

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÜROLİTİYAZISLI HASTALARDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİ SUŞLARININ
BİYOFİLM OLUŞTURMA YETENEĞİNİN FENOTİPİK VE MOLEKÜLER
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Mohammed Munadi Mohammed MOHAMMED

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2023**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mohammed Munadi Mohammed MOHAMMED tarafından hazırlanan “**Ürolitiyazisli Hastalardan İzole Edilen Bakteri Suşlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Fenotipik ve Moleküler Olarak Değerlendirilmesi**” adlı tez çalışması 16/04/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Serhat SİREKBASAN

Eş Danışman : Doç. Dr. Asal Aziz TAWFEEQ

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. İsim SOYİSİM
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. İsim SOYİSİM
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Yıldız Teknik Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İsim SOYİSİM
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “**Ürolitiyazisli Hastalardan İzole Edilen Bakteri Suşlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Fenotipik ve Moleküler Olarak Değerlendirilmesi**” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (16/04/2023).

Mohammed Munadi Mohammed MOHAMMED

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÜROLİTİYAZİSLİ HASTALARDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİ SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA YETENEĞİNİN FENOTİPİK VE MOLEKÜLER OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Mohammed Munadi Mohammed MOHAMMED

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Serhat SİREKBASAN
Eş Danışman: Doç. Dr. Asal Aziz TAWFEEQ

Bu çalışma, ürolitiazisli hastalarda gelişen üriner sistem enfeksiyonlarının yaygın etkenlerini saptamak ve bu kökenlerin biyofilm oluşturma yeteneğinin fenotipik ve moleküler olarak değerlendirilmesi amaçlamaktadır. Kesitsel olarak planlanan ve Nisan-Ağustos 2022 tarihleri arasında yürütülen prospektif çalışmamıza Kerkük Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne idrar yolu enfeksiyonu semptomları ile başvuran ve böbrek taşı tanısı alan toplam 100 hasta dahil edildi. Alınan idrar örneklerinden klinik olarak önemli bakterilerin tanımlanması için rutin konvansiyonel yöntemler kullanıldı. İzole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirildi. Gerekli olduğunda VITEK® 2 (bioMérieux, Fransa) ticari identifikasyon ve duyarlılık sistemleri kullanıldı. Saptanan kökenlerin biyofilm oluşumu mikropalak yöntemi ile incelendi ve biyofilm ile ilişkili bazı genlerin moleküler tespiti yapıldı. Hastalardan alınan idrar örneklerinin %60'ında anlamlı üreme oldu. En sık izole edilen etkenler sırasıyla *Escherichia coli* (n:36), *Proteus mirabilis* (n:17), *Staphylococcus aureus* (n:3), *Klebsiella pneumoniae* (n:2) ve *Pseudomonas aeruginosa* (n:2) olarak saptandı. *E. coli* ve *P. mirabilis* kökenlerinde en duyarlı antibiyotiğin imipenem olduğu belirlendi. İzole edilen *E. coli* kökenlerinin %89'unda biyofilm oluşumu gözlenirken, bu oran *P. mirabilis* kökenleri için %94 olarak saptandı. İzole ettiğimiz 36 *E. coli* izolatının 24'ünde *foc* geni, 20'sinde ise *sfa* geni tespit edilmiştir. *P. mirabilis*'e ait 17 izolatın 12'sinde *pfmA* geni saptanırken 10'unda *mrpA* geni bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, özellikle *E. coli* ve *P. mirabilis* kökenlerinde yüksek biyofilm oluşumu ve bu biyofilm oluşumuna ilişkin genlerin sıklıkla bulunması açısından önemlidir. Çalışmamızın, ürolitiazisli hastalarda gelişen üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisi ve önlenmesinde kullanılabilecek etkili stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabileceği kanaatindeyiz.

2023, 63 sayfa

ANAHTAR KELİMELE: Ürolitiazis, Biyofilm, Böbrek taşı, Direnç genleri

ABSTRACT

Master of Science Thesis

PHENOTYPIC AND MOLECULAR EVALUATION OF BIOFILM-FORMING ABILITY OF BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS WITH UROLITHIASIS

Mohammed Munadi Mohammed MOHAMMED

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Serhat SİREKBASAN
Co-Advisor: Assoc. Prof. Dr. Asal Aziz TAWFEEQ

This study aims to identify the common causative agents of urinary tract infections (UTIs) in patients with urolithiasis and to evaluate the phenotypic and molecular biofilm-forming ability of these agents. A total of 100 patients diagnosed with kidney stones who presented with UTI symptoms were included in this prospective cross-sectional study conducted from April till August 2022 at the Kerkuk Education and Research Hospital. Routine conventional methods were used to identify clinically significant bacteria from urine samples. Antibiotic susceptibility tests were performed using the disk diffusion method for the isolated bacteria. VITEK® 2 (bioMérieux, France) commercial identification and susceptibility systems were used when necessary. Biofilm formation of the detected agents was examined by the microplate method, and the molecular detection of some genes associated with biofilm was performed. Significant growth was observed in 60% of the urine samples obtained from the patients. The most frequently isolated agents were *Escherichia coli* (n: 36), *Proteus mirabilis* (n: 17), *Staphylococcus aureus* (n: 3), *Klebsiella pneumoniae* (n: 2), and *Pseudomonas aeruginosa* (n: 2), respectively. Imipenem was found to be the most sensitive antibiotic for *E. coli* and *P. mirabilis* strains. Biofilm formation was observed in 89% of the isolated *E. coli* strains and 94% of the *P. mirabilis* strains. The *foc* gene was detected in 24 of the 36 *E. coli* isolates, while the *sfa* gene was detected in 20 of them. Of the 17 *P. mirabilis* isolates, 12 had the *pfmA* gene, and 10 had the *mrpA* gene. The results obtained are particularly important in terms of the high biofilm formation and the frequent occurrence of genes associated with this biofilm formation in *E. coli* and *P. mirabilis* strains. We believe that our study may contribute to the development of effective strategies that can be used in the treatment and prevention of urinary tract infections in patients with urolithiasis.

2023, 63 pages

Keywords: Urolithiasis, Biofilm, Kidney stone, Resistance genes

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez yolculuğuna başladığım günden itibaren değerli vaktini ve desteğini sunan; rehberliği, anlayışı ve sabrıyla yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Serhat SİREKBASAN'a ve eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım eş danışmanım Doç. Dr. Asal Aziz TAWFEEQ'a, sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Mohammed Munadi Mohammed MOHAMMED

Çankırı, Mayıs 2023



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Çalışmanın Amacı.....	3
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Böbrek.....	4
2.2 Böbrek Taşları (Ürolitiazis)	4
2.2.1 Ürolitiazis epidemiyolojisi.....	6
2.2.2 Ürolitiazis için risk faktörleri	6
2.2.3 Böbrek taşı türleri.....	7
2.2.4 Böbrek taşı oluşum mekanizmaları	9
2.3 Ürolitiaziste Bakterilerin Rolü.....	10
2.4 Üriner Sistem Enfeksiyonlarının Ürolitiazisi İndüklemedeki Rolü	14
2.5 Biyofilm.....	15
2.5.1 Biyofilm oluşumu ve gelişimi üzerinde etkili olan faktörler	16
2.5.2 Biyofilm oluşum süreci	17
2.5.3 Bakteriyel biyofilmin etkisi.....	18
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1 Materyaller	20
3.1.1 Araç-gereç ve cihazlar	20
3.1.2 Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	20
3.1.3 Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik reaktifler	21
3.1.4 Çalışmada kullanılan primerler	21
3.2 Metodlar.....	22

3.2.1 Çalışma tasarımı ve hastalar	22
3.2.2 Örneklerin toplanması	23
3.2.3 Bakterilerin identifikasyonu	23
3.2.4 Biyofilm oluşumunu saptama	26
3.3 Moleküler Yöntemler.....	27
3.3.1 <i>Escherichia coli</i> ve <i>Proteus mirabilis</i> 'te 16s rRNA, <i>sfa</i> , <i>foc</i> , <i>pmfA</i> ve <i>mrpA</i> genlerinin tespiti.....	27
3.4 İstatistiksel analiz.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1 Demografik özellikler	32
4.2 Bakteri kültürü sonuçları.....	32
4.3 İzole edilen <i>E. coli</i> kökenlerinin antibiyotik direnç oranları	34
4.4 İzole edilen <i>P. mirabilis</i> kökenlerinin antibiyotik direnç oranları.....	34
4.5 <i>E. coli</i> ve <i>P. mirabilis</i> kökenlerinin biyofilm oluşturma durumu	35
4.6 Virülans genlerinin (<i>foc</i> , <i>sfa</i> , <i>pmfA</i> ve <i>mrpA</i>) varlığı	37
4.7 <i>E. coli</i> kökenlerinin biyofilm oluşturma kapasiteleri ile <i>sfa</i> ve <i>foc</i> genlerinin birlikteliği.....	38
4.8 <i>P. mirabilis</i> izolatlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri ile <i>pmfA</i> ve <i>mrpA</i> genlerinin birlikteliği	39
5. TARTIŞMA.....	40
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER DİZİNİ

-	Eksi
%	Yüzde
+	Artı
=	Eşittir
±	Artı eksi
°C	Santigrad derece
µL	Mikrolitre
g	Gram
mL	Mililitre
pmol	Pikomol



KISALTMALAR DİZİNİ

CaOx	Kalsiyum okzalat
CaP	Kalsiyum fosfat
CNPs	Kalsifikasyondan sorumlu nano partikül
COD	Kalsiyum okzalat dihidrat
COM	Kalsiyum okzalat monohidrat
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EPS	Ekstraselüler polimerik madde
HK-2	Hekzokinaz 2
İYE	İdrar yolu infeksiyonu
KBH	Kronik böbrek hastalığı
NB	Nano-bakteri
OD	Optik dansite
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
UPEC	Üropatojenik <i>Escherichia coli</i>
VKİ	Vücut kitle indeksi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Üreaz üreten bakterilerin taş oluşumundaki rolü (Wang <i>et al.</i> 2021).....	11
Şekil 2.2 Nanobakterilerin böbrek taşı oluşumundaki rolü (Wang <i>et al.</i> 2021)	12
Şekil 2.3 Oksalatı parçalayan bakterilerin taş yapımında oynadığı rol (Wang <i>et al.</i> 2021)	14
Şekil 2.4 Biyofilm oluşum aşamaları (BioRender.com)	18
Şekil 4.1 İzole edilen bakterilerin dağılımı	33
Şekil 4.2 İzole edilen bakterilerin kültürde üremeleri.....	33
Şekil 4.3 <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotik direnç oranları	34
Şekil 4.4 <i>P. mirabilis</i> izolatlarının antibiyotik direnç oranları.....	35
Şekil 4.5 <i>E. coli</i> kökenlerinin mikropilaka yöntemi ile biyofilm tespiti	36
Şekil 4.6 <i>P. mirabilis</i> kökenlerinin mikropilaka yöntemi ile biyofilm tespiti	36
Şekil 4.7 <i>E. coli</i> virülans genlerinin jel elektroforez sonucu	40
Şekil 4.8 <i>P. mirabilis</i> virülans genlerinin jel elektroforez sonucu.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bakteriyel biyofilmlerin ve hücre adezyonunun gelişiminde rol oynayan unsurlar (Donlan 2002).....	17
Çizelge 3.1 Araç-gereç ve cihazlar	20
Çizelge 3.2 Kullanılan besiyerleri.....	21
Çizelge 3.3 Kimyasal ve biyolojik reaktifler	21
Çizelge 3.4 Primer setleri	22
Çizelge 3.5 Bakterilerin biyofilm oluşturma aktivitelerinin değerlendirilmesi	27
Çizelge 3.6 Cut off değerine göre biyofilm yoğunluğu	27
Çizelge 3.7 Termal siklus protokolü	30
Çizelge 3.8 Termal siklus programı	30
Çizelge 4.1 Hastaların yaş ve cinsiyet özellikleri	32
Çizelge 4.2 <i>E. coli</i> ve <i>P. mirabilis</i> izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneği.....	36
Çizelge 4.3 <i>E. coli</i> ve <i>P. mirabilis</i> izolatlarında saptanan virülans genleri	37
Çizelge 4.4 <i>E. coli</i> izolatlarında <i>sfa</i> ve <i>foc</i> genlerinin biyofilm oluşturma kapasitelerine göre dağılımı	38
Çizelge 4.5 <i>P. mirabilis</i> izolatlarında <i>pmfA</i> ve <i>mrpA</i> genlerinin biyofilm oluşturma kapasitelerine göre dağılımı.....	39

1. GİRİŞ

Tıpta ürolitiazis olarak da bilinen böbrek taşı hastalığının tarihçesi adeta medeniyet tarihi ile başlar ve ona paralel olarak ilerler. Toplumda yaşayan her 15 kişiden birinin yaşamının belirli bir aşamasında böbrek taşı ile karşılaşabileceği tahmin edilmektedir. Bununla birlikte ürolitiazis sıklığının ve oluşumunun küresel olarak arttığına inanılmaktadır (Morgan and Pearle 2016).

Hastalığın etiyojisine uygun tedavinin yokluğunda bu taşlar üreterin tıkanmasına, idrarda kana, tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonlarına, kusmaya ve ayrıca idrar yaparken ağrıya neden olabilir. Bu durum da böbreklerin görevlerini yerine getirme yeteneğinde geri dönüşü olmayan fonksiyon bozulmalarına neden olabilir (Ziemba and Matlaga 2017). Buna ek olarak toplumdaki beslenme alışkanlıkları ve değişen yaşam tarzı ile birlikte küresel ısınmanın bir sonucu olarak iklim değişikliği etkilerinin de böbrek taşı prevalansında bir artışa sebep olması beklenebilir (Brikowski *et al.* 2008).

Ürolitiazis, yüksek insidansı nedeniyle toplum üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle sıcak ve kuru iklime sahip bölgelerde yaşayan toplumlarda daha sık görülmektedir (Wang *et al.* 2019). Taş oluşumunun kesin patogenezi tam olarak anlaşılamamakla birlikte hem metabolik hem de çevresel faktörlerin rol oynadığı bilinmektedir. İdrar bileşiminde yer alan kalsiyumun, ürik asitin, okzalatın yükselmesi ve sitrat düzeyinin düşmesi böbrek taşı oluşumunu etkileyen başlıca faktörler olarak saptanmıştır. İçermiş oldukları mineral bileşimlerine göre kalsiyum oksalat, kalsiyum fosfat, ürik asit, struvit ve sistinden oluşan farklı taşlar vardır. Çoğunluğu kalsiyum oksalat (CaOx) ile kalsiyum fosfattan (CaP) oluşur (Aggarwal *et al.* 2013).

Ye ve arkadaşlarının 2020 yılında Çin’de yapmış oldukları bir çalışmaya göre kalsiyum oksalat ve ürat taşlarının erkeklerde daha fazla görüldüğü, karbapatit (esas olarak kalsiyum fosfattan oluşan) ve struvit taşlarının kadınlarda daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Ye *et al.* 2020). Öte yandan böbrek taşı oluşumuna yol açan

patofizyolojik süreçlerde cinsiyetin oynadığı rol henüz tam olarak bilinmemektedir. Esas olarak böbrek taşlarının oluşumu, taşın türünden bağımsız olarak karmaşık ve çok aşamalı bir mekanizmadır (Hamamoto *et al.* 2011). Diyabet, obezite, kardiyovasküler bozukluklar, yüksek tansiyon ve metabolik sendrom gibi sistemik hastalıklar böbrek taşı üretimiyle bağlantılıdır (Devarajan 2018). Böbrek taşı üretimi sürecinde çeşitli değişkenlerin önemli roller oynadığı tespit edilmiştir. Bu duruma örnek olarak; hiperoksalüri, hiperürikozüri, hiperkalsiüri ve ayrıca fosfatüri taş oluşumu için bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır (Ha *et al.* 2010).

Üreaz üreten bakterilerin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonları vücutta oluşan struvit (magnezyum amonyum fosfat) taşlarının sorumlusudur. Üreoliz olarak da adlandırılan bu süreç hem idrarın pH'sını hem de amonyak miktarını yükseltir. Bunun sonucunda aşırı doygunluk elde edildiğinde struvit taşı oluşur. İdrar yolu enfeksiyonları söz konusu olduğunda akılda tutulması gereken diğer bir konu, biyofilm adı verilen ve böbrek taşı gibi cansız yüzeylerde tutunup üstesinden gelinmesinin zor olduğu mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk gerçeğidir. Biyofilmlerin neden olduğu enfeksiyonlar tedaviye son derece dirençli olmakla kalmaz, aynı zamanda yakın yüzeylerde kimyasal konsantrasyonlar yoluyla farklılıklar üreterek taş oluşum sürecini hızlandırabilir (Schultz *et al.* 2016).

Mikrobiyal bir yaşam formu olan biyofilm, yapıştıkları yüzeyde kendi ürettikleri ekzopolisakkarit matriks içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir. Biyofilmlerde bulunan mikroorganizmalar, hücre dışı polimerik maddeler adı verilen koruyucu bir tabaka içerisinde yer aldıklarından olumsuz çevresel koşullara karşı direnç gösterirler ve çeşitli bakteriyel enfeksiyonların patogenezinde çok önemli bir rol oynarlar. Biyofilmler; tutunma, bağlanma, büyüme, olgunlaşma ve ardından genişlemeyi içeren çok aşamalı birden fazla aşamayı içeren karmaşık bir süreçte oluşur ve gelişir. Bu aşamaların her biri farklı bir dizi öge tarafından kontrol edilir (Girmaye *et al.* 2018).

Biyofilmler hem abiyotik hem de biyotik yüzeylere yapışma ile ilgili hücre dışı polimerik maddelerle çevrili kompleks bir mikro-ekosistem kütesidir. Quorum sensing olarak

adlandırılan bir mekanizma aracılığıyla birbirleriyle etkileşime girebilirler. Bakteriyel biyofilmlerin varlığı, kronik ve tekrarlayıcı bakteriyel enfeksiyonların (ürolitiazis, diş plağı ve ayrıca kronik enflamatuvar enfeksiyonlar vb.) gelişmesi, gıda verimliliğinin azalması ve antibiyotik direnç gelişimi dahil olmak üzere bir dizi olumsuz sonuçlar doğurabilir (Girmaye *et al.* 2018).

Üriner sistem enfeksiyonlarına bağlı ürolitiazisli hastalarda hangi üriner faktörlerin taş oluşumunu teşvik ettiği konusunda genel bir bilgi eksikliği vardır. Ne yazık ki yapılan mevcut çalışmalar, bakteri biyofilm oluşumunun ve farklı koşullar altında taş oluşumunun gerçek zamanlı incelenmesi için uygun modellerin olmaması nedeniyle sınırlıdır. Bu çalışma, ürolitiazisli hastalardan izole edilen bakteri suşlarının biyofilm oluşturma yeteneğinin fenotipik ve moleküler olarak değerlendirilmesi amaçlamaktadır. Buna ek olarak, aşağıda yer alan amaçlar doğrultusunda bazı bilgiler sunmaktadır.

1.1 Çalışmanın Amacı

- Ürolitiazisli hastalarda gelişen üriner sistem enfeksiyonlarına bağlı en yaygın üropatojenlerin izolasyonu ve tanımlanması,
- Saptanan kökenlerin antibiyotik direncinin belirlenmesi,
- İzole edilen kökenlerden biyofilm oluşumunun tespit edilmesi,
- Ürolitiazis hastalarında biyofilm ile ilişkili bazı genlerin moleküler tespiti ve biyofilm oluşumu ile ilişkilerinin belirlenmesi.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Böbrek

Renal sistem içerisinde yer alan böbrekler normal vücut fonksiyonlarının sürdürülmesinde hayati öneme sahiptirler. İki küçük fasulye şeklindeki iç organlarımız olan böbrekler, on ikinci torasik omur seviyesinden üçüncü lomber omurlara kadar uzanırlar. Sol böbrek orta hatta daha yakındır ve sağda yer alana göre daha uzun ve daha incedir (Cunningham *et al.* 2016).

