

T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI GIDALARDAN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARINDA Kİ
ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ VE VİRÜLANS FAKTÖR GENLERİNİN
YAYGINLIĞI VE DAĞILIMININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

CANSU BAŞAK ÖZİŞİK

EKİM 2019

Biyomühendislik Anabilim Dalında Cansu Başak ÖZİŞİK tarafından hazırlanan BAZI GIDALARDAN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARINDA Kİ ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ VE VİRÜLANS FAKTÖR GENLERİNİN YAYGINLIĞI VE DAĞILIMININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Mustafa TÜRK _____

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN _____

Üye : Doç. Dr. Ebru BEYZİ _____

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Recep ÇALIN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

BAZI GIDALARDAN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARINDA Kİ ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ VE VİRÜLANS FAKTÖR GENLERİNİN YAYGINLIĞI VE DAĞILIMININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

ÖZİŞİK, Cansu Başak

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

Ekim 2019, 104 sayfa

Dünya’da ve ülkemizde gıda tüketiminde önemli bir yere sahip olan kırmızı et, tavuk ve peynir gibi besin ürünlerinin tüketicilere sağlıklı bir şekilde ulaşması gıda güvenliği konusu ile yakından ilgilidir. Gıda olarak tüketilen bu besinlerin, hayvanların yaşadıkları ortam, sütlerinin sağılma koşulları ve mezbahadaki kesim işlemlerinden başlayarak paketlenme süreçlerine kadar yapılacak olan tüm işlemler gıda güvenliğini kapsamaktadır. Gıda güvenliği konusunda yeterli önlemler alınmadığı takdirde çeşitli sebeplerden dolayı kontamine olacak olan bu gıdaların tüketilmesi beraberinde birçok hastalığı da getirecektir.

Escherichia coli hayvanların ve insanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunan bir bakteridir. *E. coli*’nin bazı suşları virülans faktör genleri veya antibiyotik direnç genlerine sahiptir. Bu genlerden virülans faktör genleri insanlarda hastalıkların oluşmasına, antibiyotik direnç genleri ise var olan hastalıkların tedavi sürecinin uzamasına ya da hastalıkların tedavisinin engellenmesine sebep olurlar.

Bu çalışmanın amacı Bolu ilinde bulunan çeşitli marketlerden alınan gıda olarak tüketilen et, peynir, kıyma ve tavuk örneklerinden izole edilen 283 *Escherichia coli*

izolatında bulunan antibiyotik direnç genleri ve virülans faktör genlerinin varlığının ve yaygınlığının PCR yöntemi ile moleküler karakterizasyonunun yapılmasıdır.

Elde edilen sonuçlara göre 283 *E. coli* izolatının 172 (%60,78)'sinde *bcsA* virülans faktör geni, 225 (%79,5)'inde *iutA* virülans faktör geni, 13 (%4,6)'ünde *tkt1* virülans faktör geni, 21 (%7,4)'inde *papC* virülans faktör geni, 61 (%21,5)'inde *iss* virülans faktör geni, 125 (%44,1)'inde *tetB* antibiyotik direnç geni, 129 (%45,6)'unda *aac(6')-lb* antibiyotik direnç geni, 108 (%38,2)'inde *bla_{CMY-2}* antibiyotik direnç geni bulunmuştur. Bu izolatlarda *rfbEO157* virülans faktör geni ve *qnrA* antibiyotik direnç genine rastlanmamıştır.

Anahtar kelimeler: *E. coli*, Virülans Faktör Geni, Antibiyotik Direnç Geni, PCR, Jel Elektroforez, Gıda Güvenliği, Kıyma, Tavuk, Et, Peynir

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PREVALENCE AND DISTRIBUTION OF THE ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND VIRULENCE FACTOR GENES IN *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED FROM SOME FOODS

ÖZİŞİK, Cansu Başak

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Bioengineering, M.Sc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

October 2019, 104 pages

The fact that food products such as red meat, chicken and cheese, which take an important place in food consumption in the world and in our country. The food safety of these foods which will be consumed as food includes all factors such as the environment in which the animals live, the milk condition, slaughtering and packaging processes. When adequate precautions are not taken for food safety, consuming these foods will bring many diseases.

