3030172.
200. **Nesic, D.; Hsu, Y.; Stebbins, C.E.** Assembly and function of a bacterial genotoxin. *Nature* **2004**, 429, 429–433.
201. **De Rycke J & Oswald E.** Cytolethal Distending Toxin (CDT): a Bacterial Weapon to Control Host Cell Proliferation. *FEMS Microbiol Lett.* **2001**; 203: 141–148.
202. **Elwell, C.A.; Dreyfus, L.A.** DNAase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol. Microbiol.* **2000**, 37, 952–963.
203. **Lara-Tejero, M.; Galan, J.E.** A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science* **2000**, 290, 354–357.
204. **Hassane, D.C.; Lee, R.B.; Mendenhall, M.D.; Pickett, C.L.** Cytolethal distending toxin demonstrates genotoxic activity in a yeast model. *Infect. Immun.* **2001**, 69, 5752–5759.
205. **Guerra, L.; Teter, K.; Lilley, B.N.; Stenerlow, B.; Holmes, R.K.; Ploegh, H.L.; Sandvig, K.; Thelestam, M.; Frisan, T.** Cellular internalization of cytolethal distending toxin: A new end to a known pathway. *Cell. Microbiol.* **2005**, 7, 921–934.
206. **Rasika N Jindasa, Stephen E. Bloom, Robert S. Weiss and Gerald E. Duhamel.** Cytolethal Distending Toxin: a Conserved Bacterial Genotoxin That Blocks Cell Cycle Progression, Leading to Apoptosis of a Broad Range of Mammalian Cell Lineages. *Microbiology*, **2011**; 157(7): 1851–1875. Doi: 10.1099/Mic.0.049536-0
207. **Svab, D., Horvath, B., Maroti, G., Dobrindt, U., and Toth, I.** Sequence variability of P2-like prophage genomes carrying the cytolethal distending toxin V operon in *Escherichia coli* O157. *Appl. Environ. Microbiol.* (**2013**). 79, 4958–4964. doi: 10.1128/AEM.01134-13
208. **Hu, X.; Nesic, D.; Stebbins, C.E.** Comparative structure-function analysis of cytolethal distending toxins. *Proteins* **2006**, 62, 421–434.
209. **Ueno, Y.; Ohara, M.; Kawamoto, T.; Fujiwara, T.; Komatsuzawa, H.; Oswald, E.; Sugai, M.** Biogenesis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin holotoxin. *Infect. Immun.* **2006**, 74, 3480–3487.
210. **Lee, R.B.; Hassane, D.C.; Cottle, D.L.; Pickett, C.L.** Interactions of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells. *Infect. Immun.* **2003**, 71, 4883–4890.
211. **McSweeney, L.A.; Dreyfus, L.A.** Carbohydrate-binding specificity of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtA-II and CdtC-II subunits. *Infect. Immun.* **2005**, 73, 2051–2060.