Böbreklerimizin en önemli görevlerinden biri metabolik toksinleri ve atıkları idrar yoluyla vücuttan uzaklaştırmaktır. Buna ek olarak, kalbe dönmeden önce kanın süzülmesine de yardımcı olurlar. Renal hilum, böbreğin içbükey medial kenarında yer alan renal sinüs adı verilen bir yarıktır. Sinirler, üreterler, renal kan damarları ve lenfatik damarlar gibi böbreğe hizmet eden yapıların girip çıktığı yerdir. Böbrekler ayrıca, onları yerinde tutmaya yardımcı olan ve aynı zamanda darbelere karşı belirli bir düzeyde koruma sağlayan bir yağ tabakasıyla kaplıdırlar (Cunningham *et al.* 2016).

2.2 Böbrek Taşları (Ürolitiazis)

Ürolitiazis veya böbrek taşı oluşumu, idrardaki kalsiyum, oksalat ve ürik asit gibi maddelerin normal seviyelerinde bir artış olduğunda ortaya çıkar. Bu maddeler çok konsantre olduklarında, sonunda böbrek taşlarına dönüşebilen kristaller oluşturabilirler. Böbrek taşları, genetik ve çevresel etkileri içeren çok faktörlü bir sürecin sonucudur (Khan 2010).

Ürolitiazis olarak da bilinen nefrolitiazis, üriner sistem içinde oluşan taşlar için kullanılan tıbbi bir terimdir. Bu taşlar, idrarda bulunan bazı minerallerin aşırı doygun hale gelmesi ile oluşur. Bunun sonucunda böbreklerde kristal oluşumu; birikmesi, çoğalması ve kalıcılığı ile sonuçlanır (Finlayson 1978). Kalsiyum oksalat ve kalsiyum fosfat, dünya çapında görülen böbrek taşlarının yaklaşık %80'inin ana bileşenleridir. Üreaz enzimine

sahip bakterilerin neden olduğu enfeksiyon sonrası oluşan struvit %10, ürik asit yaklaşık %9 ve geri kalan taşların tümü %1'lik bir oran oluşturur (Evan 2010).

İdrarın bazı az       r ilaçlar veya bunların yan ürünleri ile aşırı doygun hale gelmesinin bir sonucu olarak böbrek toplama kanallarında da kristalleşme meydana gelebilir. Bazı ilaçlar da böbrek taşı oluşum riskini arttırabilir. Örneğin, indinavir ve ayrıca atazanavir gibi proteaz inhibitörleri verilen enfekte bireyler nefrolitiazis geliştirme tehdidi altındadır. Bunun nedeni, proteaz ilaçlarının böbrek taşlarına neden olmasıdır (Tattevin *et al.* 2013).

Sodyum, hayvansal protein ve şeker içeriği yüksek olan ve düşük sıvı içeriğine sahip bir diyet, böbrek taşı oluşumuna katkıda bulunabilir. Oksalat açısından yüksek bir yemek de böbrek taşı riskini arttırabilir (Bischoff and Rumberiha 2012). Gıda  r nlerinde, özellikle de bebek mamalarında melamin kontaminasyonuna bağlı böbrek taşı oluşumu rapor edilmiştir. Çin'de 2008 yılında 294.000'den fazla bebek tarandı ve süt ürünlerinde melaminle ilişkili idrar yolu taşları ve kum benzeri oluşumlar teşhis edildi. Erken bebeklik döneminde sık sık melaminle kontamine bebek maması alımı nedeniyle bebeklerden 50.000 tanesinin hastaneye kaldırıldığı ve bu durumun bir sonucu olarak en az altı bebeğin öldüğü ifade edilmektedir (Gabriels *et al.* 2015).

Taş gelişimi toplumda sık görülen bir durumdur ve beş yıl sonra hastaların yaklaşık %50'sinde n ks etmesi beklenmektedir. Son yarım asır boyunca, taş insidansında sürekli bir artış olmuştur. Beslenme ve yaşam tarzı alışkanlıklarındaki değişikliklerin yanı sıra iklim değişikliği, fazla kilo, diyabet, yüksek tansiyon ve metabolik bozukluklar nedeniyle gelecekte artışlar beklenmektedir (Fink *et al.* 2013). Öte yandan, nefrolitiazisli hastalarda kronik böbrek rahatsızlıkları ve son dönem böbrek hastalığı riski çok daha yüksektir (Shoag *et al.* 2014).

2.2.1 Ürolitiyazis epidemiyolojisi

Ürolitiyazis hem erkekleri hem de kadınları etkileyen yaygın bir hastalıktır. Böbrek taşlarının yaygınlığı, incelenen popülasyona bağlı olarak farklılık göstermekle birlikte, yaklaşık %10-15 oranında insanın yaşamlarının belirli bir döneminde böbrek taşı ile karşılaşma olasılığı tahmin edilmektedir. Bunun yanı sıra geçmişte idrar taşı olan bireylerin on yıllık bir süre zarfında yaklaşık yarısında tekrarlaması beklenmektedir (Portis and Sundaram 2001). Erkeklerde böbrek taşına yakalanma riski kadınlara göre iki ila üç kat daha fazladır. Ancak menopoza sonra idrardaki mineral madde dengesini etkileyen hormonal değişiklikler nedeniyle kadınlarda böbrek taşı gelişme riski artar. Her yaşta ortaya çıkabilen bir durum olmasına rağmen böbrek taşı geliştirme riski yaşla birlikte artar ve gençlere göre yaşlılarda daha sık görülür. Ayrıca sıcak ve kuru olan yerlerde, ılımlı olan bölgelere göre daha yüksek taş oluşumu insidansı vardır. Daha az sıvı tüketimi ve bunun sonucunda idrar konsantrasyonundaki artış, taş gelişimine katkıda bulunan en kritik unsurlardan biridir (Heilberg and Goldfarb 2013).

2.2.2 Ürolitiyazis için risk faktörleri

- **Aile öyküsü**

Ailede böbrek taşı öyküsünün olması, kişide böbrek taşı geliştirme riskini artırır (Staff 2022).

- **Dehidrasyon**

Böbrek taşı geliştirme riskinin artması bir bakıma günlük yetersiz su alımı ile ilişkilidir. Yeterince sıvı içmemek, böbrek taşı oluşum riskini artırabilen konsantre idrara yol açabilir. Ayrıca, sıcak iklimlerde yaşayan veya sık sık terleyen bazı insanlar diğerlerinden daha fazla tehlike altında olabilir (Staff 2022).

- **Diyet**

Sodyum, hayvansal protein ve şeker açısından yüksek bir diyet ürolitiazis geliştirme riskini artırabilir. Aşırı miktarda tuz tüketmek böbrekleri daha fazla miktarda kalsiyum işlemeye zorlamakla kalmaz, aynı zamanda böbrek taşı geliştirme olasılığını da önemli ölçüde artırır (Staff 2022).

- **Obezite**

Aşırı kilolu veya obez olmak ve yüksek Vücut Kitle İndeksi (VKİ) böbrek taşı riskini artırabilir (Staff 2022).

- **Gastrointestinal hastalıklar ve cerrahi müdahale**

Sindirim sürecindeki değişiklikler, enflamatuvar barsak hastalığı, gastrik bypass ameliyatı ve kronik ishalden kaynaklanabilir. Bu değişiklikler, kalsiyum ve su emilimini zorlaştırarak, idrardaki taşların oluşmasına neden olabilecek maddelerin sayısında artışa yol açabilmektedir (Staff 2022).

- **Tıbbi problemler**

Çeşitli üriner enfeksiyonlar, renal tübüler asidoz, sistinüri ve ayrıca tiroid disfonksiyonu gibi bazı tıbbi durumlar böbrek taşı riskini artırabilir (Staff 2022).

2.2.3 Böbrek taşı türleri

Dört ana böbrek taşı türü vardır ve isimlerini onları oluşturan birincil bileşenlerinden alır. Üriner taşların ana bileşenlerinin dağılımını araştıran epidemiyolojik çalışmalar göz önüne alındığında kalsiyum oksalat (CaOx) ve kalsiyum fosfat (CaP) kristalleri tek başlarına veya bir araya gelerek en sık görülen böbrek taşlarını oluştururlar (Daudon *et al.* 2004). Kalsiyum oksalat dihidrat (COD) kristalleri çoğunlukla heterojen taşların

yüzeyini doldurur ve yüzeyin kırıldığı izlenimini verir. Saf kalsiyum okzalat monohidrat (COM) taşlarının yüzeyleri ise pürüzsüzdür. CaOx taşlarının sentezi çok aşamalı bir süreçtir. Apatit, kalsiyum hidrojen fosfat dihidrat (bruşit) ve trikalsiyum fosfat, kalsiyum fosfatın (whitlockite) üç ana formudur. Tamamen CaP'den oluşan taşlar nadirdir (Khan *et al.* 2016). Böbrek taşlarında bulunan çok daha yaygın kristal türüne apatit denir ve diğer tüm kristal biçimleri arasındaki çatlaklarda, en yaygın olarak CaOx kristallerinde bulunabilen granüler bir madde şeklini alır. Bruşit, böbrek taşlarında oldukça yaygın olarak bulunabilen bir mineraldir. İnce bıçaklara benzeyen, radyal olarak hizalanmış kristallerin rozetleri olarak görünür. Hiperkalsiüri, hipositratri ve idrar pH'ında yükselme, CaP taşlarının gelişimi için en önemli üç risk faktörüdür (Siener *et al.* 2013).

Metabolik sendromun birincil unsurlarından olan obezite ve insüline dirençli kişilerde aşırı ürik asit taşı insidansı vardır. Ürik asit taşları, dünya çapında bulunan tüm böbrek taşlarının yaklaşık %10'unu oluştururlar. Diğer kalsiyum taşı formlarının aksine, ürik asit nefrolitiazisi genellikle birincil anomali olarak pH'sı 5,5'in altında olan anormal derecede asidik bir idrara atfedilir (Sakhaee *et al.* 2002). Ürik asidin idrar pH'sı düşük olduğunda çözünmemesi ve dehidrate olmasının yanı sıra, idrarda ürik asit çıkışının artmasına katkıda bulunan durumlar hiperürikozüri olarak adlandırılır. Bu fenomen, ürik asit taşlarının gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Fathallah-Shaykh and Cramer, 2014). Daha yüksek oranda pürin katabolizması ve ürik asidin böbrekler tarafından bağırsak emilimini engelleyen ilaçların verilmesi de katkıda bulunan diğer değişkenlerdir. Ürik asit taşlarının çoğu, görünüşte çakıl benzeridir ve zayıf bir şekilde toplanmış susuz ürik asit kristallerinden oluşan merkezi bir çekirdeğe sahiptir. Bu merkez, eşmerkezli laminasyonlar halinde yapılandırılmış sütunlu susuz ürik asit granülleri ile çevrilidir (Khan *et al.* 2017).

Bazı taşlar, susuz ürik asit, ürik asit dihidrat ve ayrıca organik maddelerle birleştirilmiş COM kristallerinden oluşan geçirgen ve kırılğan bir merkezi çevreleyen kalın bir dış katmana sahiptir ve bu tür taşlara ürolit adı verilir. Genellikle 'enfeksiyon taşları' olarak adlandırılan struvit taşları ise dünya çapında bulunan tüm taşların yaklaşık %8'ini oluştururlar. Bu taşlar genellikle *Proteus* spp. ve *Klebsiella* spp. gibi üreaz üreten bir mikroorganizmanın neden olduğu enfeksiyonun sonucu olarak artan amonyak üretimiyle

ilişkilidir. Magnezyum amonyum fosfat hekzahidrat kristalleri daha sonra müteakip alkali idrar üretiminin bir sonucu olarak gelişmeye başlayabilir (Espinosa-Ortiz *et al.* 2019). Staghorn taşları, struvit ve ilgili karbonat apatit kristallerinden hızla oluşabilen büyük taşlardır. Böbrek pelvisini ve böbrek kalikslerini dolduran boynuz benzeri çıkıntıları nedeniyle "geyik boynuzu taşları" olarak da adlandırılırlar. Geçmişte yüksek ölüm oranlarıyla ilişkili olduğu için struvit taşlarından korkulurdu. Ancak günümüzde, struvit taşları ve bunlarla ilişkili enfeksiyonlar artık invaziv cerrahi ve ilaçlarla tedavi edilebilir hale gelmiştir. Bu tür taşlar, özellikle kısmi taş temizliği olan bağışıklığı baskılanmış kişilerde tekrarlama eğilimleri nedeniyle daha fazla tanınmaktadır (Saravanan 2018).

Sistin taşları, böbrek kanallarında amino asit sistein için bir eksiklik olan otozomal resesif bir kalıtım paterni sonucu oluşur (Biyani and Cartledge 2006). Sistinin yeniden emilememesi, idrarla atılan sistin miktarının artmasına neden olur. Sistin hidrofobiktir ve zamanla kristaller üretir. Bu sistin kristalleri, mesane ve böbrek taşlarını oluşturma potansiyeline sahiptir (Al-Jalawee and Durdagi 2021).

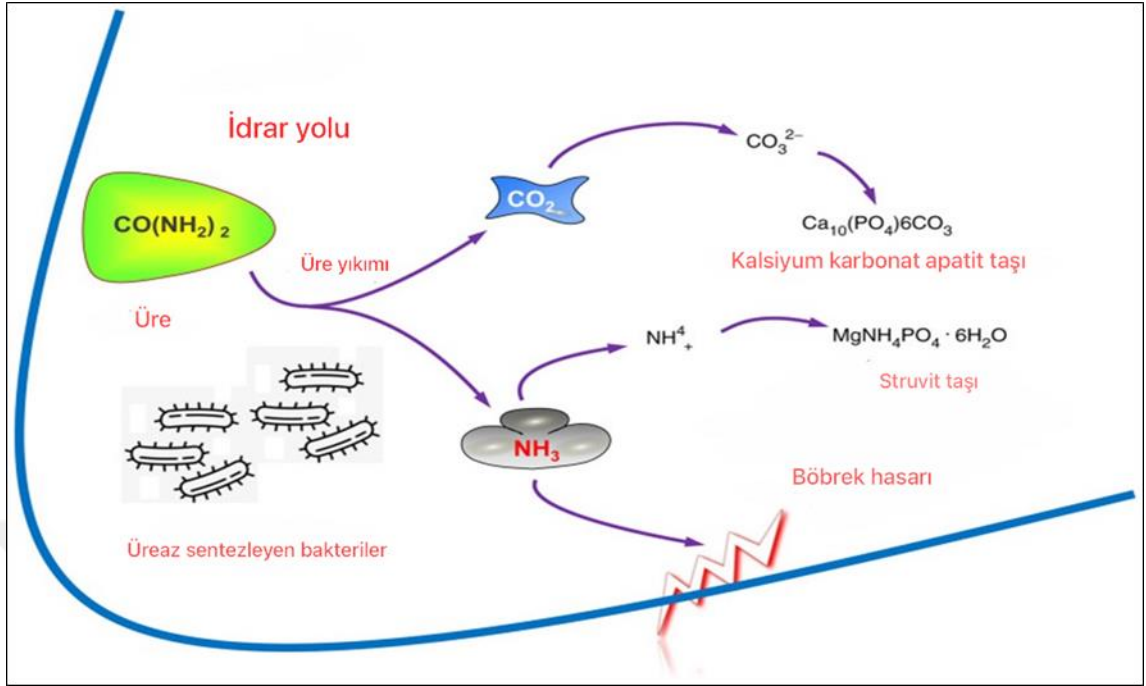
2.2.4 Böbrek taşı oluşum mekanizmaları

Böbrek taşlarının karmaşık biyokimyasal oluşum mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (Al-Jalawee and Durdagi 2021). Bu taşların üretimi, idrarın aşırı doymuş olmasını ve fizikokimyasal değişikliklere uğramasını içeren biyolojik bir süreçtir. "Aşırı doymuş çözelti" terimi, tipik koşullar altında çözebilen çözücünden daha yüksek çözünmüş madde konsantrasyonuna sahip bir çözeltiyi tanımlar (Basavaraj *et al.* 2007). Aşırı doygunluğun varlığı, idrarda çözünen maddelerin çökmesine neden olur. Bu da kristal oluşumların gelişmesiyle sonuçlanan yapılara neden olur. Diğer bir deyişle, çözeltide bulunan iyon miktarı doymuş hale geldiğinde kristalleşme gerçekleşir (Basavaraj *et al.* 2007). Bir sıvı katıya dönüştüğünde meydana gelen faz değişiminde, mevcut madde pH'sının yanı sıra belirli bir fazla bileşenin konsantrasyonunun da rolü vardır. İdrar miktarının azalmasına ek olarak, kalsiyum, fosfor, ürik asit, oksalat ve ayrıca sistin gibi taş oluşturan elementlerle yüksek derecede idrar doygunluğu kristalleşme için potansiyel bir risktir (Giannossi and Summa 2012). Bir bakıma kristalleşme mekanizması, aşırı doymuş bir sıvının termodinamiğine ve kinetiğine de bağlıdır (Alonzo *et al.* 2012).

Bununla birlikte, taş oluşumunun genellikle üriner sistemde kristalleşmeyi teşvik eden faktörler ile bu sürece karşı koyan faktörler arasındaki dengesizliğin derecesine göre belirlendiğini akılda tutmak önemlidir. Taş üretiminin mineral bileşeni söz konusu olduğunda, her tür taş aynı tür olayları yaşar. Ancak, bir taşın gelişimine yol açan koşulların sırası, taşın cinsine ve ayrıca idrarın kimyasal bileşimine bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir. Böbreklerdeki kristallerin çekirdeklenmesi, gelişmesi, birikmesi ve devamlılığı taş oluşturma sürecinin ilk adımlarıdır. Bunu en sonunda taşın üretimi takip eder (Chhiber *et al.* 2014).

2.3 Ürolitiyaziste Bakterilerin Rolü

Son araştırmalar, insan mikrobiyal popülasyonunun bir parçasını oluşturan idrar yolu ve böbreklerde tanımlanan mikroorganizmaların, ürogenital sistem üzerinde hem olumlu hem de olumsuz olarak önemli bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir (Whiteside *et al.* 2015). *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providentia stuartii*, *Serratia marcescens* ve *Morganella morganii* gibi üreaz üreten bakteriler Şekil 2.1’de görüldüğü üzere strüvit taşı üretimi ile bağlantılıdır (Espinosa-Ortiz *et al.* 2019, Wang *et al.* 2021).



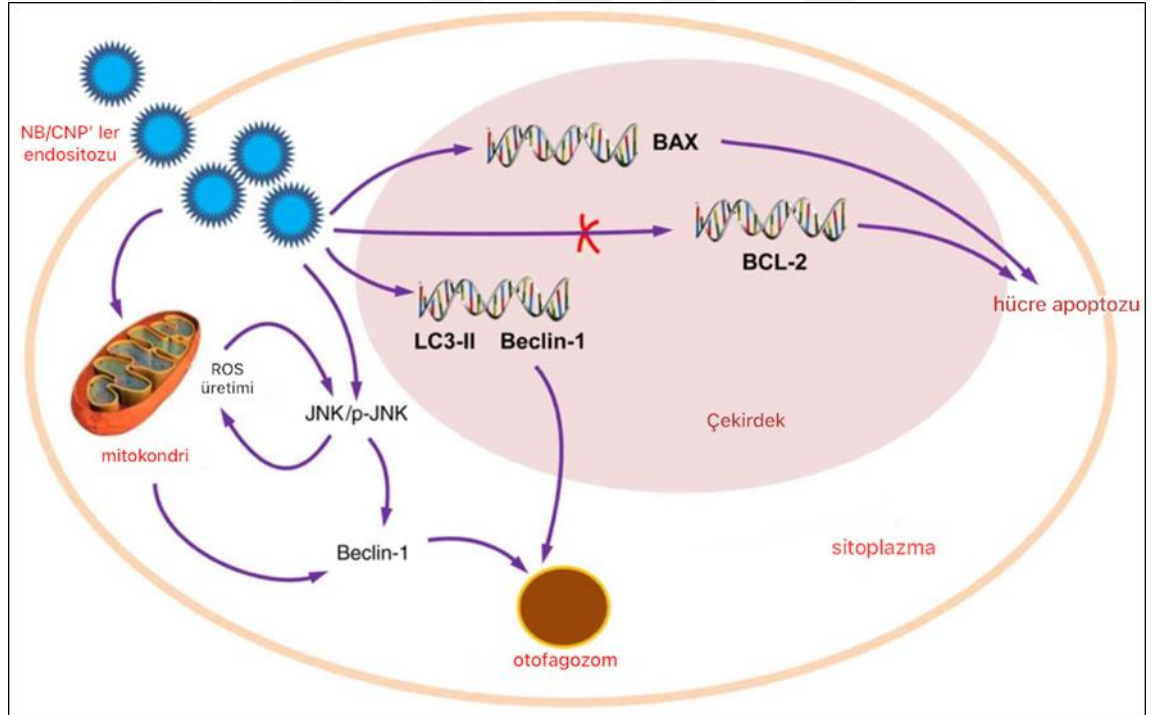
Şekil 2.1 Üreaz üreten bakterilerin taş oluşumundaki rolü (Wang *et al.* 2021)

Üreaz üreten patojenlerin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonu (İYE) olan hasta popülasyonlarında struvit taşlarının önlenmesi veya parçalanması için çeşitli üreaz inhibitörleri önerilmiş ve kullanılmıştır. Bu üreaz inhibitörlerinin uzun süre kullanılması, tedavilerin etkisizliğine sebep olması ve toksik etkileri nedeniyle ile sınırlıdır (Marien and Miller 2015). İYE'nin ana nedeni olmasına rağmen, *Escherichia coli* türlerinin yalnızca %1,4'ünün üreaz ürettiği ve bu nedenle struvit taşı oluşumunun ana nedeni olarak kabul edilmediği bildirilmektedir. Öte yandan, böbrek taşlarının gelişip daha sonra enfekte olup olmadığı veya taş oluşumunu çoğaltan bir enfeksiyon etkeninin sonucu olup olmadığı tartışmalı bir konudur (Flannigan *et al.* 2014).