Escherichia coli is a bacterium commonly found in the intestines of animals and humans. *E. coli* have virulence genes or antibiotic resistance genes. Among these genes, virulence genes cause diseases in humans and antibiotic resistance genes cause prolongation of treatment of existing diseases or prevent the treatment of diseases.

The aim of this study is to carry out molecular characterization by PCR method of distribution of the antibiotic resistance genes and virulence factor genes in 283 *Escherichia coli* isolates isolated from meat, cheese, mince and chicken samples taken from various markets in Bolu province.

According to the study, *bcsA* virulence gene in 172 (60.78%), *iutA* virulence gene in 225 (79.5%), *tkt1* virulence gene in 13 (4.6%), *papC* virulence gene in 21 (7.4%), *iss* virulence gene in 61 (21.5%), *tetB* antibiotic resistance gene in 125 (44.1%), *aac(6')-lb* antibiotic resistance gene in 129 (45.6%), *bla_{CMY-2}* antibiotic resistance gene in 108 (38.2%) antibiotic resistance genes of 283 *E. coli* isolates were found. The *rfbEO157* virulence gene and the *qnrA* antibiotic resistance gene were not detected in these isolates.

Key words: *E. coli*, Virulence Factor Gene, Antibiotic Resistance Gene, PCR, Gel Electrophoresis, Food Safety, Minced Meat, Meat, Chicken, Cheese



TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danıősam zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli tez danışmanım Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN'e,

Çalışmamızı gerçekleştirebilmemiz için gerekli olan mikroorganizma örneklerini bize sağlayan, izolasyon ve tanımlamalarını yapan Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Seza ARSLAN ve Araştırma Görevlisi Dr. Fatma ÖZDEMİR'e,

Tezimi yazarken bana her konuda her zaman destek olan tüm arkadaşlarıma,

Tezimin her aşamasında yanımda hissettiğim diğer yarım, sevgili ikizim Sude Burçak ÖZİŞİK'a ve son olarak bana birçok konuda olduğu gibi, tezimi hazırlamam esnasında da yardımlarını esirgemeyen canım annem Filiz ÖZİŞİK'a ve canım babam Şerafettin ÖZİŞİK'a

Sonsuz teşekkürlerimi iletiyor, saygı ve sevgilerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Escherichia coli</i>	3
1.1.1. <i>Escherichia coli</i> 'nin Alt Grublarının Sınıflandırılması ve Serotiplendirilmesi.....	5
1.1.2. <i>Escherichia coli</i> 'nin Filogenetik Olarak Sınıflandırılması	5
1.1.3. İnsanlarda Hastalık Oluşturan <i>Escherichia coli</i> Türleri.....	6
1.1.4. İnsanlarda Görülen En Yaygın <i>Escherichia coli</i> Hastalıkları	13
1.1.5. <i>Escherichia coli</i> Enfeksiyonlarının Tedavisi	14
1.1.6. <i>Escherichia coli</i> 'nin Tedavilerde Kullanımı	14
1.1.7. <i>Escherichia coli</i> 'nin Tespit Edilme Metotları.....	15
1.2. Virülans Faktörler.....	16
1.3. Antimikrobiyal Direnç.....	20
1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	31
2. MATERYAL VE YÖNTEM	35
2.1. Materyal.....	35
2.1.1. İzolasyon Örnekleri.....	35
2.1.2. Referans Mikroorganizma.....	35