212. **13. Mise, K.; Akifusa, S.; Watarai, S.; Ansai, T.; Nishihara, T.; Takehara, T.** Involvement of ganglioside GM3 in G(2)/M cell cycle arrest of human monocytic cells induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 4846–4852.
213. **14. Mao, X.; DiRienzo, J.M.** Functional studies of the recombinant subunits of a cytolethal distending holotoxin. *Cell. Microbiol.* **2002**, *4*, 245–255.
214. **15. Akifusa, S.; Heywood, W.; Nair, S.P.; Stenbeck, G.; Henderson, B.** Mechanism of internalization of the cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiology* **2005**, *151*, 1395–1402.
215. **16. Frisan, T. Karolinska Institute, Sweden.** Unpublished work, **2011**.
216. **Guerra, L.; Nemeč, K.N.; Massey, S.; Tatulian, S.A.; Thelestam, M.; Frisan, T.; Teter, K.** A novel mode of translocation for cytolethal distending toxin. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1793*, 489–495.
217. **Nishikubo, S.; Ohara, M.; Ueno, Y.; Ikura, M.; Kurihara, H.; Komatsuzawa, H.; Oswald, E.; Sugai, M.** An N-terminal segment of the active component of the bacterial genotoxin cytolethal distending toxin B (CDTB) directs CDTB into the nucleus. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 50671–50681.
218. **McSweeney, L.A.; Dreyfus, L.A.** Nuclear localization of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtB subunit. *Cell. Microbiol.* **2004**, *6*, 447–458.
219. **DiRienzo, J. M.** Uptake and processing of the cytolethal distending toxin by mammalian cells. *Toxins*(**2014**). *6*, 3098–3116. doi: 10.3390/toxins6113098.
220. **Joseph M. DiRienzo** Cytolethal Distending Toxin: A Unique Variation on the AB Toxin Paradigm Volume **2014**, Article ID 249056, 26 pages. 2014
221. **AL-zuwainy, J. Abid\*** Using of *astA* and *uidA* Genes Characterization in Detection of *Escherichia coli* Prevalence from Human Gallstone International Journal of Science and Research (IJSR) ISSN (Online): **August 2014** 2319-7064 Volume 3 Issue 8,
222. **Dubois D, Delmas J, Cady A, Robin F, Sivignon A, et al.** Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* (**2010**). *48*: 2122-212. 30.
223. **Tóth I, Héroult F, Beutin L, Oswald E** Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (Type IV). *J Clin Microbiol* (**2003**). *41*: 4285-4291.
224. **Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E.** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **2000**;66:4555-4558
225. **Johnson, W. M., and H. Lior.** Response of chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* possible misinterpretation as a heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **1987**. *43*:19–23
226. **Okuda, J., H. Kurazono, and Y. Takeda.** Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (*cdtA*) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of the *cdt* gene from *Shigella dysenteriae*. *Microb. Pathog.* **1995**. *18*:167–172.
227. **Sugai M.,T.Kawamoto,S.Y.Peres,Y.Ueno,H.Komatsuzawa,T.Fujiwara,H. Kurihara, H. Suginaka, and E. Oswald.** The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* **1998**. *66*:5008–5019.

228. **Johnson JR, Stell AL** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* (2000). 181: 261-272.
229. **Curova K, Kmetova M, Vargova R, Lovayova V, Siegfried L.** Toxins of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolated from Blood Culture. *Clin Microbiol* (2014). 3:171. doi: 10.4172/2327-5073.1000171
230. **Lopez-Banda, D. A., Carrillo-Casas, E. M., Leyva-Leyva, M., Orozco-Hoyuela, G., Manjarrez-Hernandez, AH., Arroyo-Escalante, S., Moncada-Barron, D., Villanueva-Recillas, S., Xicohtencatl-Cortes, J. & other authors** Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *Biomed Res Int* 2014, 959206.
231. **Pickett, C. L., D. L. Cottle, E. C. Pesci, and G. Bikah.** Cloning, sequencing and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin production genes. *Infect. Immun.* 62:1046–1051., Scott, D. A., and J. Kaper. 1994. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* 1994. 62:244– 251.
232. **Toth I, Nougayrede JP, Dobrindt U, Ledger TN, Boury M, et al.** Cytolethal distending toxin type I and type IV genes are framed with lambdoid prophage genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* (2009). 77: 492-500
233. **Kadhun H. J., Ball H. J., Oswald E., Rowe M. T.** Characteristics of cytotoxic necrotizing factor and cytolethal distending toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from meat samples in Northern Ireland. *Food Microbiol.* (2006). 23, 491–497 10.1016/j.fm.2005.07.003
234. **Toth, I., J. P. Nougayrede, U. Dobrindt, T. N. Ledger, M. Boury, S. Morabito, T. Fujiwara, M. Sugai, J. Hacker, and E. Oswald.** Cytolethal distending toxin type I and type IV genes are framed with lambdoid prophage genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2009. 77:492–500.
235. **Bouzari, S., and A. Varghese.** Cytolethal distending toxin (CLDT) production by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *FEMS Microbiol. Lett.* 1990. 59:193–198.
236. **Guth, B. E., R. Giraldi, T. A. Gomes, and L. R. Marques.** Survey of cytotoxin production among *Escherichia coli* strains characterized as enter- opathogenic (EPEC) by serotyping and presence of EPEC adherence factor (EAF) sequences. *Can. J. Microbiol.* 1994. 40:341–344. [SEP]
237. **Johnson, J. R., E. Oswald, T. T. OBryan, M. A. Kuskowski, and L. Span- jaard.** Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in The Netherlands. *J. Infect. Dis.* 2002. 185:774–784. [SEP]
238. **Johnson, J. R., and A. L. Stell.** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.* 2000. 181:261–272. [SEP]
239. **Clark, C. G., S. T. Johnson, R. H. Easy, J. L. Campbell, and F. G. Rodgers.** PCR for detection of *cdt*-III and the relative frequencies of cytolethal distending toxin variant-producing *Escherichia coli* isolates from humans and cattle. *J. Clin. Microbiol.* 2002. 40:2671–2674.
240. **Landraud L, Gauthier M, Fosse T, Boquet P.** Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. *Lett Appl Microbiol* 2000; 30:213-6.