Nanobakteriler (NB), sadece dünyadaki en küçük canlı mikroorganizmalar olarak karşımıza çıkmakla kalmayıp böbrek taşı oluşumunda da önemli rol oynarlar (Wu *et al.* 2019). Ansari ve meslektaşları, NB'lerin çapının 60 ila 160 nm arasında değişebileceğini ve apatitten oluşan böbrek taşı olan bireyleri enfekte edebildiğini keşfettiler (Ansari *et al.* 2017). Çiftçioglu ve arkadaşlarının yürüttüğü başka bir araştırmanın bulgularına göre ise böbrek taşlarının % 97,2'sinde NB olduğu tespit edilmiştir (Çiftçioglu *et al.* 1999).

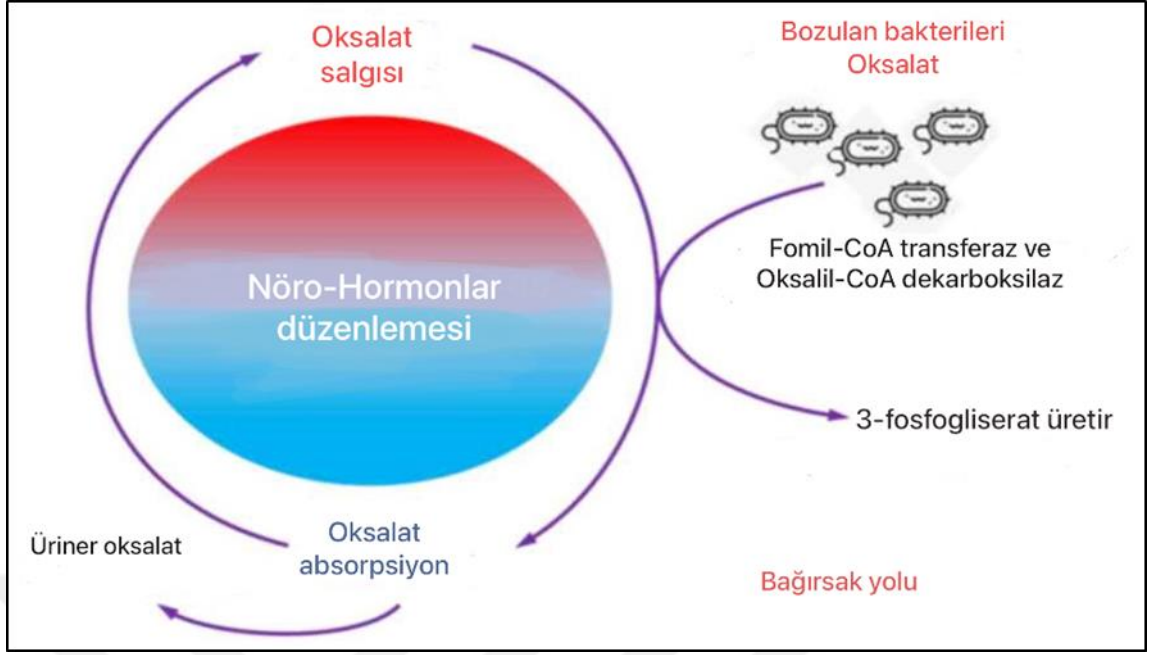
Taşın türü ile NB'nin varlığı arasında bir ilişkinin olmadığı, ancak apatite dayalı taşların en yüksek immünopozitifliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Kajander *et al.* 2003). Nanobakterilerin, idrarın aşırı doygunluk durumuna bağlı bir oranda böbrek taşlarını oluşturduğu varsayılmaktadır NB'lerin, böbrek taşı oluşumunun başlaması için hücre duvarlarında karbonat apatit üretmeleri nedeniyle biyomineralizasyon merkezleri olarak rol oynadıkları düşünülmektedir (Shiekh *et al.* 2006). NB'lerin; tübüler epitel hasarı, biyomineralizasyon ve taş oluşumu ile sonuçlanan kronik enfeksiyonu içeren böbrek patolojilerini tetikleyebildikleri bildirilmektedir (Martel *et al.* 2014).

NB'nin böbrek taşlarının oluşumundaki rolü hala tam olarak anlaşılmamıştır ve konu hala araştırmaların devam ettiği bir alandır. Bazı araştırmalar nanobakterilerin gerçek varlığına dair kanıtlar bulmuş olsa da diğer bazı çalışmalar bu küçük organizmaların sadece mineral parçacıkları olduğunu öne sürmektedir. Nanobakterilerin taş oluşumundaki rolü Şekil 2.2'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2 Nanobakterilerin böbrek taşı oluşumundaki rolü (Wang *et al.* 2021)

Son zamanlarda yaygın bir çalışma konusu olan bağırsak mikrobiyomunun hem böbrek taşı hastalığının gelişmesinde hem de önlenmesinde rol oynadığı bildirilmektedir (Sadaf *et al.* 2017). *Oxalobacter formigenes*, bu alanda en kapsamlı şekilde incelenen Gram-negatif anaerobik bakteridir. Bu bakteri sindirim sisteminde oksalatı parçalar ve böylelikle böbrek taşı üretimini azaltmaya yardımcı olabilecek potansiyel probiyotik niteliklere sahiptir. Bazı araştırmalar, taş oluşumunda rol oynayan bakteri türlerinin bağırsaklarda daha yüksek seviyelerde bulunduğunu göstermiştir. Stern ve arkadaşları vücutlarında böbrek taşı üretimi olmayan kişilerin aksine, nefrolitiazis hastası bireylerin bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikleri inceledi. Çalışmalarının bulgularına göre kontrol grubuna kıyasla *Bacteroides* cinsi, böbrek taşı olan hasta grubunda 3,4 kat daha yaygın bulunurken; *Prevotella* cinsi 2,8 kat daha fazla görüldü. Bağırsak mikrobiyomunun böbreklerdeki metabolit düzeylerini etkileyebileceği ve böylelikle böbrek taşı patolojisini modüle edebileceği düşünülmektedir (Ticinesi *et al.* 2018). Bazı araştırmalar, böbrek taşı oluşumunun bağırsak mikrobiyomundaki dengesizliklerden kaynaklanabileceğini öne sürmektedir. Özellikle, bağırsak mikrobiyomundaki düşük çeşitlilik, yüksek oranda inflamasyon ve artan oksidatif stres ile böbrek taşı gelişimi arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, sağlıklı bir bağırsak mikrobiyomunun korunması ve sürdürülmesi, böbrek taşı gelişimini önlemeye yardımcı olabilir (Falony 2018, Peck *et al.* 2016). Şekil 2.3’de gösterildiği gibi oksalatı parçalayan bakterilerin aracılık ettiği, bağırsaklarda meydana gelen ekstra renal oksalat klerensi vardır. Bu aktivite ayrıca idrar ve plazmadaki homeostatik oksalat konsantrasyonları üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Cornelius and Peck 2004).



Şekil 2.3 Oksalatı parçalayan bakterilerin taş yapımında oynadığı rol (Wang *et al.* 2021)

2.4 Üriner Sistem Enfeksiyonlarının Ürolitiyazisi İndüklemesindeki Rolü

Hafif sistitten hayatı tehdit eden piyelonefrite ve nefrolitiyazise kadar değişebilen idrar yolu enfeksiyonları, insanlarda görülen üçüncü en yaygın enfeksiyon şeklidir ve tüm dünyada her yıl yaklaşık 150 milyon kişiyi etkilemektedir (Wang *et al.* 2021). Tahminlere göre bu enfeksiyonların toplumsal maliyeti yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 3,5 milyar ABD doları civarındadır (Flores-Mireles *et al.* 2015).

Birçok araştırma, üriner sistem enfeksiyonlarının ürolitiyazis gelişimindeki rolü hakkında bilgi sağlamaktadır. Örneğin bir çalışmada, üriner sistem enfeksiyonu öyküsü olan hastalarda ürolitiyazis sıklığının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bazı çalışmalar, enfeksiyonların neden olduğu inflamasyonun ürolitiyazis gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Bauza *et al.* 2018, Karki and Leslie 2023, Wong *et al.* 2015, Lee *et al.* 2017). *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi bazı bakteri türleri, ürolitiyazis gelişimine neden olan struvit taşlarının oluşumunda rol oynarlar. Bu bakteriler, üreaz enzimi salgırlar ve üreyi amonyak ve karbondioksit dönüştürürler. Amonyak, idrar pH'sını artırarak struvit kristallerinin oluşumunu

kolaylaştırır. Bu kristaller de, zamanla büyüyerek struvit taşlarını oluştururlar (Daudon *et al.* 2022). Miano ve arkadaşları üriner taşlar ve İYE arasındaki ilişkiyi iki farklı klinik tablo ile açıklamaktadırlar. Birinci durumda üriner sistem enfeksiyonları sonrasında gelişen taşlar, enfeksiyon taşları olarak adlandırılır ve taş patogeneğinde önemli bir rol oynarlar. İkinci durumda ise, mevcut taş yapısının üriner sistem enfeksiyonları ile komplike olması söz konusudur ve enfeksiyonlu taşlar olarak adlandırılırlar (Miano *et al.* 2007).

2.5 Biyofilm

Biyofilm, yüzeylerde bulunan mikroorganizmaların salgıladığı polisakkarit matrisiyle çevrili bir topluluktur. Bu matris, mikroorganizmaların bir arada tutunmalarını ve yüzeylere yapışmalarını sağlar (Rao *et al.* 2005). Biyofilm, mikroorganizmaların bir araya gelmesiyle oluşan kompleks bir yapı olduğundan, biyofilm oluşumunu etkileyen birçok genetik faktör bulunmaktadır. Bu genler; mikroorganizmaların biyofilm matrisi üretiminde, tutunmada, hareketlilikte, bir araya gelmelerinde ve biyofilm yaşam döngüsünün farklı aşamalarında rol oynarlar. Bakterilerin biyofilm oluşturmak için bir araya geldiği süreç, yalnızca genetik yolları değil aynı zamanda çok çeşitli diğer unsurları da (çevresel değişiklik, beslenme mevcudiyeti, gen düzenlemesi ve ayrıca yüzey bağlantısı) içeren karmaşık bir süreçtir. (Shi and Zhu 2009). Biyofilm oluşumu üzerindeki genetik kontrolün daha iyi anlaşılması, biyofilmlerin kontrol altına alınmasında ve olası enfeksiyonların önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Bakterij 2014). Biyofilm yapısında yer alan mikroorganizmalar, bağışıklık hücrelerinin doğrudan saldırısına karşı korunaklı hale gelebilirler. Bunun yanı sıra, biyofilm matrisinde birikmiş olan proteinler ve polisakkaritler antijenik özellikler göstererek hümmoral bağışıklık sistemi tarafından tanınabilirler (Cortés *et al.* 2011). Özellikle hümmoral ve hücreseel bağışıklık sistemi güçlü olanlarda, biyofilm enfeksiyonları çok nadiren de olsa konağın savunma mekanizmaları tarafından temizlenirler (Loo 2003). Biyofilm yapısı, mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmelerine neden olabilir. Bu direnç, antibiyotiklerin biyofilm matrisine etkili bir şekilde ulaşamamasından kaynaklanır. Biyofilm matrisi, antibiyotiklerin biyofilm içindeki hedef mikroorganizmalara ulaşmasını engelleyebilir ve bu nedenle antibiyotiklerin etkinliğini azaltabilir (Baldassarri *et al.* 2001).

İnsanlar ortaya çıkan biyofilm enfeksiyonlarının kabaca %60'ının zoonotik bir kaynağı vardır ve hem hayvanları hem de insanları etkileyen bulaşıcı hastalıkların yaklaşık yüzde 80'inden biyofilmler sorumludur (García and Percival 2011). Biyofilm enfeksiyonlarının tedavisi enfeksiyonun lokalizasyonuna, mikroorganizmanın türüne ve enfeksiyonun şiddetine bağlıdır. Tedavide, genellikle çoklu ilaç kullanımı ve cerrahi müdahale gerekebilir. Antibiyotiklere karşı dirençli biyofilm enfeksiyonlarının tedavisi oldukça zorlu olabilir ve bu nedenle araştırmacılar, biyofilm enfeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisi için yeni yaklaşımlar geliştirmek için çalışmaktadırlar (Hall-Stoodley and Stoodley 2009, Høiby *et al.* 2010).

2.5.1 Biyofilm oluşumu ve gelişimi üzerinde etkili olan faktörler

Bakteriyel biyofilm oluşumu ve hücre adezyonu, birçok farklı faktörün birleşimi ile karmaşık bir süreçtir. Bu faktörler, bakterilerin yüzeye bağlanması, bakteriyel hücrelerin çoğalması ve metabolizma gibi hayati işlevleri gerçekleştirmeleri için gerekli olan koşulları sağlar. Bakterilerin bir yüzeye bağlanması için, yüzey özellikleri ve bakteri hücre yüzeyleri arasındaki çeşitli etkileşimlerin önemi vardır (Puttamreddy *et al.* 2010). Bakteriyel hücrelerin biyofilm oluşturmaları için gerekli olan bir diğer faktör, hücre adezyonu ile ilgilidir. Bu, bakterilerin yüzeylere tutunma kabiliyetlerini etkileyen bir dizi moleküler süreci içerir. Hücre adezyonu, hücre yüzeyindeki reseptörlerin bir yüzeye bağlanması, sitoplazmik membranın reorganizasyonu ve hücre yüzeyinin yeniden düzenlenmesi yoluyla gerçekleşir (Rossi *et al.* 2016).

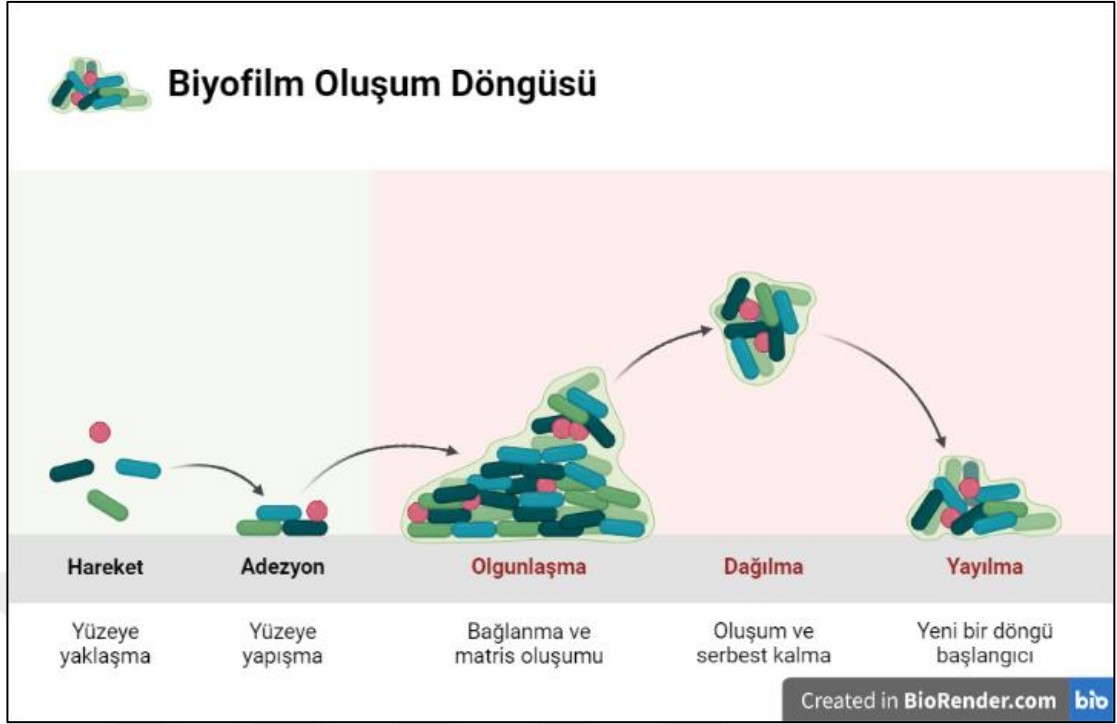
Biyofilmlerin üretimi, besin kaynağı, sıcaklık, pH ve asit konsantrasyonu dahil olmak üzere çeşitli çevresel koşullardan da etkilenebilir (Agarwal *et al.* 2011). Bakteriyel biyofilmlerin gelişimi için yüzey özellikleri, hücre adezyonu ve bakteri-bakteri etkileşimleri gibi faktörlerin yanı sıra birçok diğer faktör de önemlidir (Oder *et al.* 2017). Bunlar arasında çevresel faktörler, hücre içi sinyal molekülleri, genetik düzenlemeler ve hücre çevresindeki diğer organizmalar yer alır (Simões *et al.* 2010). Çizelge 2.1'de bakteriyel hücre adezyonu ve biyofilm oluşumu sürecinde kritik öneme sahip belirleyiciler gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Bakteriyel biyofilmlerin ve hücre adezyonunun gelişiminde rol oynayan unsurlar (Donlan 2002)

Hücre özellikleri	Sıvı özellikleri	Substratum özellikleri
Ekstraselüler uzantılar	pH	Materyal üzerindeki besinler
Polimerik ekstraselüler maddeler	Akış hızı ve katyonlar	Doku veya pürüzlülük
Hücre yüzeylerinin hidrofobikliği	Sıcaklık	Hidrofobiklik

2.5.2 Biyofilm oluşum süreci

Bakterilerin biyofilm oluşumu oldukça karmaşık bir süreçtir ve birden fazla adımdan oluşur. Bu adımlar arasında bakterilerin bir yüzeye bağlanması, hücrelerin çoğalması, ekstrasellüler matriks (ECM) üretimi ve son olarak biyofilm yapısının olgunlaşması yer alır (Muhsin *et al.* 2015). Bakteriler yüzeye bağlandıktan sonra, hücre çoğalması gerçekleşir. Bu, biyofilm yapısını oluşturan bakteri hücrelerinin sayısının artması anlamına gelir. Bakterilerin hücre çoğalması, biyofilm oluşumunun en önemli adımlarından biridir (Muhammad *et al.* 2020). Son olarak, biyofilm olgunlaşır ve bunu takiben Şekil 2.4’de görüldüğü üzere biyofilmde yer alan bakteri hücrelerinde kopma gerçekleşir.



Şekil 2.4 Biyofilm oluşum aşamaları (BioRender.com)

2.5.3 Bakteriyel biyofilmin etkisi

- **Patolojik etkiler**

Bakteriyel biyofilmler, birçok patolojik etkiyle ilişkilendirilebilir. Biyofilm yapısı, bakterilerin konakçı bağışıklık sisteminden kaçmasına, daha yüksek mikrop yoğunluğuna, bakteriler arasında genlerin kolaylıkla transferine, toksin konsantrasyonlarının artmasına ve antibakteriyel ilaçlardan korunmaya neden olabilir (Hall-Stoodley *et al.* 2006). Biyofilm ayrıca bakterilerin konakçıya saldırmasına izin veren virülans faktörleri gibi bileşenlerin oluşumuna da neden olabilir (Maione *et al.* 2005). Biyofilmlerin neden olduğu enfeksiyonların insidansı oldukça önemlidir. Endokardit, osteomyelit ve kateterle ilişkili üriner sistem enfeksiyonları gibi çok sayıda kronik hastalık biyofilmlerle ilişkilidir. Bu nedenle biyofilmin patolojik etkileri, bakteriyel enfeksiyonların anlaşılması ve tedavisi için önemlidir (Conlon *et al.* 2013).