2.1.3. Tampon ve Çözeltiler.....	35
2.2. Yöntem.....	38
2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	38
2.2.2. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi.....	40
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	41
3.1. <i>E. coli</i> Kıyma Örneklerinin PCR Sonuçları	52
3.2. <i>E. coli</i> Tavuk Örneklerinin PCR Sonuçları.....	53
3.3. <i>E. coli</i> Et Örneklerinin PCR Sonuçları.....	54
3.4. <i>E. coli</i> Peynir Örneklerinin PCR Sonuçları.....	55
3.5. <i>E. coli</i> İzolatlarının PCR Amplifikasyonu Sonucu Elde Edilen Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçları.....	57
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	61
KAYNAKLAR	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>Escherichia coli</i> virülans faktör genleri ve PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri ve elde edilen PCR ürünlerinin uzunluğu	36
2.2. <i>Escherichia coli</i> antibiyotik direnç genleri ve PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri ve elde edilen PCR ürünlerinin uzunluğu	37
2.3. <i>Escherichia coli</i> virülans faktör genleri ve antimikrobiyal direnç genleri analizinde kullanılan PCR amplifikasyon programları	39
3.1. <i>E. coli</i> suşlarında tespit edilen virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin sonuçları	41
3.2. <i>E. coli</i> suşunda tespit edilen antibiyotik direnç ve virülans genlerinin kıyma, et, tavuk ve peynir örneklerindeki yüzde (%) dağılımı.....	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Bakterilerin Antibakteriyel Etki Alanları ve Direnç Mekanizmaları.....	25
3.1. 37 <i>E. coli</i> kıyma örneğindeki virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin % oranları.....	53
3.2. 135 <i>E. coli</i> tavuk örneğindeki virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin % oranları.....	54
3.3. 29 <i>E. coli</i> et örneğindeki virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin % oranları.....	55
3.4. 85 <i>E. coli</i> peynir örneğindeki virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin % oranları.....	56
3.5. <i>E. coli</i> izolatlarındaki <i>bcsA</i> geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	57
3.6. <i>E. coli</i> izolatlarındaki <i>iutA</i> geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	57
3.7. <i>E. coli</i> izolatlarındaki <i>tkl1</i> geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	58
3.8. <i>E. coli</i> izolatlarındaki <i>papC</i> geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	58
3.9. <i>E. coli</i> izolatlarındaki <i>iss</i> geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	59
3.10. <i>E. coli</i> izolatlarındaki <i>tetB</i> geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	59
3.11. <i>E. coli</i> izolatlarındaki <i>aac(6')-Ib</i> geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	60
3.12. <i>E. coli</i> izolatlarındaki <i>bla_{CMY-2}</i> geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	60

KISALTMALAR DİZİNİ

APEC	Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i> / Kuş patojenik <i>E. coli</i>
ATCC	American Type Culture Collection
bç	Baz Çifti
dATP	Deoksiadenozin Trifosfat
dCTP	Deoksisitozin Trifosfat
dGTP	Deoksiguanin Trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleosid Trifosfat
dTTP	Deoksitimin Trifosfat
EAEC	Enteroagregatif <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	Ekstraintestinal patojenik <i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HC	Hepatit C
HÜS	Hemolitik Üremik Sendrom
İYE	İdrar Yolları Enfeksiyonu
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
STEC	Shiga Toksin Üreten <i>Escherichia coli</i>
TTP	Trombotik trombositopenik purpura
UPEC	Üropatojenik <i>Escherichia coli</i>

1. GİRİŞ

İnsan beslenmesi ve sağlığı açısından et, süt, yumurta, balık gibi hayvansal kaynaklı gıdalar büyük bir öneme sahiptir. Hayvansal gıdalar çoğunlukla protein kaynaklı gıdalardır. Proteine ek olarak, B kompleks vitaminleri, demir, kalsiyum, potasyum gibi çeşitli mineral maddeleri içermeleri nedeniyle de insan beslenmesi için gerekli temel özellikleri taşımaktadır. Fakat insan beslenmesi için büyük öneme sahip olan hayvansal kaynaklı bu gıdalar aynı zamanda insan sağlığını tehdit eden önemli bir halk sağlığı sorununa dönüşebilir [1].

Birçok hastalık gıdalar yolu ile insanlara bulaşmaktadır. Hayvansal kaynaklı gıdalar, hayvanların kesilmesinden itibaren gıda olarak tüketilene kadar geçirecekleri aşamalar esnasında; kesimhanelerin temiz olmaması, olumsuz çevre şartları, gıda olarak tüketilecek hayvanların sahip olduğu hastalıklar, üretici ve tüketicilerin gıda hijyenine dikkat etmemeleri gibi çeşitli nedenlerden dolayı bulaşacak olan mikroorganizmalar ile kirlenebilir ve halk sağlığını tehdit edebilirler [2].