241. **Rahman H, Deka M.** Detection and characterization of necrotoxin producing *Escherichia coli* (NTEC) from calves with diarrhoea. *JVPH.*, **2012**; 10(2): 97-102. 
242. **Koga VL, Tomazetto G, Cyويا PS, Neves MS, Vidotto MC, Nakazato G, et al.** Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. *BioMed Res Int.* **2014**; 2014: 465054.
243. **Kadhun, H.J.; Finlay, D.; Rowe, M.T.; Wilson, I.G. & Ball, H.J.** - Occurrence and characteristics of cytotoxic necrotizing factors, cytolethal distending toxins and other virulence factors in *Escherichia coli* from human blood and faecal samples. *Epidem. Infect.*, **2008**. 136: 752-760,
244. **Lopez-Banda DA, Carrillo-Casas EM, Leyva-Leyva M, Orozco-Hoyuela G, Manjarrez-Hernandez AH, Arroyo-Escalante S, et al.** Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *Biomed Res Int.* 2014;**2014**:959206.
245. **Mehdipour S.& Doosti A.& Ghasemi Dehkordi P.** Detection of cytolethal distending toxin (cdt) and cytotoxic necrotizing factor (cnf) genes among *Escherichia coli* isolates from Iranian sheep carcasses. *Comp Clin Pathol* **2012**, 21:1683–1688.
246. **Kadhun H.J, Ball H.J, Oswald E., Rowe. M.T.** Characteristics of cytotoxic necrotizing factor and cytolethal distending toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from meat samples in Northern Ireland. *Food Microbiology* 23, **2006**, 491–497.
247. **Santo E, Rodolpho D, Marin JM** Presence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in butcherries in Taquaritinga, SP, Brazil. *Braz J Microbiol* (**2007**). 38:591–593
248. **Giray B, Uçar FB, Aydemir SS.** Genotypic analysis of *Escherichia coli* strains that cause urosepsis in the Aegean region. *Turk J Med Sci.* **2016**;46:1-10.
249. **Oloomi M, Bouzari S.** Molecular profile and genetic diversity of cytolethal distending toxin (CDT)-producing *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients. *APMIS.* **2008**;116:125–32.
250. **Mora A, Lopez C, Dabhi G, Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Herrera A, Mamani R, Bonacorsi S, Molulin-Schouleur M et al.** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/ NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. *BMC Microbiol* **2009**; 9: 1-11.



## ÖZGEÇMİŞ

Hatay'ın Antakya ilçesinde 11.09.1988 tarihinde doğdu. İlköğrenimini İstanbul Nişantaşı Nilüfer Hatun İlkokulunda, ortaöğrenimini ise İstanbul Sadabad Kolejinde ve lise öğrenimini Hatay Hüseyin Özbuğday Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimine Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi'nde başlayıp, 2010 yılında mezun oldu. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine, ardından, 2013 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başladı.