- **Antibiyotik direnci**

Antibiyotikler, insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyonların tedavisinde ve önlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bakteriyel biyofilmler, tekrarlayan enfeksiyonlara yanıt vermede geleneksel antibiyotik tedavisine iyi yanıt vermemektedir (Wright, 2010). Bakteriyel biyofilmler, geleneksel antibiyotik tedavisi sırasında dirençli olan çeşitli tekrarlayan enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir. Biyofilmler, bakterilerde mutasyon oranlarını artırarak ve antibiyotik direncinde rol oynayan genlerin değişimini kolaylaştırarak antibiyotiğe dirençli nozokomiyal enfeksiyonlarda yayılmasına katkıda bulunurlar (Lynch and Robertson 2008).

Bakterilerin hayatta kalabilmeleri için, sürekli değişen çevreye uyum sağlamaları ve direnç mekanizmalarına sahip olmaları gereklidir. (Russell 2003). Biyofilimde yaşayan bakteriler, serbest yaşayan bakterilere oranla antimikrobiyallere karşı daha dirençlidirler (Mah and O'Toole 2001). Bakterilerin antibiyotiklere nasıl dirençli hale geldiği tam olarak bilinmemektedir. Ancak, EPS'nin antimikrobiyal bileşiklerle etkileşime girerek onların etkisini yavaşlatması, onlara bağlanarak dağılmalarını engellemesi veya fizyolojik değişikliklere neden olarak onları etkisiz hale getiren enzimlerin gelişmesine neden olması gibi birkaç fikir öne sürülmüştür (Anderl *et al.* 2000).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyaller

3.1.1 Araç-gereç ve cihazlar

Çalışmamız süresince kullanılan araç-gereç ve cihazların listesi Çizelge 3.1’de yer almaktadır.

Çizelge 3.1 Araç-gereç ve cihazlar

Araçlar ve cihazlar	Şirket ismi / Menşei
Denge	Kernpfb / (Almanya)
Mikrodalga fırın	GOSONIC/ (Çin)
Biopette Değişken Hacmi	(Almanya)
Manyetik karıştırıcı	Gallenkamp Labs / (İngiltere)
Sınıf II B - Biyogüvenlik kabini	Genex / (ABD)
Mikropipet	Brand / (Almanya)
Mikrodalga fırını	Gosonic / (Çin)
Işık mikroskobu	Olympus / (Japonya)
Otoklav	Express / (Germany)
Distile su cihazı	GFL Technology / (Almanya)
Hassas terazi	GFL Technology / (Almanya)
Etüv	Jrad / (Çin)
McFarland tüpü	BioMérieux / (Fransa)
VITEK 2 sistemi	BioMérieux / (Fransa)
Santrifüj tüpü 1.5mL, 0.5mL ve 0.2mL	Jet Biofil / (Singapur)
Jel görüntüleme sistemi	Thermo Fisher Scientific / (ABD)
Santrifüj	My Fugene / (Çin)
Elektroforez sistemi	Thermo Fisher Scientific/ (ABD)
Buzdolabı	Teka / (İspanya)
Tahta çubuk	Biozek / (Hollanda)

3.1.2 Çalışmada kullanılan besiyerleri

Çalışmamız süresince kullanılan besiyerleri ve cihazların listesi Çizelge 3.2’de yer almaktadır.

Çizelge 3.2 Kullanılan besiyerleri

Besiyeri ismi	Şirket ismi ve Menşei
Çikolata agar	Hindistan menşei Biomark firması
Kanlı agar	Hindistan menşei Biomark firması
MacConkey agar	Birleşik Krallık menşei Neogen firması
Brain heart infüzyon broth	Hindistan menşei Biomark firması

3.1.3 Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik reaktifler

Çalışmamız süresince kullanılan kimyasal ve biyolojik reaktiflerin listesi Çizelge 3.3’de yer almaktadır.

Çizelge 3.3 Kimyasal ve biyolojik reaktifler

Kimyasal ve biyolojik reaktifler	Company and origin
ABIOpure™ Total DNA	ABIOpure \ ABD
Agaroz	Promega \ ABD
Etidyum bromür (10mg/ml)	
GoTag Green Master Mix	
Nükleaz Free Su	
TAE (Tris-Asetat-EDTA) 40X	
Quantifluor dsDNA Sistem	
Absolute Etanol	ROMIL Pure Chemistry \ UK
Primerler	MacroGen \ Kore
Etil Alkol 70%	Tiebah \ Irak
Kristal Violet Boyası	Denkapharma \ Almanya
Safranin Boyası	
Iodine Solüsyonu	Tiebah \ Irak

3.1.4 Çalışmada kullanılan primerler

PCR yöntemi ile *sfa*, *foc*, *pmfA* ve *mrpA* genlerinin dizilerini çoğaltmak için spesifik primerler kullanıldı. Moleküler çalışmalar süresince kullanılan primer çiftlerinin listesi Çizelge 3.4’de yer almaktadır.

Çizelge 3.4 Primer setleri

Gen	Primer adı	Primer dizileri 5'--3'	Amplikon büyüklüğü (bp)
16 <i>rRNA</i>	27- F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1463
	1492- R	TACGGTTACCTTGTACGACTT	
<i>pmfA</i>	pmfA- F	GGATCATCTATAATGAACTG	564
	pmfA- R	CTGATAATCAACTTGGAAGTT	
<i>mrpA</i>	MrpA- F	TTCTTACTGATAAGACATTG	512
	MrpA- R	ATTTCAGGAAACAAAAGATG	
<i>sfa</i>	Sfa- F	CCGTAAGATGTCTGCGAG	100
	Sfa -R	AGCAAGTCTGGCAACGAG	
<i>foc</i>	Foc- F	GGTGGAACCGCAGAAAATA	388
	Foc- R	GAACTGTTG GGGAAAGAGTG	

3.2 Metodlar

3.2.1 Çalışma tasarımı ve hastalar

Kesitsel olarak planlanan ve klinik olarak yürütülen “Ürolitiazisli Hastalardan İzole Edilen Bakteri Suşlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Fenotipik ve Moleküler Olarak Değerlendirilmesi” başlıklı çalışmamıza, Kerkük Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne idrar yolu enfeksiyonu semptomları ile başvuran ve böbrek taşı tanısı alan, 61'i erkek, 39'u kadın olmak üzere yaşları 20 ile 60 arasında değişen toplam 100 hasta dahil edildi. Prospektif çalışmamızda, idrar yolu enfeksiyonu semptomları ve böbrek taşı olma olasılıklarına göre seçilen hastalarımızdan bilgilendirilmiş onam alındı.

- **Dahil etme kriterleri:** Böbrek taşları ile ilişkili idrar yolu enfeksiyonu semptomlarıyla tarafımıza başvuran hastalar çalışmaya dahil edildi.
- **Dışlama kriterleri:** Otoimmün böbrek hastalıkları, böbrek yetmezliği ile ilişkili farklı durumları ve diğer kronik hastalıkları olan olgular çalışmaya dahil edilmedi. Onsekiz yaşından küçük ve semptomatik dönemde profilaktik antibiyotik tedavisi almış olan hastalar da çalışmadan dışlandı.

3.2.2 Örneklerin toplanması

Kerkük Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran ve çalışma kriterlerine uygun olan 20-60 yaş arası erişkin bireylerden mikrobiyolojik tetkikler için alınan idrar örnekleri kullanıldı. İdrar kültür örneğinin elde edilmesi için verilen steril idrar kabına, idrarın bir kısmının dışarı yapılması gerektiği belirtilerek en az 10 mL hacminde orta akım idrar alınması sağlandı.

3.2.3 Bakterilerin identifikasyonu

- **Mikroskobik inceleme**

Toplanan idrar örnekleri direkt ve santrifüj sonrası mikroskopik incelemeye tabi tutuldu. Santrifüjle inceleme için idrarın 5 mL'si steril bir tüp içerisine alınarak 3000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak dipte kalan pellet resüspanse edildi. Yaymadan lam üzerine konulan idrar örneklerinden Gram boyaması yapıldı. Gram boyaması yapılan preparatlar en az 25 mikroskop sahası olmak üzere bakteriyolojik olarak incelendi. Bunun yanı sıra alınan idrar örneğinin tek bir damlası 40X büyütmeli ışık mikroskobunda kristal, eritrosit ve lökosit varlığı açısından değerlendirildi.

- **Kullanılan besiyerleri**

Çalışmaya alınan örnekler Kanlı agar, Çikolata agar ve MacConkey agar besiyerlerine ekilerek 37°C'de 18-24 saat süreyle etüvde inkübe edildi. Klinik olarak önemli mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanması, rutin geleneksel mikrobiyolojik tekniklerin uygulanması yoluyla gerçekleştirildi.

MacConkey agar

Besiyeri içeriğinde bulunan kristal viyole ve safra tuzları sayesinde çeşitli Gram negatif bakterilerin izolasyonunda ve ayrıştırılmasında seçici olarak kullanılan bir besiyeridir.

Ayrıca besiyerinde yer alan pH indikatörü sayesinde laktozu fermente etme yeteneğine bağlı olarak farklı renkte koloniler üreterek tanıda fayda sağlar.

Ticari olarak alınan liyofilize toz şeklindeki MacConkey agar besiyerinin kullanıma hazır hale getirilmesi için üretici firmanın önerdiği süreçler izlendi. Kutu üzerinde yer alan prosedüre uygun olarak belli oranda distile suda eritilen toz besiyeri 121 °C’de 15 dakika boyunca otoklavlandı. Soğumaya bırakılan besiyeri 45-50 °C’ye geldikten sonra 4 mm kalınlığında olacak şekilde petri kaplarına dökülerek katılaştırıldı.

Kanlı agar

Bir litre distile su içerisinde eritilen 28 g dehidre nutrient besiyeri karışımı otoklavda 15 dakika boyunca 121 °C’de sterilize edildi. Beşyüz mL besiyeri bulunan balon jojeler 45-50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra içerisine %5 oranında steril defibrine koyun kanı eklendi. Hafifçe karıştırılan besiyeri petri kutularına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü. Yüksek besin değerine sahip genel amaçlı bir besiyeri olan %5 koyun kanı ile zenginleştirilmiş kanlı agar birçok mikroorganizmanın klinik örneklerden izolasyonu için kullanılmaktadır. Kan içerisinde bulunan zengin besin kaynakları sayesinde mikroorganizmaların büyümesi ve çoğalması için uygun bir ortam sağlar.

Çikolata agar

Hazırlanması için öncelikle bir litre distile su içerisinde eritilen 28 g dehidre nutrient besiyeri karışımı otoklavda 15 dakika boyunca 121 °C’de sterilize edildi. Besiyeri 75-80 °C sıcaklığındayken içerisine %5 oranında steril defibrine koyun kanı eklendi. İyiye karıştırılan besiyeri steril petri kaplarına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü. Sıcaklığa bağlı olarak kan içerisinde bulunan eritrositlerin hemolizi sonucu hemoglobin açığa çıkar ve besiyeri çikolatamsı bir renk alır. Bu işlem sayesinde, çeşitli mikroorganizmaların yetiştirilmesi için uygun bir ortam oluşur. Besin değeri yüksek, seçici olmayan genel üretici katı bir besiyeridir.

Brain Heart infüzyon broth

Brain Heart infüzyon besiyerine 15 g/L olacak şekilde agar agar ilave edilerek uygun ısıda eritilip tüplere dağıtıldı. Elde edilen besiyeri 1 atmosfer basınç altında 121 °C’de 15 dk boyunca steril edildi. Brain Heart infüzyon besiyeri klinik örneklerden birçok bakterinin üremesine olanak sağlayan genel amaçlı sıvı bir besiyeridir.

Kültürde üreyen bakterilerin Gram boyama ile incelenmesi

Gram boyama yöntemi mikrobiyoloji laboratuvarlarında olası etkenin tanımlanmasına yardımcı olmak amacıyla kullanılan en temel testlerden biridir. Diğer bir deyişle Gram boyama mikrobiyoloji laboratuvarlarının vazgeçilmezidir. Çalışmamızda, kültürde üreyen bakterilerin yorumlanması ve örnekteki etkenin tanımlanması için her bir örneğe Gram boyama yöntemi uygulandı.

VITEK® 2 sistemi ile bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik direncinin belirlenmesi

VITEK® 2 (bioMérieux, Fransa) sistemi, bakterilerin identifikasyonu ve antimikrobiyal duyarlılık testleri için floresan tabanlı teknolojileri kullanan yenilikçi ve otomatik bir yaklaşımdır. Bu sistem ilk olarak 1970’lerde geliştirilmiş ve tanı amaçlı kullanılmıştır. Sonrasında geliştirilerek antimikrobiyal duyarlılığı saptayabilecek şekilde dizayn edilmiştir. Bu sistem, her testi 15 dakikada bir düzenli okuyarak analiz eder. Optik sistemler aracılığıyla, bulanıklık, floresan ışıması ve kolorimetrik sinyalleri kaydederek fotometrik okumalar yapar.

VITEK® 2 sisteminin çalışma prensibi

VITEK® 2 sistemine ait reaktif kartları, her biri ayrı bir test substratı içeren 64 kuyuya sahiptir. Bu substratlar çeşitli metabolik aktiviteleri ölçerler. Kültürde üreyen bakterinin saf kolonisinden hazırlanan süspansiyon aşağıdaki prosedüre uygun şekilde hazırlanır.

Prosedür

- 1- Test tübüne (3.0 mL) standart %0,9'luk sodyum klorür çözeltisi yerleştirildi.
- 2- Kültürde üreyen bakterinin saf kolonisinden steril bir eküvyon yardımıyla örnek alındı.
- 3- Test tübüne yoğunluğu 0,5 McFarland olacak şekilde bakteri örneği inoküle edilerek reaktif kart yerleştirildi.
- 4- İnokülümü içeren kart VITEK® 2 kaset içinde taşıyıcı istasyona yerleştirildi.
- 5- Kaset yüklendikten sonra cihaz tüm inkübasyon ve okuma adımlarını otomatik gerçekleştirerek dört ila altı saat sonra sonuçları verdi.

3.2.4 Biyofilm oluşumunu saptama

- 1- İzole edilen kökenlere ait süspansiyonlar, içerisinde %1-3 glukoz içeren beyin kalp infüzyon buyyon bulunan 96 kuyucuklu mikropklara inoküle edildi.
- 2- İnokülasyon sonrası mikropkğin üzeri kapatılarak 37°C'de aerobik koşullarda 24 saat inkübe edildi.
- 3- İnkübasyonun ardından mikropk distile su ile dikkatli bir şekilde yıkanarak oda sıcaklığında 15 dk kurumaya bırakıldı.
- 4- Yıkama işleminden sonra her kuyucuğa 200 µl %0,1'lik kristal viyole boya maddesi eklendi.
- 5- Boyanın biyofilme penetrasyonu için belirli bir süre beklendikten sonra kuyucuklar boşaltılarak yeniden yıkama işlemi yapıldı ve 20 dk kurumaya bırakıldı.

- 6- Bu aşamadan sonra %95 konsantrasyonda 200 µl etanolle muamele edilerek spektrofotometrik ölçüm yapan mikropalak okuyucu cihazda her kuyucuk 630 nm'de ölçüm yapılarak optik dansite değeri belirlendi.

Spektrofotome cihazı tarafından ölçülen değerler, belirli bakteri izolatları içeren negatif kontrol kuyucuklarının ortalama optik dansite değerleriyle karşılaştırılarak biyofilm oluşumunun varlığı ve derecesi saptandı (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Bakterilerin biyofilm oluşturma aktivitelerinin değerlendirilmesi

Mean OD değeri	Biyofilm yoğunluğu
$OD \leq OD_c^*$	Biyofilm oluşturmayan
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	Zayıf yapışma
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	Orta yapışma
$4 \times OD_c < OD$	Güçlü yapışma

*Cut off değerinin optik dansitesi (OD_c) = negatif kontrolün ortalama OD'si + 3x negatif kontrolün standart sapması

Cut off değeri (OD_c), her bir bakteri izolatının yanı sıra negatif kontrolün de ne kadar etkili bir biyofilm oluşturabileceğini belirleyerek keşfedildi. Negatif referansın ortalama OD'sinden üç standart sapma çıkarılarak belirlendi. Cut off değerine göre biyofilm yoğunluğu Çizelge 3.6'da gösterilmektedir.

Çizelge 3.6 Cut off değerine göre biyofilm yoğunluğu

Biyofilm yoğunluğu	630 nm'de OD
1- biyofilm oluşturmayan	< 0,244
2- zayıf	0,244 - 0,488
3- orta	0,488 - 0,976
4- güçlü	$\geq 0,976$

3.3 Moleküler Yöntemler

3.3.1 *Escherichia coli* ve *Proteus mirabilis*'te 16s rRNA, *sfa*, *foc*, *pfmA* ve *mrpA* genlerinin tespiti

DNA ekstraksiyonu

Bakteriyal izolatların DNA ekstraksiyonu ABIOpure™ Genomic DNA Kit'i kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Nükleik asit ekstraksiyonu için aşağıdaki işlemler uygulandı;

- 1- Genomik DNA ekstraksiyonu yapılacak olan izolatların bir günlük pasajlarından alınan koloniler 1 ml Phosphate-Buffered Saline (PBS) tamponu içeren PCR tüpüne konuldu. Homojenize edilen süspansiyon 13.000 devirde 2 dakika santrifüj edildi.
- 2- Süpernatant atıldıktan sonra kalan pellete 200 µl Lysis Buffer eklendi.
- 3- Lizat üzerine 20 mg/ml konsantrasyonunda 20 µl Proteinaz K solüsyonu eklenip vortekslenerek 56°C'de 10 dakika süreyle inkübe edildi.
- 4- İnkübasyon sonrasında, 200 µL genomik lizis bağlama tamponu eklenerek tüp vortekslendi ve ardından 70 °C'de 30 dk süreyle tutuldu.
- 5- Numunelere 200 µl %96-100 etanol eklenerek 10 saniye vortekslendi.
- 6- İçerik pcr tüplerine aktarılarak 10.000 rpm hızda bir dakika santrifüj edildikten sonra kolonların toplayıcı tüpleri değiştirildi.
- 7- Ardından 600 µl Wash Buffer eklenerek 10.000 rpm'de santrifüj edildi ve kolonların toplama tüpleri yenisiyle değiştirildi.
- 8- Wash Buffer'ın fazlasını almak için kolonların toplama tüpleri değiştirilerek 14.000 rpm'de 1 dakikada santrifüj edildikten sonra alt sıvı atıldı ve kolonlar 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

- 9- Son santrifüjleme işlemini takiben daha önceden ısıtılmış elution bufferden 100 µl eklenerek oda ısısında 1 dakika inkübasyona bırakıldı ve ardından yaklaşık 5.000 rpm'de beş dakika santrifüjlendi.

DNA miktar tayini

Numunelerin sonraki işlemlerde kullanılmaya uygun olup olmadığını belirlemek ve elde edilen DNA miktarını ölçmek için Quantus™ Fluorometre (Promega®, Madison, USA) kullanıldı. QuantiFluor® dsDNA sistemi, küçük miktarlardaki DNA'nın hassas bir şekilde belirlenmesini sağlayan bir floresan DNA bağlayıcı boya içerir. Her bir DNA örneğini 1:200 dilüsyon oranında seyrelterek QuantiFluor® boyası ile 0,5 ml PCR tüpünde birleştirildi. Oda sıcaklığında 5 dakikalık inkübasyon süresinin ardından, DNA numunesinin miktarı Quantus™ fluorometre kullanarak absorbans bazlı dijital olarak ölçüldü.