Escherichia coli bakterisi sıcakkanlı canlıların sindirim kanallarında bulunan ve bazı vitaminlerin sindirimine ve sentezine katılan simbiyotik bir bakteri grubudur [3]. *Escherichia coli* hayvan dışkıları ile taşınarak toprağı, suyu veya gıda olarak tüketilecek besinleri kontamine edebilir. Bu kirlenme sırasında gıda olarak tüketilecek olan et, süt gibi besinlere bulaşan *E. coli*, çoğunlukla bağırsak patojenik *E. coli*, enteropatojenik, enterotoksijenik ve verotoksijenik *E. coli* ile ilişkilendirilmiştir. Fakat son zamanlarda, hayvansal kökenli *E. coli*'nin ayrıca ekstra bağırsak enfeksiyonlarıyla da ilişkili olduğu gösterilmiştir. *E. coli* bakterisi insanlarda idrar yolu enfeksiyonuna, ishal, menenjit, peritonit, septisemi ve Gram-negatif bakteriyel zatürre gibi çeşitli bağırsak ve ekstra bağırsak enfeksiyonlarına sebep olabilir [2].

E. coli genlerinde bulunan çoklu antibiyotik direnci ve bu organizmaların sahip olduğu virülans faktörleri patojenik bakteri enfeksiyonlarının oluşmasını sağlayan mekanizmaları içerdđiği gösterilmiştir [4]. Virülans faktörleri taşıyan ve/veya antibiyotiğe dirençli *E. coli* ile kontamine olmuş gıdalar tüketildiğinde veya bu

gıdalara temas edildiğinde bu bakterilerin hareketli genetik elemanları üzerinde taşınan genlerin insanlarda klinik öneme sahip diğer bakterilere aktarılabilmesine dair çalışmalar yapılmış ve sonuç olarak insan sağlığını etkilediği gösterilmiştir. Kısacası sıcakkanlı hayvanların gıda olarak tüketilmesi durumunda, sütünden yararlanılacaksa sağılması sırasında veya etinden yararlanılacaksa kesimhane öncesinde ve sonrasında yapılacak olan tüm işlemler esnasında kontaminasyonu engellemek için önlem alınmadığı takdirde gıdalara bulaşacak olan *E. coli* bakterilerinin halk sağlığı için büyük bir tehdit oluşturacağı düşünülmektedir [5,6].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda virülans faktörlerin ve antimikrobiyal direnç genlerinin karakterizasyonları için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR), DNA-DNA Hibridizasyonu, İmmünofloresans, Western Blotlama, SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi) gibi moleküler teknikler kullanılmaktadır [7, 8].

Bu tez çalışmasının amacı; Bolu yöresinde bulunan çeşitli market ve kasaplardan alınan kıyma, et, tavuk ve peynir gibi hayvansal kökenli gıda örneklerinden izole edilen 283 *E. coli* izolatında bazı antimikrobiyal direnç ve virülans genlerinin varlığının ve yaygınlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile araştırılması, belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonunun yapılarak, *E. coli* kaynaklı hastalıkların tanı ve tedavi sürecinde moleküler metotların daha etkin ve hızlı bir biçimde uygulanabilirliğinin arttırılmasına yardımcı olmak amaçlanmıştır.

1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*), 1885 yılında Alman çocuk doktoru Theodoro Escherich tarafından dünyaya tanıtılmıştır. İlk olarak *Bacterium coli* adı verilen bu mikroorganizmaya daha sonra araştırmacının kendi adı verilmiştir [8]. *E. coli*, sıcakkanlı canlıların bağırsaklarında bulunur. *E. coli*, fakültatif aerobik ve anaerobik büyüme gösteren, çubuk biçiminde olan, en iyi 37°C'de büyüyen ve spor yapamayan, Gram negatif (-) bir bakteridir [9].

E. coli bakterisi keşfedilmesinden sonra üzerinde en çok çalışılan mikroorganizmalardan biri olmuştur [10]. Çeşitli araştırmalar, *E. coli*'nin tropikal ve subtropikal ortamlardaki hayvan konaklarının gastrointestinal kanalının dışında da büyüebileceğini göstermiştir [9]. *E. coli* suşları daha sonra yapılan çalışmalarda ılıman iklimlerde tortu, kum ve suda da keşfedilmiştir [11]. Bu farklı habitatlarda *E. coli*'nin hayatta kalması ve kolonizasyonu, besin kullanılabilirliği, sıcaklık, pH, ozmolarite, kimyasallar, radyasyon ve rekabetçi mikrofloranın mevcudiyetine adaptasyonlarıyla sağlanır. Konakçı olmayan ortamdaki koşullar ise sıcakkanlı hayvanlara kıyasla çok farklıdır. Bu alternatif ortamlarda *E. coli* hayatta kalmak için ve bunlarla ilişkili strese bağlı koşullarda çeşitli stratejileri kullanmaktadır. *E. coli*'de stresli koşullar altında RpoS (RNA polimerazın alt birimi) faktörü olarak tanımlanan stres tepkisini tetikleyen bir faktör vardır. Bu faktör; *E. coli*'de açlık, düşük veya yüksek pH, düşük veya yüksek ozmolarite, oksidatif stres ve DNA hasarı gibi koşullara dirençle sonuçlanan birkaç genin ekspresyonunu değiştirdiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [12]. RpoS ayrıca, bakterilerin olumsuz şartlarda büyümesine ve hayatta kalmasına izin veren biyofilm oluşumuna katılan genleri de düzenler [13]. Biyofilmler canlı veya cansız yüzeylere yapışabilen ekstraselüler matriks tabaka içinde yaşayan mikroorganizma topluluklarıdır. Biyofilm, bakterileri oksidatif stres, dezenfeksiyon ve antibiyotikler gibi çeşitli streslerden koruyabilen fiziksel bir bariyer sağlar. RpoS tarafından tetiklenen genel stres tepkisine ek olarak, diğer genler tarafından kontrol edilen gerilme tepkileri de *E. coli*'de tanımlanmıştır [15, 16].

Morfolojisi

E. coli'nin keşfi, *E. coli*'nin yanı sıra dünya üzerinde bulunan diğer organizmaların da genetik rekombinasyonlarının, RNA transkripsiyonlarının ve protein sentezlerinin anlaşılmasına yardımcı olmuştur [8]. *E. coli* bakterileri genel olarak halkasal bir kromozoma sahiplerdir ancak bazı türlerinde de ekstrakromozomal plazmidler de bulunabilir. *E. coli* kromozomal DNA'sının dizi analizi tamamen çıkarılmıştır. *E. coli*, yaklaşık 4600 kb uzunluğunda, 4300 potansiyel kodlama sekansına sahip bir tek kromozomdan oluşur. Bilinen 1800 çeşit *E. coli* proteini vardır. Kromozomunun %70'i tek genlerden (monosistronik) oluşur, %6'sı ise polisistroniktir. Sıralı Açık Okuma Çerçeveleri (ORF; Open Reading Frame), protein kodlama genleri gibi görünen alanların yaklaşık %30'u bilinmeyen işlevlere sahiptir [14, 15, 16]. Ayrıca, birçok farklı *E. coli* suşu vardır; bu suşların her biri, doğal suş olan *E. coli*'nin genotipinden farklıdır. *E. coli* suşlarının farklı genotipleri daha sonra ifade edilen fenotipi etkiler ve her suşun fizyolojisini ve yaşam döngüsünü daha fazla değiştirir. Bu nedenle, farklı *E. coli* suşları, farklı hayvan türlerinde yaşayabilirler. Genomlardaki doğal biyolojik mutasyon süreci, çok farklı *E. coli* suşlarının üretilmesinin başlıca nedenidir. Ek olarak, birçok bakteriye benzer şekilde, *E. coli* daha fazla mutasyon üretmek ve mevcut popülasyona daha fazla suş eklemek için DNA materyallerini bakteriyel konjugasyon yoluyla diğer ilgili bakterilerle aktarabilir [17, 18]. *E. coli*, yapışkan fimbriyası ve lipopolisakkaritleri içeren bir dış zar, bir peptidoglikan tabakası olan periplazmik bir boşluk ve sitoplazmik zardan oluşan bir hücre çeperine sahip Gram negatif çubuk şekilli bir bakteridir. Bazı suşlar, plazmidin diğer bakterilere aktarılmasını ve diğer bakteriler tarafından kabul edilmesini sağlar. Bu özellik, *E. coli*'nin stres koşullarında hayatta kalmasını sağlar. Sadece halkasal bir kromozomal DNA ve bir plazmid ile son derece basit hücre yapısına sahip olmasına rağmen, hücre büyümesini ve hücre bölünmesini korumak için karmaşık bir metabolizmaya sahiptir [17].