Primerlerin hazırlığı

Çalışmada kullanılacak primerler Macrogen Company (Seoul, Korea) firmasından liyofilize halde temin edildi. Liyofilize halde gelen primerler steril ortamda nükleaz içermeyen suda çözülerek nihai konsantrasyonu 100 pmol/ul olacak şekilde elde edildi. Ana stoktan sulandırma yapılarak 10 pmol/ul'lik dilüsyonlar hazırlanarak daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

DNA amplifikasyonu

Çalışmamızda araştırılan *sfa*, *foc*, *pfmA* ve *mrpA* genlerinin amplifikasyonu için tek aşamalı PCR deneyi yapıldı. Deneyde termal siklus cihazı olarak PTC- 200 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research, A.B.D.) kullanıldı

PCR için gerekli reaktif karışımı Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7 Termal siklus protokolü

Master Mix	12,5 µL
Forward primer	1 µL
Reverse primer	1 µL
Nükleaz içermeyen deiyonize su	8,5 µL
Hedef DNA	2 µL
Toplam hacim	25 µL

PCR programı

Termal siklus programına ait koşullar Çizelge 3.8’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.8 Termal siklus programı

Basamak	Sıcaklık	Süre	Siklus
Başlangıç denatürasyonu	95 °C	5 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	30
Bağlanma	63 °C	30 saniye	
Ektansiyon	72 °C	1 dakika	
Final ekstansiyonu	72 °C	7 dakika	1
Soğutma	10 °C	10 dakika	1

Elektroforez için agaroz jelin hazırlanması

- 1- Erlen kabına 100 mL 1X TAE tamponu eklendi. Ek olarak, tampona %1,5 konsantrasyonda 1,5 gram agaroz dahil edildi.

- 2- Hazırlanan jelin çözülmesi ve erimesi için hafifçe çalkalanarak mikrodalga fırına konuldu. Aralıklarla mikrodalga fırından çıkartılan erlen tamamen eriyene kadar çalkalandı.
- 3- Tampon eritilip 40-50 °C'ye soğutulduktan sonra içerisine 1µl etidyum bromür eklendi ve baloncuk oluşmamasına dikkat edilerek yavaşça karıştırıldı.
- 4- Gerekli hacimler ayarlandıktan sonra taraklar yerleştirilerek jel döküldü. Jel donduktan sonra taraklar çıkartılarak üzerine TAE tamponu eklendi.

Çoğaltılan PCR ürünlerinin yatay agaroz jel elektroforezine yüklenmesi

Çoğaltılan amplikonlar yükleme boyası (loading dye) karıştırılarak kuyucuklara doğrudan 5 µl hacminde yüklendi. Ürünlerle beraber moleküler ağırlık belirteci olan DNA ladder (Promega, ABD)'da yüklendi. Yükleme sonrası 100 voltta 30 dk yürütüldü. Araştırılan her bir gene özgü büyüklükteki bantlar UV transilluminatörde değerlendirilerek fotoğrafları çekildi.

3.4 İstatistiksel analiz

Verilerin analizi IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22 (IBM Corp. Armonk, NY: USA. Released 2013) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu çalışmada kategorik değişkenler frekans ve yüzde kullanılarak temsil edildi. Yüzdelerin karşılaştırılmasında ki-kare testi (χ^2) kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Demografik özellikler

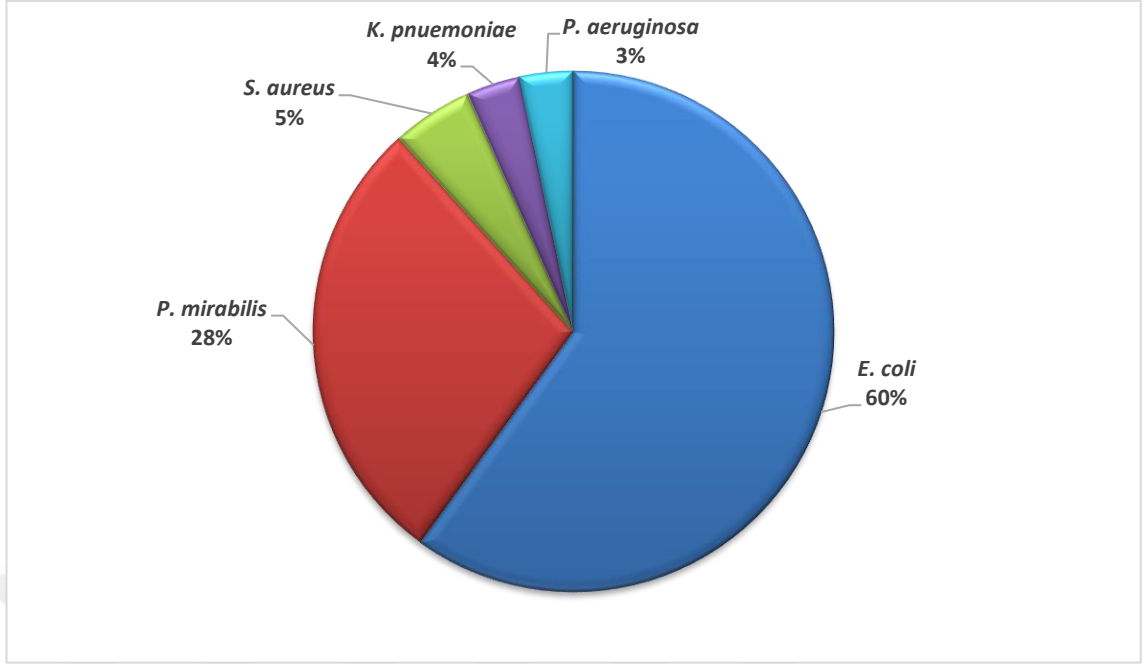
Bu çalışmada, böbrek taşlarıyla ilişkili veya böbrek taşlarından kaynaklandığı şüphelenilen idrar yolu enfeksiyonlarından muzdarip 100 hasta yer almaktadır. Hastalar, idrar yolu enfeksiyonu semptomlarına ve böbrek taşı olma olasılıklarına göre çalışma için seçildi. Yaşları 20 ile 60 arasında değişen olguların 61'i erkek, 39'u ise kadın hastaydı Çizelge 4.1.

Çizelge 4.1 Hastaların yaş ve cinsiyet özellikleri

Cinsiyet		Erkek	Kadın
		61	39
Yaş	Mean $\pm$ SD	42.88 $\pm$ 12.2	
	Aralık	20-60	

4.2 Bakteri kültürü sonuçları

Böbrek taşı olduğundan şüphelenilen idrar yolu enfeksiyonu olan 100 hastadan alınan idrar örneklerinden 60 bakteri izole edildi. En sık izole edilen etkenler sırasıyla *Escherichia coli* (n:36), *Proteus mirabilis* (n:17), *Staphylococcus aureus* (n:3), *Klebsiella pneumoniae* (n:2) ve *Pseudomonas aeruginosa* (n:2) olarak saptandı Şekil 4.1. İzole edilen bakterilerin kültürde üremeleri Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



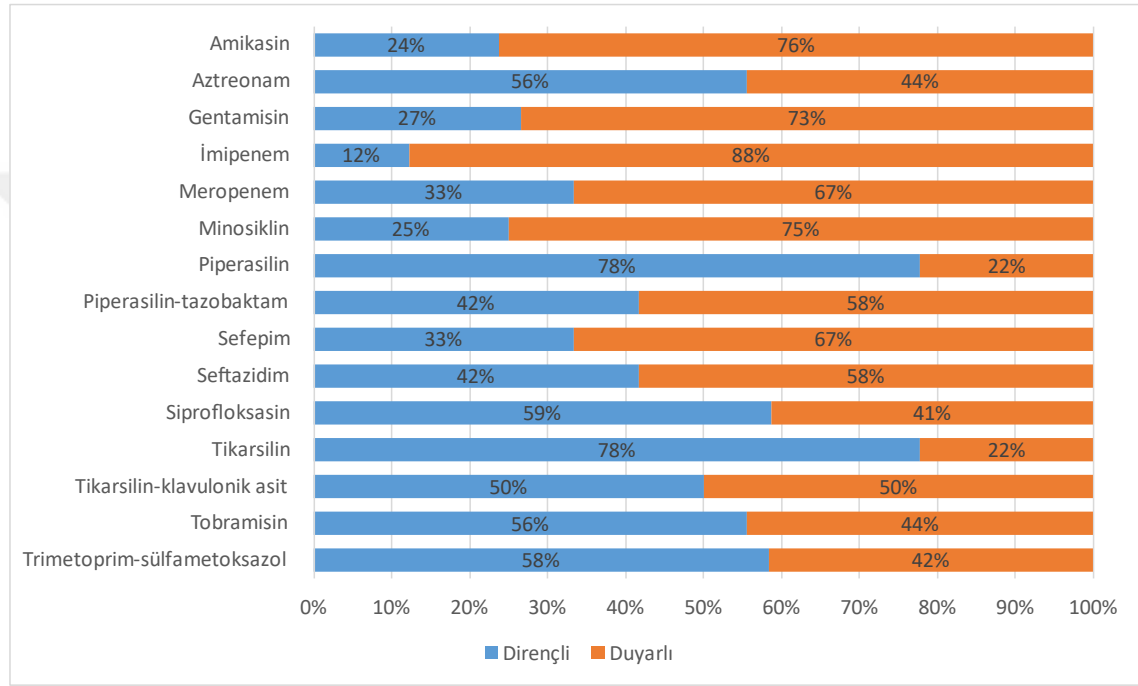
Şekil 4.1 İzole edilen bakterilerin dağılımı



Şekil 4.2 İzole edilen bakterilerin kültürde üremeleri

4.3 İzole edilen *E. coli* kökenlerinin antibiyotik direnç oranları

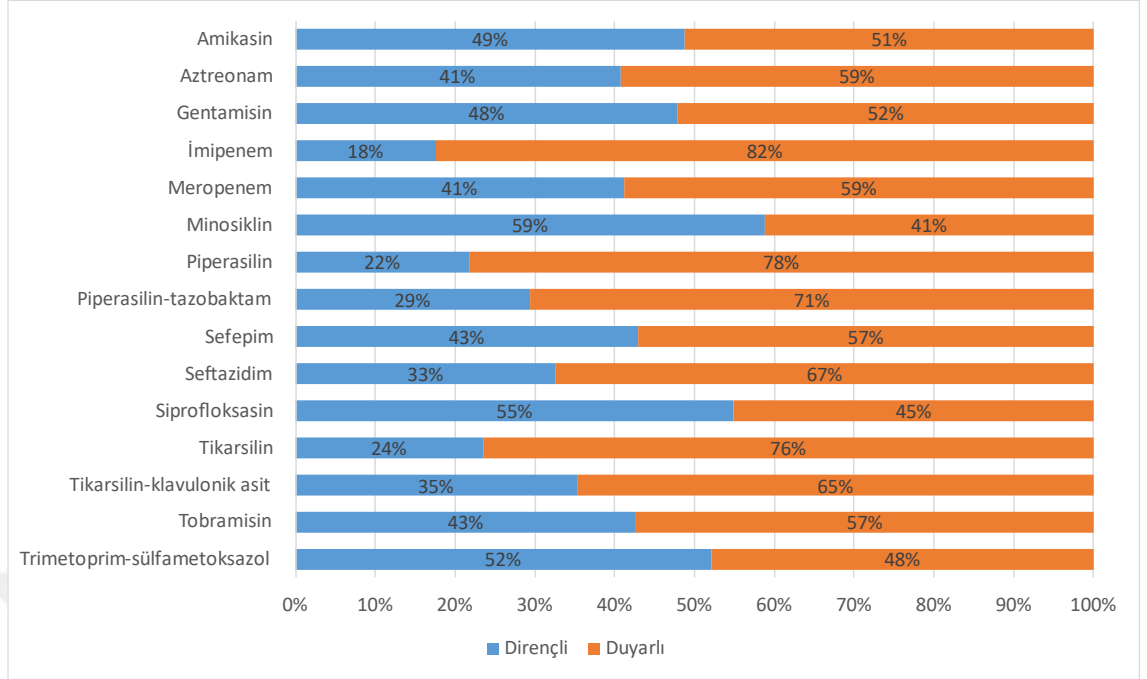
Antibiyotik duyarlılık testi, Vitek® 2 (bioMérieux, Fransa) kartları kullanılarak yapıldı. İzole edilen *E. coli* kökenlerine en yüksek direnç oranları %78’le piperasilin/tikarsilin, %59’la siprofloksasin ve %58 ile trimetoprim-sülfametoksazole karşı tespit edildi. *E. coli* kökenlerinde en duyarlı antibiyotik ise imipenem olarak belirlendi Şekil 4.3.



Şekil 4.3 *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç oranları

4.4 İzole edilen *P. mirabilis* kökenlerinin antibiyotik direnç oranları

İzole edilen *P. mirabilis* kökenlerinin en dirençli olduğu antibiyotiğin minosiklin (%59) olduğu bulundu. Yüksek dirence sahip diğer antibiyotikler ise sırasıyla siprofloksasin (%55) ve trimetoprim-sülfametoksazol (%52) olarak tespit edildi. *P. mirabilis* kökenlerinin en duyarlı olduğu antibiyotik ise %18 direnç oranıyla imipenem olduğu saptandı Şekil 4.4.



Şekil 4.4 *P. mirabilis* izolatlarının antibiyotik direnç oranları

4.5 *E. coli* ve *P. mirabilis* kökenlerinin biyofilm oluşturma durumu

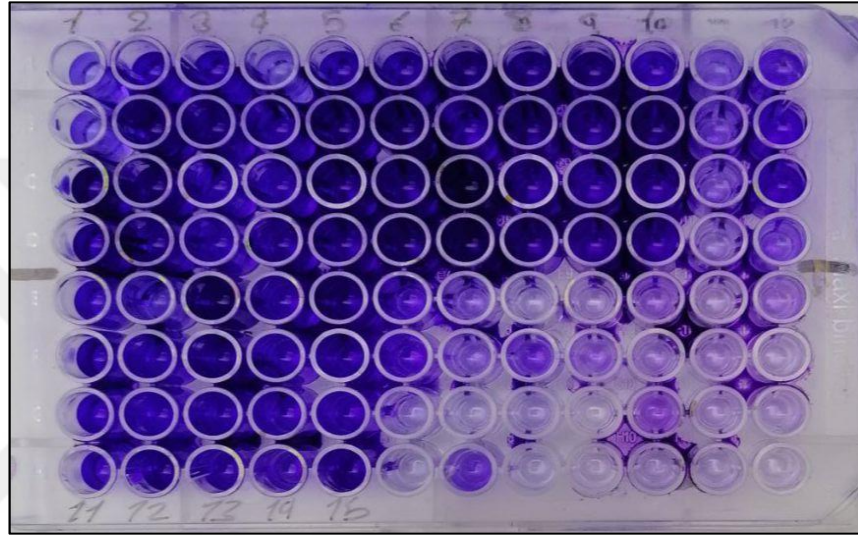
İdrar örneklerinden en fazla izole edilen bakteri türleri olan *E. coli* ve *P. mirabilis* izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneklerine yönelik yapılan değerlendirme sonuçlarına göre;

Toplamda 36 *E. coli* izolatının 16 (%44,4)'sında üretim gücü yüksek biyofilm kapasitesi, 11 (%30,6)'inde üretim gücü orta düzeyde biyofilm kapasitesi, 5 (%13,9)'inde üretim gücü zayıf biyofilm kapasitesi saptandı Çizelge 4.2. *E. coli* izolatlarının 4 (%11,1)'ünde ise biyofilm oluşumu tespit edilememiştir. Elde edilen sonuçlar gösteriyor ki, izole edilen *E. coli*'lerin çoğu biyofilm oluşturma yeteneğine sahipti Şekil 4.5.

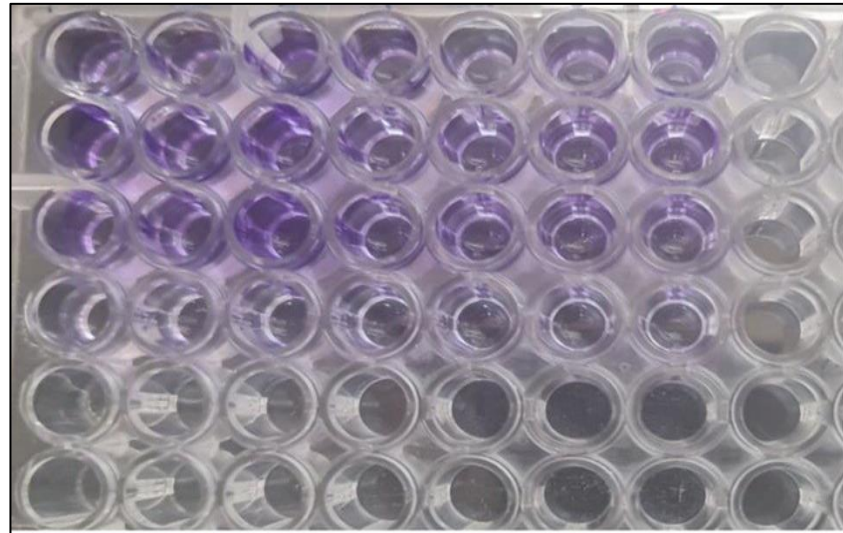
Buna karşın, izole edilem 17 *P. mirabilis*'in 10 (%58,8)'unda üretim gücü yüksek biyofilm kapasitesi, 4 (%23,5)'ünde üretim gücü orta düzeyde biyofilm kapasitesi, 2 (%11,8)'sinde biyofilm ilişkisi zayıf bulunmuştur Çizelge 4.2. *P. mirabilis* izolatlarının 1 (%5,9)'inde ise biyofilm oluşumu tespit edilememiştir Şekil 4.6.