1.1.1. *Escherichia coli*'nin Alt Gruplarının Sınıflandırılması ve Serotiplendirilmesi

Kaufmann 1943 yılında antisera üretimi için haşlanmış *E. coli* kültürleri kullanarak geliştirdiği antijenik bir şemaya dayanarak *E. coli*'yi alt gruplara ve serotiplerine ayırmıştır [18]. Bu serotiplendirme *E. coli*'nin somatik (O), flagellar (H) ve kapsül (K) antijenlerine göre yapılmıştır. O antijeni dış hücre zarını oluşturan lipopolisakkarit yapıda olup, ısıya dirençli yüzey antijenidir. Kauffmann ve Vahlne 1945 yılında kapsül antijenini göstermek için bir sembol olarak K antijeni kavramını ortaya atmıştır. K antijeni depolisakkarit (N-asetil neuramik asit) yapıdadır. H antijenleri ise flagellanın bir parçasıdır ve bu yüzden hareketli *E. coli* suşlarında bulunur. Çevreden ilk izole edilen *E. coli* suşlarının çoğu hareketsiz veya kısmen hareketlidir. Bu yüzden H antijenine bağlı serotiplendirme güvenilir değildir. Bir diğer antijen olan fimbrial (F) antijenler, proteinöz moleküler yapılar bilinmeden önce K antijenleri olarak tanımlanmıştır, fakat kendi yapılarının ortaya çıkmasıyla K antijeninden ayrılmışlardır. F antijenleri ise tek tek suşları tanımlanmak için kullanılmaktadır [19].

1.1.2. *Escherichia coli*'nin Filogenetik Olarak Sınıflandırılması

Escherichia coli bakterilerinin genotipik ve fenotipik özelliklerinin bilinmesi, *E. coli*'nin neden olduğu enfeksiyonların önlenmesi açısından gereklidir. *E. coli* suşları birçok genetik alt yapılara sahiptir ve bu alt yapılara göre filogenetik sınıflara ayrılırlar [20, 21].

E. coli suşlarının filogenetik grupları: A, B1, B2, C, D, E, F ve clade I olmak üzere 8 çeşittir. Kommensal *E. coli*, en sık A veya B1 grubunu temsil eder. Bağırsak enfeksiyonlarından sorumlu olan patojenik *E. coli*'nin filogenetik grupları A, B1 veya D'yi temsil eder. Ekstraintestinal enfeksiyonlardan sorumlu olan *E. coli* B2 ve D gruplarına aittir. E grubu, D grubu ile (O157: H7 dahil), F grubu ise B2 grubu ile ilişkilidir. Fenotipik olarak ayırt edilemeyen fakat genetik olarak ayrılabilen *E. coli* suşlarını ise clade I grubunda yer almaktadır [22, 23].

1.1.3. İnsanlarda Hastalık Oluşturan *Escherichia coli* Türleri

İnsan ve hayvanların gastrointestinal kanalında yaşayan çoğu *E. coli* farklı serotiplere ait yüzlerce suşa ayrılabilir [23]. *E. coli* suşlarının sadece küçük bir kısmı patojendir ve bağırsak veya ekstra bağırsak hastalıklarına neden olabilir [24].