Çizelge 4.2 *E. coli* ve *P. mirabilis* kökenlerinin biyofilm oluşturma yeteneği

Bakteri	Biyofilm oluşumu			
	Güçlü	Orta	Zayıf	Yok
<i>E. coli</i>	16	11	5	4
	%44,4	%30,6	%13,9	%11,1
<i>P. mirabilis</i>	10	4	2	1
	%58,8	%23,5	%11,8	%5,9



Şekil 4.5 *E. coli* kökenlerinin mikrolaka yöntemi ile biyofilm tespiti



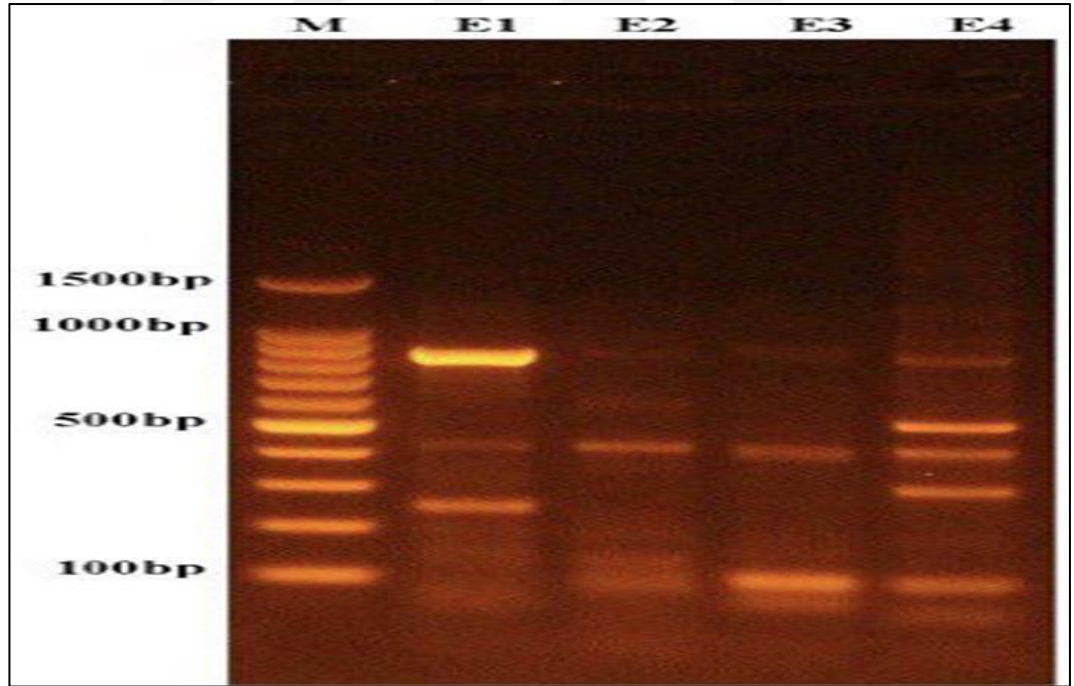
Şekil 4.6 *P. mirabilis* kökenlerinin mikrolaka yöntemi ile biyofilm tespiti

4.6 Virölans genlerinin (*foc*, *sfa*, *pmfA* ve *mrpA*) varlığı

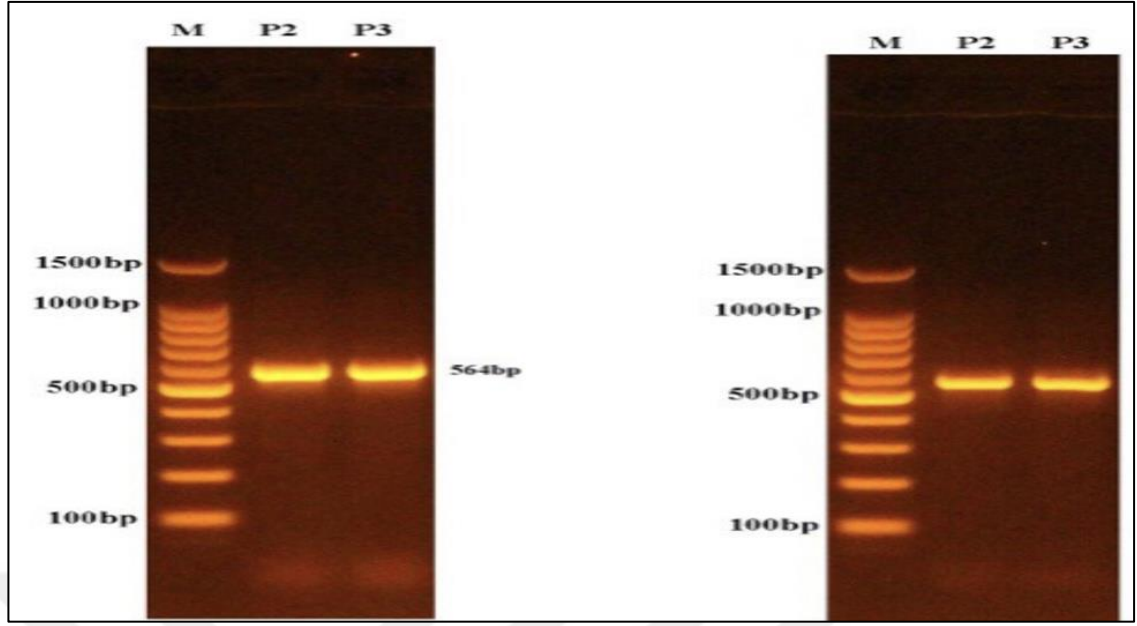
İzole ettiğimiz 36 *E. coli* izolatının 24'ünde *foc* geni, 20'sinde ise *sfa* geni tespit edilmiştir Şekil 4.7. *P. mirabilis*'e ait 17 izolatın 12'sinde *pmfA* geni saptanırken 10'unda *mrpA* geni saptanmıştır Şekil 4.8. Hasta örneklerinden izole ettiğimiz *E. coli* ve *P. mirabilis* izolatlarına ait virölans genlerinin yaygınlık oranları Çizelge 4.3'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.3 *E. coli* ve *P. mirabilis* izolatlarında saptanan virölans genleri

Bakteri	n	Genler				
		<i>foc</i>	<i>sfa</i>	<i>pmfA</i>	<i>mrpA</i>	16sRNA
<i>E. coli</i>	36	24 (%66,7)	20 (%55,6)			36 (100%)
<i>P. mirabilis</i>	17			12 (%70,6)	10 (%58,8)	17 (100%)



Şekil 4.7 *E. coli* virölans genlerinin jel elektroforez sonucu



Şekil 4.8 *P. mirabilis* virülans genlerinin jel elektroforez sonucu

4.7 *E. coli* kökenlerinin biyofilm oluşturma kapasiteleri ile *sfa* ve *foc* genlerinin birlikteliği

E. coli kökenlerine ait güçlü biyofilm oluşturan 10 izolatta, orta düzeyde biyofilm oluşturan 7 izolatta ve zayıf biyofilm oluşturan 3 izolatta *sfa* geni saptanmıştır. Güçlü, orta ve zayıf biyofilm oluşturma kapasitesine sahip *E. coli* kökenlerine ait sırasıyla 14, 8 ve 2 izolatta *foc* geni saptanmıştır Çizelge 4.4.

Çizelge 4.4 *E. coli* izolatlarında *sfa* ve *foc* genlerinin biyofilm oluşturma kapasitelerine göre dağılımı

<i>E. coli</i>	Biyofilm			
	Güçlü oluşum (n:16)	Orta oluşum (n:11)	Zayıf oluşum (n:5)	Oluşum yok (n:4)
<i>sfa</i>	10	7	3	0
%	%62,5	%63,6	%60	%0
<i>foc</i>	14	8	2	0
%	%87,5	%72,7	%40	%0

4.8 *P. mirabilis* izolatlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri ile *pmfA* ve *mrpA* genlerinin birlikteliği

P. mirabilis kökenlerine ait güçlü biyofilm oluşturan izolatların 6'sında, orta düzeyde biyofilm oluşturan izolatların 4'ünde, zayıf biyofilm oluşturan izolatların 1'inde ve biyofilm oluşturmayan izolatın 1'inde *pmfA* geninin bulunduğu saptandı. Güçlü biyofilm oluşturan 10 izolatın 6'sında, orta düzeyde biyofilm oluşturabilen 4 izolatın 3'ünde, zayıf biyofilm oluşturabilen 2 izolatın ise 1'inde *mrpA* geni tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturmayan bir izolatta ise *mrpA* geni tespit edilememiştir Çizelge 4.5.

Çizelge 4.5 *P. mirabilis* izolatlarında *pmfA* ve *mrpA* genlerinin biyofilm oluşturma kapasitelerine göre dağılımı

<i>P. mirabilis</i>	Biyofilm			
	Güçlü oluşum (n:10)	Orta oluşum (n:4)	Zayıf oluşum (n:2)	Oluşum yok (n:1)
<i>pmfA</i>	6	4	1	1
%	60%	100%	50%	100%
<i>mrpA</i>	6	3	1	0
%	60%	75%	50%	0%

5. TARTIŞMA

Ürolitiazis, böbreklerde veya üreterde sertleşmiş mineral veya taş oluşumudur. Bu durum, dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilir ve idrar yolu sistemine bağlı birçok komplikasyona neden olabilir. Özellikle, ürolitiazis hastaları, üriner sistem enfeksiyonlarına yakalanma riskinin artması nedeniyle daha fazla dikkat gerektirirler. Bazı durumlarda, üriner sistem enfeksiyonları taş oluşumunun doğrudan nedeni olabilir. Bununla birlikte, taşlar kendileri de patojenler içerebilir ve bu nedenle enfeksiyonlara katkıda bulunabilirler. Bu durum, ürolitiazis tedavisi için uygun antibiyotiklerin seçilmesi ve enfeksiyonların önlenmesi açısından önemlidir (Thomas and Tolley 2008).

Irak'ın Tikrit şehrinde yapılan bir çalışmada, ürolitiazisli hastalardan alınan 160 idrar örneğinin 45'inde idrar kültürünün pozitif olarak saptandığı bildirilmiştir. En sık izole edilen mikroorganizmanın *E. coli* olduğu ve bunu sıklık olarak *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. saprophyticus* ve *S. marcescens* izlediği rapor edilmiştir (Al-Jebouri and Mdish 2013). Böbrek taşı olan hastalardan izole edilen üropatojenlerin araştırıldığı başka bir çalışmada ise çalışma süresince toplam 3892 idrar örneği incelenmiş, tespit edilen en yaygın 4 üropatojenin sırasıyla *E. coli* (%49), *K. pneumoniae* (%10), *E. faecalis* (%9) ve *P. mirabilis* (%5) olduğu bildirilmiştir (Chen *et al.* 2018). Yakın zamanda Çin'de yapılan bir çalışmada, üriner taşı olan hastalardan izole edilen üropatojenik mikroorganizmaların dağılımına baktığımızda *E. coli*'nin en yaygın patojen olmaya devam ettiği görülmektedir (Gu *et al.* 2022).

Ürolitiazis hastalarında yapılan çeşitli çalışmalarda, idrar kültürlerinde bakteriyel enfeksiyon prevalansının her zaman benzer olmadığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda, idrar yolu enfeksiyonu geçiren ve böbrek taşı oluşumu ile uyumlu semptomları olan 100 hastadan alınan idrar örneklerinde toplamda 60 bakteri izole edilmiştir. Bu oran, Mısır'da yapılan ve vakaların %30'unun bakteriyel izolatlarla sahip olduğunu gösteren yakın tarihli bir çalışmanın sonuçlarından oldukça yüksektir (Ahmed *et al.* 2022). Bununla birlikte, Tayland'da böbrek taşı olan hastalarda %59 oranıyla saptanan idrar kültürü pozitifliği çalışmamızın sonuçlarıyla oldukça benzerdir (Tanthanuch 2006). Verilerimiz,

ürolitiazis ile ilişkili İYE prevalansının hala yüksek oranda saptandığını göstermektedir. Bu sonuçlar coğrafi farklılıklardan, hastaların demografik özelliklerinden ve daha da önemlisi ürolitiazisin altında yatan farklı patojenik mekanizmalardan kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda *E. coli* 36 örnekle en sık izole edilen etken olurken, *P. mirabilis* 17 örnekten izole edilmiştir. İzole edilen diğer etkenler sırasıyla *S. aureus* (n:3), *K. pneumoniae* (n:2) ve *P. aeruginosa* (n:2) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, böbrek taşı olduğundan şüphelenilen idrar yolu enfeksiyonlarının en sık nedeninin *E. coli* olduğunu, bununla birlikte, *P. mirabilis*'in de sıkça izole edilen bir etken olduğunu teyit etmektedir.

Yapılan farklı çalışmaların sonuçlarına bakıldığında, böbrek taşı olan hastaların idrar yolu enfeksiyonlarının en sık nedenleri arasında *E. coli* ve *P. mirabilis*'in öne çıktığı ve bu sonucun çalışmamızdan elde edilen verilerle uyumlu olduğu görülmektedir. *E. coli*'nin insan bağırsak florasında bulunması ve fimbriyalı yüzey proteinleri ile birlikte çeşitli enzimleri sayesinde idrar yolu duvarlarına kolayca yapışabilmesi idrar yolu enfeksiyonu geçiren ürolitiazisli hastalarda sık saptanmasına neden olabilir. *E. coli* enfeksiyonunun ortaya çıkmasındaki ilk aşama konakçı dokulara tutunmadır. Bakterinin yüzeyindeki adhezin adı verilen moleküller, konak hücrelere bağlanmayı sağlar. Bu bağlanma, bakterinin konak hücrelerde çoğalmasına ve enfeksiyonun yayılmasına olanak tanır (Al Benwan *et al.* 2010). *P. mirabilis*'in ürolitiazisli hastalarda sık saptanmasının olası nedenleri arasında, bu bakterinin özellikle üreaz enzimini yüksek seviyelerde üretebilmesi ve bu enzim sayesinde idrarda bulunan üre moleküllerinin hidrolizini hızlı bir şekilde gerçekleştirebilmesi yer alır (Torzewska *et al.* 2014). Bu durum, idrarda üre miktarının artmasına ve bu sayede üre kristallerinin oluşmasına neden olabilir.

Mısır'da yapılan bir araştırmaya göre, böbrek taşlarıyla ilişkili baskın bakterilerin %57 oranla *E. coli* ve %20 oranla *S. aureus* olduğu saptanmıştır (Ahmed *et al.* 2022). Farklı bir araştırmanın bulgularına göre ise en sık saptanan mikroorganizmalar ilginç bir şekilde sırasıyla %23,5 oranla *Corynebacterium* spp. ve %21,5 oranla *E. coli* olduğu bildirilmiştir (Tanthanuch 2006). Bu bulgular çalışmamızdan elde edilen verilerden farklılık göstermektedir. Hastalarda varolan taşın özellikleri, taşın oluşum mekanizması,

büyükluğu ve bileşimi, izole edilen baskın bakteri türlerinde farklılıklara neden olabilir. Ayrıca değişik bölgelerde farklı hasta popülasyonlarıyla yapılan çalışmalar nedeniyle böbrek taşı oluşumuna bağlı enfeksiyonlardan izole edilen bakteri türlerinde farklılıklar olabilir.

E. coli gibi klinik açıdan önemli bir bakterinin, enfeksiyon hastalıklarında varolan antimikrobiyal direncinin giderek daha da fazla endişe verici hale geldiği bir gerçektir. Dünya genelinde yapılan birçok çalışma, *E. coli* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiğini ortaya koymaktadır. Özellikle son yıllarda, *E. coli*'nin sıklıkla görülen idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı direnç geliştirme oranları yüksek seviyelerde kaydedilmiştir. Örneğin, Cezayir'de yapılan bir çalışmada, *E. coli* izolatlarının %86'sının birinci kuşak sefalosporin grubu antibiyotiklere dirençli olduğu belirlenmiştir. Bunu sırasıyla %83'lük oranla tikarsilin, %73 oranla ampisilin ve %58 oranla amoksisilin- klavulonik asit izlemektedir (Ait-Mimoune *et al.* 2022). Benzer şekilde, Irak'ta yapılan bir çalışma, *E. coli* izolatlarının yaklaşık %90'ının kinolon grubu antibiyotiklere dirençli olduğunu ortaya koymuştur (Jalil and Al Atbee 2022).

Asya'da da durum benzerdir. Kore'de yapılan bir çalışmada, *E. coli* izolatlarının %75'inin penisilin grubu antibiyotiklere dirençli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, Güney Asya ülkelerinde yapılan birçok çalışmada da *E. coli* izolatlarının yüksek düzeyde antimikrobiyal direnç gösterdiği ortaya koyulmuştur. Bu sonuçlar, *E. coli*'yi baskın üropatojen olarak tanımlayan diğer yazarlar tarafından yayınlanan sonuçlarla tutarlıdır (Kim *et al.* 2022).

Çalışmamızda, idrar örneklerinden elde edilen *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal direncine baktığımızda piperasilin/tikarsilin (%78) ve trimetoprim-sülfametoksazole (%58) karşı daha yüksek direnç oranları saptanmıştır. Öte yandan en düşük direnç imipenem (%12) ve amikasine (%24) karşı gözlenmiştir.

Mortazavi-Tabatabaei ve arkadaşlarının 2019 yılında idrar yolu enfeksiyonlarında antibakteriyel direnç modeli üzerine İran'ın farklı bölgelerinden yayınlanan toplam 90

araştırmanın dahil edildiği sistematik bir meta analiz incelemesinde en etkili antimikrobiyal ajanın imipenem olduğu tespit edilmiştir (Mortazavi-Tabatabaei *et al.* 2019). Benzer şekilde Tayvan, Güney Kore, Hindistan, Suudi Arabistan ve Türkiye’de yapılan çalışmalarda da *E. coli* izolatlarının %90’ından fazlasının imipenem’e karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir (Chen *et al.* 2013, Lee *et al.* 2013, Gales *et al.* 2002, Yolbas *et al.* 2013). Bu sonuçlar, imipenem’in *E. coli* gibi önemli patojenlerin tedavisinde etkili bir seçenek olduğunu göstermektedir. Ancak, imipenem gibi güçlü bir antibiyotik sıklıkla kullanılması, direnç gelişimine de katkıda bulunabilir. Bu nedenle, antimikrobiyal direncin önlenmesi için uygun antibiyotik kullanımı çok önemlidir. Antibiyotik kullanımının uygun olmayan şekilde kullanılması, antimikrobiyal direncin artmasına ve tedavi seçeneklerinin azalmasına neden olabilir.

P. mirabilis, üriner sistem enfeksiyonlarının en sık nedenlerinden biridir ve ürolitiazisli hastalarda enfeksiyon oluşma riski daha yüksektir. Bu bakteri, idrar pH’sını yükseltme yeteneğine sahiptir ve bu da üreaz enzimi aracılığıyla sağlanır. Üreaz, idrardaki üre moleküllerini parçalayarak amonyak ve karbondioksit açığa çıkarır. Bu işlem sonucunda, idrar pH’sı yükselir ve böylece çökelme yapma potansiyeli yüksek olan minerallerin kristalleşmesi ve taş oluşumu artar (Armbruster *et al.* 2018).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre, izole edilen *P. mirabilis* kökenlerinde en yüksek direnç oranının %59 ile minosikline ait olduğu saptandı. Siprofloksasin (%55) ve trimetoprim-sülfametoksazol (%52) da yüksek direnç oranları bulundu. En düşük direnç oranı ise %18 ile imipeneme karşı gözlemlendi ve bu antibiyotik, *P. mirabilis* suşlarına karşı en etkili ajanlardan biri olarak belirlendi.

P. mirabilis İYE’lerin en önemli etiyolojik faktörlerindendir ve belirli antibiyotiklere karşı yüksek seviyede direnç gösterdiği bilinmektedir. Örneğin, yapılan bazı çalışmalar, tetrasiklin, polimiksinler ve kinolonlar gibi bazı yaygın antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiğini göstermektedir (Adamus-Bialek *et al.* 2013). Çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında farklılıklar olsa da araştırmamızın sonuçları genel olarak literatürde bulunan diğer çalışmaların bulgularıyla uyumludur.

P. mirabilis'in ürettiği bazı enzimler, antibiyotiklerin etkisini azaltabilir veya tamamen ortadan kaldırabilir. Bu enzimler arasında beta-laktamazlar, aminoglikozidler ve sülfonamidlerin etkisini azaltan dihidrofolat redüktaz gibi enzimler yer alır (Armbruster *et al.* 2018). *P. mirabilis*'in antibiyotik direnci, tedavi seçeneklerini sınırlayarak enfeksiyonların kontrolünü zorlaştırabilir. Bu nedenle, antibiyotik direncinin sıkı takibi ve yönetimi oldukça önemlidir.

Bakterilerin idrar yolu enfeksiyonlarına neden olma mekanizmalarından biri de biyofilm oluşumudur. Biyofilm, bakterilerin bir araya gelerek oluşturdukları çok katmanlı bir yapıdır ve birçok bakteri türü için enfeksiyon oluşturabilme yeteneğinin önemli bir faktörüdür. Biyofilm oluşumu, bakterilerin hücre yüzeylerine bağlanarak polisakkarit matrisi ile kaplanması ile gerçekleşir (Boroumand *et al.* 2019, Zhao *et al.* 2020).

Biyofilm oluşumu; bakterilerin enfeksiyonlara neden olan virülans faktörlerini etkileyerek, antimikrobiyal dirençlerini artırarak ve immün yanıtları baskılayarak enfeksiyonları sürdürmelerine yardımcı olur. Bu oluşum, antimikrobiyal tedaviyi zorlaştırır ve iyileşmesi zor kronik enfeksiyonlara neden olabilir. İdrar yolu enfeksiyonlarında da biyofilm oluşumu önemli bir faktördür ve tedavi sırasında dikkate alınması gereken bir unsurdur (Tenke *et al.* 2012).

Çalışmamızdan izole edilen 36 *E. coli* izolatından 16'sının üretim gücü yüksek, 11'inin orta düzeyde, 5'inin zayıf biyofilm oluşturma kapasitesinin olduğu saptandı. *E. coli* izolatlarının 4 (%11)'ünde ise biyofilm oluşumu tespit edilemedi. Irak'ta yürütülen başka bir araştırmanın sonuçlarına baktığımızda, *E. coli* izolatlarının %93 oranla biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır. Biyofilm oluşturan kökenleri gruplara ayırdıklarında; güçlü biyofilm üreten 19 (%34) izolatın olduğu, bunu orta derecede biyofilm üreten 25 (%45) izolat ve zayıf biyofilm üreten 12 (%21) izolatın takip ettiği bildirilmektedir (Jaber and Aal Owaif 2020). İran'da üropatojenik *E. coli* izolatlarında biyofilm oluşumu üzerine yapılan başka bir araştırmanın bulgularına göre %92 oranında biyofilm varlığı pozitif olarak tespit edilmiştir (Fattahi *et al.* 2015). Irak'ta yapılan başka bir araştırmanın bulgularına göre, izolatların % 90'ı biyofilm oluşturma potansiyeline sahipti (Makia *et al.* 2013). Davari Abad ve arkadaşları, *E. coli* kökenlerinde biyofilm

oluşumunun izolatların %93'ünden fazlasında görüldüğü, izolatların %13'ünün güçlü, %6'sının orta ve %75'inin zayıf biyofilm üretme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Davari Abad *et al.* 2019).

P. mirabilis kökenlerinin biyofilm oluşturma yeteneği, son yıllarda araştırmacıların yoğun ilgi gösterdiği bir konudur. Biyofilm oluşumu, *P. mirabilis* için önemli bir virülans faktörüdür. Bu sayede yaygın komplike idrar yolu enfeksiyonlarına neden olurlar. *P. mirabilis* kökenleri, idrar yolu enfeksiyonlarına neden olabilen birçok virülans faktörüne sahiptir. Bunlar arasında üreaz enzimi, biyofilm oluşumu, flagella ve pili adı verilen yapılardaki hareket kabiliyeti yer alır. Üreaz enzimi, üre moleküllerini amonyağa ve karbondioksite dönüştürür. Bu reaksiyon sonucunda üriner pH yükselir ve idrar alkali hale gelir. Bu alkali ortam, *P. mirabilis* kökenlerinin biyofilm yapısı geliştirilmesinde önemli bir rol oynar (Wasfi *et al.* 2020, Kwiecinska-Piróg *et al.* 2015).

Tabatabaei ve arkadaşları, idrar yolu enfeksiyonlu hastalardan izole ettikleri *P. mirabilis* suşlarının yarısının biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre, bu izolatların %25'i güçlü biyofilm oluşturabilen, %13'ü orta düzeyde biyofilm oluşturabilen ve %12'si ise zayıf biyofilm oluşturabilen suşlar olarak sınıflandırılmıştır (Tabatabaei *et al.* 2021). Benzer şekilde, Irak ve Polonya'da yapılan çalışmalar idrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen tüm *Proteus* izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Qaddoorri *et al.* 2015, Kwiecinska-Piróg *et al.* 2015).

Çalışmamızda, izole edilem 17 *P. mirabilis* kökeninin 10 (%58,8)'unda yüksek düzeyde biyofilm kapasitesi tespit edilmiştir. Bu izolatlar, yoğun bir şekilde biyofilm oluşturabilen bakteri türleri olarak değerlendirilmiştir. Diğer yandan, 4 (%23,5)'ünde orta düzeyde biyofilm kapasitesi tespit edilmiş ve 2 (%11,8)'sinde ise biyofilm oluşumu zayıf bulunmuştur. Bu izolatlar, daha az yoğun bir biyofilm oluşturabilen bakteri türleri olarak sınıflandırılmıştır. *P. mirabilis* izolatlarının 1 (%5,9)'inde ise biyofilm oluşumu tespit edilememiştir. Çalışmamızın sonuçları literatürdeki *P. mirabilis* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneğini saptayan araştırma bulgularıyla uyumluluk göstermektedir.

P. mirabilis'in benzersiz biyofilm oluşturma yeteneği sayesinde enfeksiyonları kolaylıkla sürdürülebildiği düşünülebilir. Bu durum, konakçının güçlü bağışıklık yanıtına rağmen bakterinin nasıl bu denli enfeksiyonlara sebep olabildiğini anlamamıza yardımcı olabilir.

Bakteri hücrelerinin üriner sisteme bağlanmasında ve biyofilm gelişiminde çeşitli adezyon faktörleri görev almaktadır. Birçok virülans faktörü, özellikle üropatojenik *E. coli* (UPEC) olarak adlandırılan bu suşların patojenitesine katkıda bulunur. İYE patogeneğinde önemi bilinen virülans faktörleri arasında *foc* (F1C fimbriyaları) ve *sfa* (S fimbriyal adezin) gibi proteinler önemli bir rol oynamaktadır. Bu fimbriyal adezinler, bakterilerin ökaryotik hücrelere bağlanmasını sağlarlar (Johnson 1991, Bahalo *et al.* 2013, Lee *et al.* 2016).

Sonuçlarımız, ürolitiazisli hastalardan izole edilen *E. coli* suşlarının 24 (%66,7)'ünde *foc* geni, 20 (%55,6)'sinde ise *sfa* geni olduğunu ortaya çıkardı. Bu bulgular, saptadığımız virülans genlerinin İYE gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Çeşitli çalışmalar, *E. coli*'nin neden olduğu İYE patofizyolojisinde yer alan adezyon moleküllerini kodlamada *sfa* ve *foc* genlerinin rolünü bildirmiştir (Usein *et al.* 2001, Davari Abad *et al.* 2019). İran'da yapılan başka bir araştırmanın bulguları, İYE'den muzdarip bireylerden elde edilen *E. coli* suşlarının oldukça yüksek bir *sfa* ve *foc* gen sıklığı içerdiğini göstermektedir (Zamani and Salehzadeh, 2018). Benzer şekilde İYE olan hastalardan izole edilen UPEC suşlarında *foc* geni için %16 ve *sfa* geni için %81 oranında yaygınlık bildirildi (Rahdar *et al.* 2015).

E. coli'nin *sfa* operonu, S fimbriya olarak bilinen mannoza dirençli adezyonları kodlamaktan sorumludur. Bununla birlikte, S fimbria varlığı ile *E. coli* izolatlarının virülansı arasında bir korelasyon olduğu bildirilmiştir. Patojenik *E. coli* izolatları, hemaglutinasyon yapmayan bir adezyon faktörü olarak tanımlanan F1C fimbriyasını sergileyen tek suşlardır. F1C fimbriyalarının biyosentezinin gerçekleşmesi için *foc* adı verilen sekiz gen topluluğu gereklidir (Emody *et al.*, 2003). Araştırmamızın bulgularına göre, *E. coli* izolatlarından oluşan biyofilmler arasında virülans genlerin dağılımına baktığımızda; güçlü biyofilm oluşturan izolatların 10'unda, orta düzeyde biyofilm oluşturan izolatların 7'sinde ve zayıf biyofilm oluşturan izolatların 3'ünde *sfa* geni

saptanmıştır. Tespit edilen *foc* geni ise güçlü, orta ve zayıf biyofilm oluşturma kapasitesine sahip *E. coli* kökenlerine ait sırasıyla 14, 8 ve 2 izolatta bulunmuştur. Zamani ve Salehzadeh tarafından yapılan bir çalışmada, biyofilm oluşturma kapasiteleri arasında *foc* geninin frekansında fark edilebilir bir değişiklik gözlenmemiştir. Öte yandan, orta ve güçlü biyofilmler üreten izolatlarda *sfa* geninin daha yüksek bir prevalansa sahip olduğu gözlemlendi (Zamani and Salehzadeh, 2018). Daha güçlü bir biyofilm oluşturma kapasitesi ile çeşitli virülans genleri arasında bir ilişki olduğu, özellikle *sfa* ve *foc* genlerinin bu oluşumda kritik bir rol oynadığını bildirilmektedir (Wang *et al.*, 2013). Bu sonuçlar, İYE'den muzdarip hastalardan elde edilen *E. coli* izolatlarının biyofilm gelişiminin erken aşamalarında *sfa* ve *foc* genlerinin adezyonu arttırarak kritik bir rol oynadığını göstermektedir.

Çalışmamızda izole ettiğimiz *P. mirabilis* suşlarının 12 (%70,6)'sinde *pmfA* geni, 10 (%58,8)'unda *mrpA* geni saptanmıştır. Brezilya'da İYE olan hastalardan izole edilen *P. mirabilis* suşlarında virülans genlerinin araştırıldığı bir çalışmada, incelenen tüm izolatların *mrpA* ve *pmfA* genleri açısından pozitif olduğu bildirilmiştir (de Oliveira *et al.*, 2021). Ali ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmaya göre, İYE'li hastalardan izole edilen *P. mirabilis* suşların %38'inin *mrpA* ve %46'sının *pmfA* geni için pozitif olduğu tespit edilmiştir (Ali *et al.*, 2018). Bangladeş'te yapılan bir çalışmada, biyofilm üreten 29 *P. mirabilis* izolatının 10'unda *pmfA* geni saptanırken, 16'sında *mrpA* geni tespit edilmiştir. Mevcut çalışmada *pmfA* ve *mrpA* genlerinin varlığı ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı bir ilişki yoktu (Jabin Mishu *et al.*, 2022). Irak'ta yapılan benzer bir çalışmada da izole edilen *P. mirabilis* suşlarının %41'inde *pmfA* geni, %35'inde *mrpA* geni saptanmıştır (Abbas *et al.*, 2015). İran'da yapılan bir çalışmada ise İYE ile başvuran hastalardan izole edilen *P. mirabilis* suşlarının tamamında *pmfA* geni bulunurken, %90'ında *mrpA* geni saptanmıştır. Bu bulgular, *pmfA* ve *mrpA* genlerinin *P. mirabilis* suşlarında yaygın olarak bulunabileceğini ve virülans özellikleri ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Farklı araştırmalar tarafından rapor edilen gen yaygınlık oranlarının değişkenlik gösterdiği gözlemlenmektedir (Hussein *et al.*, 2020). Bu farklılıklar muhtemelen, genlerin dağılımında çalışılan popülasyonlar ve coğrafi konumlar arasında

değişkenliklerden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte genel olarak bakıldığında, çalışmamızın sonuçları literatürde bildirilen *pmfA* ve *mrpA* genlerinin *P. mirabilis*'in İYE'deki virülansı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, insanlardan izole edilen *P. mirabilis* suşlarında biyofilm oluşumu ile çeşitli virülans faktörleri arasında bir korelasyon olduğunu bildirmiştir. *P. mirabilis*'in biyofilm üretme kapasitesi büyük ölçüde *mrpA*, *pmfA* ve diğer genlerin ifadesiyle bağlantılıdır. Bakterilerin birbirine adezyonu ve kümelenmesi, biyofilmlerin oluşturulmasında gerekli bir adımdır (Stickler *et al.*, 1993, Jansen *et al.*, 2004). Ayrıca *mrpA* geninin bakterilerin tutunmasında ve birleşmesinde rolü olduğu ileri sürülmüştür (Barbour *et al.*, 2012).

Çalışmamızın sonuçlarına göre, izole ettiğimiz *P. mirabilis* suşlarının biyofilm oluşturma kapasitesi ile virülans genlerinin birlikteliğine baktığımızda; güçlü biyofilm oluşturan 10 izolatın 6'sında, orta düzeyde biyofilm oluşturan izolatın 4'ünde, zayıf biyofilm oluşturan 2 izolatın ise 1'inde *pmfA* geni saptandı. Ayrıca, güçlü biyofilm oluşturan 10 izolatın 6'sında, orta düzeyde biyofilm oluşturan 4 izolatın 3'ünde, zayıf biyofilm oluşturan 2 izolatın ise 1'inde *mrpA* geni tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturmayan bir izolatta ise *mrpA* geni tespit edilememiştir.

Ürolitiazis ile ilişkili idrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan alınan idrar örneklerinde *E. coli* ve *P. mirabilis* gibi patojenlerin yüksek bir prevalansa sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, *E. coli* ve *P. mirabilis*'in böbrek taşı gelişen İYE'lerin en sık nedenleri olduğunu göstermektedir.

İzole edilen kökenlerin yüksek antibiyotik direnci, bu bakterilerin tedaviye karşı dirençli olmalarına neden olan birçok mekanizmaya sahip olabileceğini göstermektedir. İYE ve böbrek taşı oluşumunun tekrarlamasının başlıca nedenleri arasında yüksek antibiyotik dirençli *E. coli* ve *P. mirabilis* izolatlarının bulunması yer almaktadır. Bu bakterilerin, yüksek antibiyotik direnci sayesinde tedavilere yanıt verememeleri ve enfeksiyonların tekrarlayarak kronikleşmesine sebep olmaları mümkündür.

İzole edilen patojenlerin çoğunluğunun biyofilm oluşturma eğiliminde olması, bu bakterilerin konakçı immün yanıtına karşı yüksek oranda patojenik olma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Biyofilm oluşumu ayrıca, bakterilerin antibiyotik tedavisine karşı direnç kazanmalarına da katkıda bulunabilir. Bu nedenle, biyofilm oluşturma eğilimine sahip olan bakterilerin neden olduğu İYE'lerinin tedavisi zorlu olabilir ve tekrarlama riski artabilir.

Biyofilm oluşturan izolatlar arasında *foc*, *sfa*, *mrpA* ve *pmfA* gibi virülans genlerinin yaygınlığı, söz konusu izolatların patofizyolojisi ve direnci için önemli bir rol oynadığını göstermiştir.

Bu çalışmada, ürolitiazis ile ilişkili idrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan alınan idrar örneklerinde *E. coli* ve *P. mirabilis* gibi patojenlerin yüksek prevalansa sahip olduğu belirlenmiştir. Bu patojenlerin yüksek antibiyotik direncine sahip olmaları, tedavi seçeneklerini sınırlayarak enfeksiyonların tekrarlanmasına ve kronikleşmesine neden olabilir. Ayrıca, biyofilm oluşturma eğilimi gösteren bu bakterilerin antibiyotik tedavisine karşı direnç kazanmaları da tedavileri zorlaştırabilir.

Sonuç olarak, antibiyotik direnci ve biyofilm oluşumu açısından yüksek riskli patojenlerin belirlenmesi ve bu patojenlere karşı etkili tedavilerin geliştirilmesi önemlidir. Çalışmamızın sonuçları, ürolitiazis ile ilişkili İYE'lerin tedavisinde, özellikle *E. coli* ve *P. mirabilis* gibi patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tekrarlanmasını önlemek için uygun antibiyotik seçiminin önemini vurgulamaktadır. Böbrek taşı oluşumunda rol oynayan ve biyofilm oluşturma eğilimi gösteren patojenlerin sahip olduğu virülans genlerinin mekanizmasını ve rolünü anlamak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Abbas, K. H., Al Khafaji, J. K. and Al-Shukri, M. S. 2015. Molecular Detection of Some Virulence Genes in *Proteus Mirabilis* Isolated from Hillaprovence. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 3(10): 86–90.
- Adamus-Bialek, W., Zajac, E., Parniewski, P. and Kaca, W. 2013. Comparison of antibiotic resistance patterns in collections of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* uropathogenic strains. *Molecular Biology Reports*, 40(4): 3429–3435.
- Agarwal, R. K., Singh, S., Bhilegaonkar, K. N. and Singh, V. P. 2011. Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. *International Food Research Journal*, 18(4): 1493.
- Aggarwal, K. P., Narula, S., Kakkar, M. and Tandon, C. 2013. Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. *BioMed Research International*, 2013: 292953.
- Ahmed, A. E., Abol-Enein, H., Awadalla, A., El degla, H. and El-Shehaby, O. A. 2022. Investigation of Virulence Genes of the Predominant Bacteria Associated with Renal Stones and their Correlation with Postoperative Septic Complications. *Infection and Drug Resistance*, 15: 3643-3655.
- Ait-Mimoune, N., Hassaine, H. and Boulanoir, M. 2022. Bacteriological profile of urinary tract infections and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* in Algeria. *Iranian Journal of Microbiology*, 14(2), 156–160.
- Al Benwan, K., Al Sweih, N. and Rotimi, V. O. 2010. Etiology and antibiotic susceptibility patterns of community-and hospital-acquired urinary tract infections in a general hospital in Kuwait. *Medical Principles and Practice*, 19(6): 440–446.
- Ali, A., Abid, A. J. and Abbas, F. M. 2018. Molecular assessments of *Proteus mirabilis* virulence factors isolated from urinary tract infection patients. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 10(4).
- Al-Jalawee, A. H. H. and Durdagi, S. 2021. A comparison of techniques for analyzing and studying kidney stones and their accuracy in determining the most likely phases of common stones among patients: a review. *Journal of Engineering Research and Applied Science*, 10(2): 1919–1928.

- Al-Jebouri, M. M. and Mdish, S. A. 2013. Antibiotic resistance pattern of bacteria isolated from patients of urinary tract infections in Iraq. *Open Journal of Urology*, 3:124-131.
- Alonzo, D. E., Raina, S., Zhou, D., Gao, Y., Zhang, G. G. Z. and Taylor, L. S. 2012. Characterizing the impact of hydroxypropylmethyl cellulose on the growth and nucleation kinetics of felodipine from supersaturated solutions. *Crystal Growth and Design*, 12(3): 1538–1547.
- Anderl, J. N., Franklin, M. J. and Stewart, P. S. 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7): 1818–1824.
- Ansari, H., Sepahi, A. A. and Sepahi, M. A. 2017. Different Approaches to Detect “Nanobacteria” in Patients with Kidney Stones: an Infectious Cause or a Subset of Life? *Urology Journal*, 14(5): 5001–5007.
- Armbruster, C. E., Mobley, H. L. T. and Pearson, M. M. 2018. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus*, 8(1):10.1128.
- Bahalo, S., E, T., S, T., M, M. and F, T. 2013. Detection of some virulence factors of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection isolated of children in Shahrekord Iran by multiplex PCR. *Middle East Journal of Scientific Research*, 14(1): 29–32.
- Bakterij, A. (2014). An overview of the influence of stainless-steel surface properties on bacterial adhesion. *Mater. Tehnol*, 48: 609–617.
- Baldassarri, L., Cecchini, R., Bertuccini, L., Ammendolia, M. G., Iosi, F., Arciola, C. R., Montanaro, L., Di Rosa, R., Gherardi, G. and Dicuonzo, G. 2001. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Medical Microbiology and Immunology*, 190(3): 113–120.
- Barbour, E. K., Hajj, Z. G., Hamadeh, S., Shaib, H. A., Farran, M. T., Araj, G., Faroon, O., Barbour, K. E., Jirjis, F. and Azhar, E. 2012. Comparison of phenotypic and virulence genes characteristics in human and chicken isolates of *Proteus mirabilis*. *Pathogens and Global Health*, 106(6): 352–357.
- Basavaraj, D. R., Biyani, C. S., Browning, A. J. and Cartledge, J. J. 2007. The role of urinary kidney stone inhibitors and promoters in the pathogenesis of calcium containing renal stones. *EAU-EBU Update Series*, 5(3): 126–136.

- Bauza, J. L., Pieras, E. C., Grases, F., Tubau, V., Guimerà, J., Sabaté, X. A. and Pizà, P. 2018. Urinary tract infection's etiopathogenic role in nephrolithiasis formation. *Medical Hypotheses*, 118, 34–35.
- Bischoff, K. and Rumble, W. K. 2012. Pet food recalls and pet food contaminants in small animals. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 42(2): 237–250.
- Biyani, C. S. and Cartledge, J. J. 2006. Cystinuria—diagnosis and management. *EAU-EBU Update Series*, 4(5): 175–183.
- Boroumand, M., Sharifi, A., Manzouri, L., Khoramrooz, S. S. and Khosravani, S. A. 2019. Evaluation of pap and sfa Genes Relative Frequency P and S Fimbriae Encoding of Uropathogenic Escherichia coli Isolated from Hospitals and Medical Laboratories; Yasuj City, Southwest Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 21(8).
- Brikowski, T. H., Lotan, Y. and Pearle, M. S. 2008. Climate-related increase in the prevalence of urolithiasis in the United States. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(28): 9841–9846.
- Chen, D., Zhang, Y., Huang, J., Liang, X., Zeng, T., Lan, C., Duan, X., Zhao, Z., Zeng, G. and Tiselius, H. 2018. The analysis of microbial spectrum and antibiotic resistance of uropathogens isolated from patients with urinary stones. *International Journal of Clinical Practice*, 72(6): e13205.
- Chen, L. F., Chiu, C. T., Lo, J. Y., Tsai, S. Y., Weng, L. S., Anderson, D. J. and Chen, H. S. 2013. Clinical Characteristics and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Hospitalized Patients with Community Acquired Urinary Tract Infections at a Regional Hospital in Taiwan. *Healthcare Infection*, 19(1), 20–25.
- Chhiber, N., Sharma, M., Kaur, T. and Singla, S. 2014. Mineralization in health and mechanism of kidney stone formation. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 3: 25–31.
- Choudhary, A., Kumar, M., Gupta, M. K., Unune, D. K. and Mia, M. 2020. Mathematical modeling and intelligent optimization of submerged arc welding process parameters using hybrid PSO-GA evolutionary algorithms. *Neural Computing and Applications*, 32(10): 5761–5774.