E. coli'ler çeşitli özelliklerine bağlı olarak insanlarda hastalık oluşturma yeteneklerine göre temelde sekiz kategoriye ayrılmıştır [25];

1. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC),
2. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC),
3. Enteroinvazif *E. coli* (EIEC),
4. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC),
5. Enteroagregatif *E. coli* (EAEC)
6. Diffüz-aderent *E. coli* (DAEC)
7. Ekstra-İntestinal Patojenik *E. coli* (ExPEC)
 - 7.1. Üropatojenik *E. coli* (UPEC)

1.1.3.1. Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC)

Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), akut sulu ishal ve şiddetli dehidratasyon ile karakterize klinik kolera ile başvuran *Vibrio cholerae* kültür-negatif dışkıları olan hastaların klinik araştırması sırasında keşfedilmiştir [26]. 1960'ların sonlarında Calcutta'daki Tropikal Tıp ve İnfeksiyon Hastalıkları Hastanesi'nde çalışan Johns Hopkins Üniversitesi'nden kolera araştırmacıları tarafından yapılan bir çalışmada diyare hastalığında enterotoksin üreten *E. coli*'nin varlığı kesin olarak tanımlanmıştır. Benzer şekilde, bu araştırmacılar, kolera benzeri belirtilerle başvuran birçok hastanın dışkılarında da *E. coli*'nin saf kültürlerine sahip olduklarını ve bu organizmaların ısıya dayanıksız enterotoksin ürettiğini fark etmişlerdir [27]. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) patojenitesi ise şöyledir: Biri sıcaklığa duyarlı termolabil (LT) (60°C'de 30 dakika içinde inaktive olan) diğeryse sıcaklığa dirençli termostabil (ST) (120°C'de inaktive olan) iki enterotoksinden kaynaklanmaktadır. Her iki toksini veya sadece birini üreten suşları vardır. LT, kolera toksini gibi adenilat siklaz enziminin üretimini

tetikler. İmmunojen olmayan ST patojenitesi ise guanilat siklaz oluşumunu tetikler [11].

ETEC'in etken olduğu enfeksiyonun klinik tablosu yoğun diyareyle karakterizedir. Hastalık her yaşta ortaya çıkabilir. ETEC suşları seyahat diyarelerinin %50'sinden fazlasından sorumludurlar [10]. Ayrıca ince bağırsaktaki hedef reseptörlere LT ve / veya ST enterotoksinleri üretilmesi ve etkin bir şekilde verilmesi yeteneğine sahiptirler. Hem fimbriyal hem de fimbriyal olmayan adhezinler dahil olmak üzere bir dizi ilave virülans özelliği tanımlanmıştır [28, 29].

Enterotoksijenik *E. coli* suşları hem fenotipik hem de genetik çeşitlilik sergiler. Bu durum hem ST hem de LT için genlerin plazmidler üzerinden kodlandığını gösterebilir. Bazı serotipler ETEC kolleksiyonlarında diğerlerine göre daha fazla görülürken, enterotoksijenik *E. coli* genel olarak O ve H serotipleri ile temsil edilir [28].

ETEC'in neden olduğu ishal hastalıkları, 5 yaşın altındaki çocuklarda tüm ölümlerin beşte birinden fazlasını kapsar. Genel olarak bakıldığında ise ishalleri patojenlerin yılda bir milyondan fazla ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir [29].

1.1.3.2. Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC)

Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC)'nin neden olduğu hastalıkların başında süt bebeği diyaresi gelmektedir. Endüstri ülkelerinde bu hastalıklara çok sık rastlanmamasına rağmen gelişmekte olan ülkelerde bebek ölümlerinin önemli nedenleri arasında gösterilmektedir. EPEC'ler ince bağırsak epitelyum hücrelerine yapışarak mikrovillüslerin tahribine neden olurlar. Yapışmadan sorumlu olan yapı "EPEC- adezyon faktörü" (EAF) olarak adlandırılır [10].

EPEC suşları, ishale neden olan, *Shiga* olmayan toksin üreten *E. coli*'dir [30].