- Çiftçioglu, N., Björklund, M., Kuorikoski, K., Bergström, K. and Kajander, E. O. 1999. Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation. *Kidney International*, 56(5): 1893–1898.
- Conlon, B. P., Nakayasu, E. S., Fleck, L. E., LaFleur, M. D., Isabella, V. M., Coleman, K., Leonard, S. N., Smith, R. D., Adkins, J. N. and Lewis, K. 2013. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature*, 503(7476): 365–370.
- Cornelius, J. G. and Peck, A. B. 2004. Colonization of the neonatal rat intestinal tract from environmental exposure to the anaerobic bacterium *Oxalobacter formigenes*. *Journal of Medical Microbiology*, 53(3): 249–254.
- Cortés, M. E., Bonilla, J. C. and Sinisterra, R. D. 2011. Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. *Sci Against Microbial Pathog Commun Curr Res Technol Adv*, 2: 896–905.
- Cunningham, P., Noble, H., Al-Modhefer, A.-K. and Walsh, I. 2016. Kidney stones: pathophysiology, diagnosis and management. *British Journal of Nursing*, 25(20): 1112–1116.
- Daudon, M., Doré, J.-C., Jungers, P. and Lacour, B. 2004. Changes in stone composition according to age and gender of patients: a multivariate epidemiological approach. *Urological Research*, 32(3): 241–247.
- Daudon, M., Petay, M., Vimont, S., Deniset, A., Tielens, F., Haymann, J.-P., Letavernier, E., Frochot, V. and Bazin, D. 2022. Urinary tract infection inducing stones: Some clinical and chemical data. *Comptes Rendus. Chimie*, 25(S1): 315–334.
- Davari Abad, E., Khameneh, A. and Vahedi, L. 2019. Identification phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections and their antibiotics resistance. *BMC Research Notes*, 12(1): 1–7.
- de Oliveira, W. D., Barboza, M. G. L., Faustino, G., Inagaki, W. T. Y., Sanches, M. S., Kobayashi, R. K. T., Vespero, E. C. and Rocha, S. P. D. 2021. Virulence, resistance and clonality of *Proteus mirabilis* isolated from patients with community-acquired urinary tract infection (CA-UTI) in Brazil. *Microbial Pathogenesis*, 152: 104642.

- Devarajan, A. 2018. Cross-talk between renal lithogenesis and atherosclerosis: an unveiled link between kidney stone formation and cardiovascular diseases. *Clinical Science*, 132(6): 615–626.
- Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9): 881.
- Emody, L., Kerényi, M. and Nagy, G. 2003. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22 Suppl 2: 29–33.
- Espinosa-Ortiz, E. J., Eisner, B. H., Lange, D. and Gerlach, R. 2019. Current insights into the mechanisms and management of infection stones. *Nature Reviews. Urology*, 16(1): 35–53.
- Evan, A. P. 2010. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. *Pediatric Nephrology*, 25(5): 831–841.
- Falony, G. 2018. Beyond *Oxalobacter*: the gut microbiota and kidney stone formation. *Gut*, 67(12): 2078–2079.
- Fathallah-Shaykh, S. A. and Cramer, M. T. 2014. Uric acid and the kidney. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*: 29(6): 999–1008.
- Fattahi, S., Kafil, H. S., Nahai, M. R., Asgharzadeh, M., Nori, R. and Aghazadeh, M. 2015. Relationship of biofilm formation and different virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Northwest Iran. *GMS Hygiene and Infection Control*, 10: Doc11.
- Fink, H. A., Wilt, T. J., Eidman, K. E., Garimella, P. S., MacDonald, R., Rutks, I. R., Brasure, M., Kane, R. L., Ouellette, J. and Monga, M. 2013. Medical management to prevent recurrent nephrolithiasis in adults: a systematic review for an American College of Physicians Clinical Guideline. *Annals of Internal Medicine*, 158(7): 535–543.
- Finlayson, B. 1978. Physicochemical aspects of urolithiasis. *Kidney International*, 13(5): 344–360.
- Flannigan, R., Choy, W. H., Chew, B. and Lange, D. 2014. Renal struvite stones—pathogenesis, microbiology, and management strategies. *Nature Reviews Urology*, 11(6): 333–341.

- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M. and Hultgren, S. J. 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(5): 269–284.
- Gabriels, G., Lambert, M., Smith, P., Wiesner, L. and Hiss, D. 2015. Melamine contamination in nutritional supplements-Is it an alarm bell for the general consumer, athletes, and ‘Weekend Warriors’? *Nutrition Journal*, 14(1): 1–7.
- Gales, A. C., Sader, H. S., Jones, R. N. and SENTRY Participants Group (Latin America) 2002. Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 44(3), 289–299.
- García, A. B. and Percival, S. L. 2011. Zoonotic infections: the role of biofilms. In *Biofilms and veterinary medicine*, pp. 69–110, Springer.
- Giannossi, M. L. and Summa, V. 2012. A review of pathological biomineral analysis techniques and classification schemes. *An Introduction to the Study of Mineralogy*, 123–146.
- Girmaye, D., Abdeta, D. and Tamiru, Y. 2018. Review on Bacterial Biofilms and its impact. *Int. J. Adv. Microbiol. Health. Res*, 2(3): 22–30.
- Gu, J., Song, P., Chen, X., Yang, Z., Zhang, X. and Bai, Y. 2022. Comparative study of the bacterial distribution and antimicrobial susceptibility of uropathogens in older and younger patients with urinary stones. *BMC Geriatrics*, 22(1): 195.
- Ha, Y.-S., Tcheu, D.-U., Kang, H. W., Kim, Y.-J., Yun, S.-J., Lee, S.-C. and Kim, W.-J. 2010. Phosphaturia as a promising predictor of recurrent stone formation in patients with urolithiasis. *Korean Journal of Urology*, 51(1): 54–59.
- Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, 11(7): 1034–1043.
- Hall-Stoodley, L., Hu, F. Z., Gieseke, A., Nistico, L., Nguyen, D., Hayes, J., Forbes, M., Greenberg, D. P., Dice, B. and Burrows, A. 2006. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *Jama*, 296(2): 202–211.
- Hamamoto, S., Taguchi, K. and Fujii, Y. 2011. Molecular mechanism of renal stone formation. *Clinical Calcium*, 21(10): 1481–1487.

- Heilberg, I. P. and Goldfarb, D. S. 2013. Optimum nutrition for kidney stone disease. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 20(2): 165–174.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. and Ciofu, O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4): 322–332.
- Hussein, E. I., Al-Batayneh, K., Masadeh, M. M., Dahadhah, F. W., Al Zoubi, M. S., Aljabali, A. A. and Alzoubi, K. H. 2020. Assessment of Pathogenic Potential, Virulent Genes Profile, and Antibiotic Susceptibility of *Proteus mirabilis* from Urinary Tract Infection. *International Journal of Microbiology*, 2020: 1231807.
- Jaber, A. M. and Aal Owaif, H. A. 2020. Detection Of Genes Involved In Biofilms Formation By *Escherichia Coli* Isolated From Patients Suffering Of Urinary Tract Infections. *Plant Archives*, 20(2): 5987–5992.
- Jabin Mishu, N., SM, S., HM, K., Nabonee, M. A., zannat dola, N. and Haque, A. 2022. Association between Biofilm Formation and Virulence Genes Expression and Antibiotic Resistance Pattern in *Proteus mirabilis*, Isolated from Patients of Dhaka Medical College Hospital. *Archives of Clinical and Biomedical Research*, 06(03).
- Jalil, M. B. and Al Atbee, M. Y. N. (2022). The prevalence of multiple drug resistance *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with urinary tract infections. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(9), e24619.
- Jansen, A. M., Lockatell, V., Johnson, D. E. and Mobley, H. L. T. 2004. Mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract, dictate the in vivo localization of bacteria, and contribute to biofilm formation. *Infection and Immunity*, 72(12): 7294–7305.
- Johnson J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1): 80–128.
- Kajander, E. O., Ciftcioglu, N., Aho, K. and Garcia-Cuerpo, E. 2003. Characteristics of nanobacteria and their possible role in stone formation. *Urological Research*, 31(2): 47–54.
- Karki, N. and Leslie, S. W. 2023. Struvite And Triple Phosphate Renal Calculi. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Khan, S. R. 2010. Nephrocalcinosis in animal models with and without stones. *Urological Research*, 38(6): 429–438.

- Khan, S. R., Pearle, M. S., Robertson, W. G., Gambaro, G., Canales, B. K., Doizi, S., Traxer, O. and Tiselius, H.-G. 2016. Kidney stones. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2: 16008.
- Khan, S. R., Pearle, M. S., Robertson, W. G., Gambaro, G., Canales, B. K., Doizi, S., Traxer, O. and Tiselius, H.-G. 2017. Kidney stones. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3: 17001.
- Kim, B., Kim, J. H. and Lee, Y. 2022. Virulence Factors Associated with *Escherichia coli* Bacteremia and Urinary Tract Infection. *Annals of Laboratory Medicine*, 42(2), 203–212.
- Kwiecinska-Piróg, J., Bogiel, T., Skowron, K., Wieckowska, E. and Gospodarek, E. 2015. *Proteus mirabilis* biofilm - qualitative and quantitative colorimetric methods-based evaluation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4): 1423–1431.
- Lee, D. S., Choe, H. S., Lee, S. J., Bae, W. J., Cho, H. J., Yoon, B. I., Cho, Y. H., Han, C. H., Jang, H., Park, S. B., Cho, W. J. and Lee, S. J. 2013. Antimicrobial susceptibility pattern and epidemiology of female urinary tract infections in South Korea, 2010-2011. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5384–5393.
- Lee, J. H., Subhadra, B., Son, Y., Kim, D. H., Park, H. S., Kim, J. M., Koo, S. H., Oh, M. H., Kim, H. and Choi, C. H. 2016. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Letters in Applied Microbiology*, 62(1): 84–90.
- Loo, C. Y. 2003. Oral streptococcal genes that encode biofilm formation. *Medical Implications of Biofilms*, 1: 212–227.
- Lynch, A. S. and Robertson, G. T. 2008. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annual Review of Medicine*, 59(1): 415–428.
- Mah, T. F. C. and O'Toole, G. A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1): 34–39.
- Maione, D., Margarit, I., Rinaudo, C. D., Massignani, V., Mora, M., Scarselli, M., Tettelin, H., Brettoni, C., Iacobini, E. T. and Rosini, R. 2005. Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen. *Science*, 309(5731): 148–150.

- Makia, R. S., Fadhil, A. M. A. and Ismail, M. C. 2013. Biofilm production as a virulence factor in Uropathogenic bacteria and yeasts. *Journal of Biotechnology Research Center*, 7(1): 29–34.
- Marien, T. and Miller, N. L. 2015. Treatment of the infected stone. *Urologic Clinics*, 42(4): 459–472.
- Martel, J., Peng, H.-H., Young, D., Wu, C.-Y. and Young, J. D. 2014. Of nanobacteria, nanoparticles, biofilms and their role in health and disease: facts, fancy and future. *Nanomedicine*, 9(4): 483–499.
- Miano, R., Germani, S. and Vespasiani, G. 2007. Stones and urinary tract infections. *Urologia Internationalis*, 79(Suppl. 1): 32–36.
- Morgan, M. S. C. and Pearle, M. S. 2016. Medical management of renal stones. *Bmj*, 352.
- Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X. and Huang, T. 2020. Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11: 928.
- Muhsin, J., Ufaq, T., Tahir, H. and Saadia, A. 2015. Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections. *J Microbiol Biotechnol*, 4: 1–14.
- Oder, M., Fink, R., Bohinc, K. and Torkar, K. G. 2017. The influence of shear stress on the adhesion capacity of *Legionella pneumophila*. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 68(2): 109–115.
- Peck, A. B., Canales, B. K. and Nguyen, C. Q. 2016. Oxalate-degrading microorganisms or oxalate-degrading enzymes: which is the future therapy for enzymatic dissolution of calcium-oxalate uroliths in recurrent stone disease? *Urolithiasis*, 44(1): 45–50.
- Portis, A. J. and Sundaram, C. P. 2001. Diagnosis and initial management of kidney stones. *American Family Physician*, 63(7): 1329.
- Puttamreddy, S., Cornick, N. A. and Minion, F. C. 2010. Genome-wide transposon mutagenesis reveals a role for pO157 genes in biofilm development in *Escherichia coli* O157:H7 EDL933. *Infection and Immunity*, 78(6): 2377–2384.
- Qaddoori, S. S., Laftaah, B. A., AbdALgani, M. N., AL-Segar, R. K., Raoof, A. M., Abd-ALKadir, S. S., Ali, Y. J. and HA-Neddawi, T. 2015. Correlation between virulence factor and biofilm formation in *Proteus* spp. *Iraqi Journal of Science*, 56(2C): 1675–1681.

- Rahdar, M., Rashki, A., Miri, H. R. and Ghalehnoo, M. R. 2015. Detection of pap, sfa, afa, foc, and fim adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* isolates collected from patients with urinary tract infection. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(8).
- Rao, V., Ghei, R. and Chambers, Y. 2005. Biofilms research—implications to biosafety and public health. *Applied Biosafety*, 10(2): 83–90.
- Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Goffredo, E., Goga, B. T. C. and Paparella, A. 2016. Influence of Incubation Conditions on Biofilm Formation by *Pseudomonas Fluorescens* Isolated from Dairy Products and Dairy Manufacturing Plants. *Italian Journal of Food Safety*, 5(3): 5793.
- Russell, A. D. 2003. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(5): 750–763.
- Sadaf, H., Raza, S. I. and Hassan, S. W. 2017. Role of gut microbiota against calcium oxalate. *Microbial Pathogenesis*, 109: 287–291.
- Sakhaee, K., Adams-Huet, B., Moe, O. W. and Pak, C. Y. C. 2002. Pathophysiologic basis for normouricosuric uric acid nephrolithiasis. *Kidney International*, 62(3): 971–979.
- Saravanan, R. 2018. Clinical study and management of ureteric calculi in Thanjavur Medical College Hospital. Thanjavur Medical College, Thanjavur.
- Schultz, L. N., Connolly, J., Lauchnor, E., Hobbs, T. A. and Gerlach, R. 2016. Struvite stone formation by ureolytic biofilm infections. In *The Role of Bacteria in Urology* (pp. 41–49). Springer.
- Shi, X. and Zhu, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9): 407–413.
- Shiekh, F. A., Khullar, M. and Singh, S. K. 2006. Lithogenesis: induction of renal calcifications by nanobacteria. *Urological Research*, 34(1): 53–57.
- Shoag, J., Halpern, J., Goldfarb, D. S. and Eisner, B. H. 2014. Risk of chronic and end stage kidney disease in patients with nephrolithiasis. *The Journal of Urology*, 192(5): 1440–1445.
- Siener, R., Netzer, L. and Hesse, A. 2013. Determinants of brushite stone formation: A case-control study. *PloS One*, 8(11): e78996.

- Simões, M., Simões, L. C. and Vieira, M. J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4): 573–583.
- Staff, M. C. 2022. Kidney stones. Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/kidney-stones/symptoms-causes/syc-20355755>.
- Stickler, D., Ganderton, L., King, J., Nettleton, J. and Winters, C. 1993. *Proteus mirabilis* biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Urological research*, 21(6): 407–411.
- Sun, Y., Wen, S., Zhao, L., Xia, Q., Pan, Y., Liu, H., Wei, C., Chen, H., Ge, J. and Wang, H. 2020. Association among biofilm formation, virulence gene expression, and antibiotic resistance in *Proteus mirabilis* isolates from diarrhetic animals in Northeast China. *BMC Veterinary Research*, 16(1): 1–10.
- Tabatabaei, A., Ahmadi, K., Shabestari, A. N., Khosravi, N. and Badamchi, A. 2021. Virulence genes and antimicrobial resistance pattern in *Proteus mirabilis* strains isolated from patients attended with urinary infections to Tertiary Hospitals, in Iran. *African Health Sciences*, 21(4): 1677–1684.
- Tanthanuch, M. 2006. Staghorn calculi in southern Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 89(12), 2086–2090.
- Tattevin, P., Revest, M., Chapplain, J.-M., Ratajczak-Enselme, M., Arvieux, C. and Michelet, C. 2013. Increased risk of renal stones in patients treated with atazanavir. *Clinical Infectious Diseases*, 56(8): 1186.
- Tenke, P., Köves, B., Nagy, K., Hultgren, S. J., Mendling, W., Wullt, B., Grabe, M., Wagenlehner, F. M., Cek, M., Pickard, R., Botto, H., Naber, K. G. and Bjerklund Johansen, T. E. 2012. Update on biofilm infections in the urinary tract. *World Journal of Urology*, 30(1): 51–57.
- Thomas, B. and Tolley, D. 2008. Concurrent urinary tract infection and stone disease: pathogenesis, diagnosis and management. *Nature Clinical Practice Urology*, 5(12): 668–675.
- Ticinesi, A., Milani, C., Guerra, A., Allegri, F., Lauretani, F., Nouvenne, A., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Turrone, F. and Duranti, S. 2018. Understanding the gut–kidney axis in nephrolithiasis: an analysis of the gut microbiota composition and functionality of stone formers. *Gut*, 67(12): 2097–2106.

- Torzewska, A., Budzyńska, A., Białczak-Kokot, M. and Różalski, A. 2014. In vitro studies of epithelium-associated crystallization caused by uropathogens during urinary calculi development. *Microbial Pathogenesis*, 71: 25–31.
- Usein, C. R., Damian, M., Tatu-Chitoiu, D., Capusa, C., Fagaras, R., Tudorache, D., Nica, M. and Le Bouguénec, C. 2001. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 5(3): 303–310.
- Wang, M. C., Tseng, C. C., Wu, A. B., Lin, W. H., Teng, C. H., Yan, J. J. and Wu, J. J. 2013. Bacterial characteristics and glycemic control in diabetic patients with *Escherichia coli* urinary tract infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46(1): 24–29.
- Wang, Z., Zhang, J., Zhang, Y., Zhang, S., Hu, Q. and Liang, H. 2019. Analyses of long non-coding RNA and mRNA profiling using RNA sequencing in calcium oxalate monohydrate-stimulated renal tubular epithelial cells. *Urolithiasis*, 47(3): 225–234.
- Wang, Z., Zhang, Y., Zhang, J., Deng, Q. and Liang, H. 2021. Recent advances on the mechanisms of kidney stone formation. *International Journal of Molecular Medicine*, 48(2): 1–10.
- Wasfi, R., Hamed, S. M., Amer, M. A. and Fahmy, L. I. 2020. *Proteus mirabilis* Biofilm: Development and Therapeutic Strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 414.
- Wayne, P. A. 2010. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. CLSI Document M100-S20.
- Whiteside, S. A., Razvi, H., Dave, S., Reid, G. and Burton, J. P. 2015. The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nature Reviews Urology*, 12(2): 81–90.
- Wright, G. D. 2010. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology*, 8(1): 1–6.
- Wu, J., Tao, Z., Deng, Y., Liu, Q., Liu, Y. and Guan, X. 2019. Calcifying nanoparticles induce cytotoxicity mediated by ROS-JNK signaling pathways. *Urolithiasis*, 47(2): 125–135.

- Ye, Z., Zeng, G., Yang, H., Li, J., Tang, K., Wang, G., Wang, S., Yu, Y., Wang, Y. and Zhang, T. 2020. The status and characteristics of urinary stone composition in China. *BJU International*, 125(6): 801–809.
- Yolbaş, I., Tekin, R., Kelekci, S., Tekin, A., Okur, M. H., Ece, A., Gunes, A. and Sen, V. 2013. Community-acquired urinary tract infections in children: pathogens, antibiotic susceptibility and seasonal changes. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17(7): 971–976.
- Zamani, H. and Salehzadeh, A. 2018. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 48(1): 162–167.
- Zhao, F., Yang, H., Bi, D., Khaledi, A. and Qiao, M. 2020. A systematic review and meta-analysis of antibiotic resistance patterns, and the correlation between biofilm formation with virulence factors in uropathogenic *E. coli* isolated from urinary tract infections. *Microbial Pathogenesis*, 144: 104196.
- Ziemba, J. B. and Matlaga, B. R. 2017. Epidemiology and Economics of Nephrolithiasis. *Investigative and Clinical Urology*, 58: 299-306.