1930'larda, hem bebeklerde hem de buzağılarda *E. coli* enfeksiyonlarını karakterize etmek için serolojik yöntemler kullanılmıştır, ancak diyare hastalığında *E. coli*'nin

önemi 1945'e kadar tam olarak bilinmemiştir [31]. 1950'lerde, uluslararası kabul görmüş bir serolojik test yönteminin ortaya çıkmasıyla birlikte, EPEC'in dünya çapında bir dağılımı olduğu bildirilmiştir. Sonraki yıllar da, EPEC sadece diyare ile iki yaş altı çocuklar arasında yaygın olarak görülen O ve H serotiplerine dayanılarak tanımlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü, tipik ve atipik EPEC suşları dahil olmak üzere EPEC serotiplerini, EAEC ve EHEC gibi diğer diyarejenik *E. coli* ile birlikte tanıtmıştır [32]. EPEC'in erişkinlerde neden olduğu enfeksiyonları ise oldukça nadir görülür [33].

1.1.3.3. Enteroinvazif *Escherichia coli* (EIEC)

Enteroinvazif *Escherichia coli* (EIEC) bakterileri, kolon mukozasına nüfuz edebilir ve ülseratif iltihaba neden olurlar. Basilli dizanteri veya şigelloz *Shigella* cinsi enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) olarak bilinen *E. coli*'nin patojen bir grubudur [34]. Dizanteri, Hippocrates tarafından, ağrılı karın kramplarının eşlik ettiği kan ve mukus içeren dışkıların sık geçişi ile karakterize edilen bir hastalığı tanımlamak için kullanılan bir terimdir [35]. Bu hastalık yüzyıllar boyunca insan toplulukları üzerinde çok büyük bir etkiye sahip olmuş, askeri operasyonların gidişatını etkileyerek çok sayıda askeri ve sivil can kaybına yol açmıştır [36].

Shigella, hareketsiz, Gram-negatif, spor oluşturmeyen çubuk şeklinde olan bir bakteri cinsidir. *Shigella* ilk kez 1896'da Japon bilim adamı Dr. Kiyoshi Shiga tarafından bir insanın dışkısından izole edilmiş ve *Shigella* bakterisi olarak tanımlanmıştır [36]. Bu bakterileri diğer enteriklerden ayıran bazı önemli biyokimyasal özellikler, bazı *S. sonnei* suşlarının yavaş yavaş laktozu fermente edebilmesine rağmen, sitrik asidi tek bir karbon kaynağı olarak kullanamaması ve laktozu fermente edememeleridir [37].

Shigella spp. ve EIEC, kalın bağırsakta epitel hücrelerinin aşırı invazyonu ile hastalığa neden olurlar. *Shigella* ince bağırsağı sadece geçici olarak kolonize eder ve çok az miktarda doku hasarına neden olur [38].

1.1.3.4. Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC)

ETEC patovarına ait suşlar hemorajik kolit, akut böbrek yetmezliği, trombostopeniye ve kansızlık (anemi) ile seyreden “hemolitik üremik sendrom (HÜS)” etkenidirler. EHEC bakterileri bir yandan plazmidler tarafından kodlanan ve enterositlere yapışma özelliği olan fimbriyalara sahiplerken, diğer yandan profajlarca kodlanan toksin (*Shiga* benzeri toksin=Vero toksin) üretme yeteneğindedirler. Bu nedenle bazı araştırmacılar tarafından VTEC (Verotoksin oluşturan *E. coli*) olarak adlandırılırlar. EHEC’lerin önemi gittice artmaktadır. HÜS etkeni olarak en sık rastlanan serotip *E. coli* O157: H7’dir [10].

EHEC olarak bilinen Enterohemorajik *E. coli*, bakteriyel efektörleri memeli hücrelerine ve büyük bir virülans plazmidine transloke eden tip III sekresyon sistemi (T3SS) gibi ilave virülans faktörlerini barındıran *Shiga* toksini üreten *Escherichia coli* (STEC)'nin bir alt grubudur [39]. *Shiga* toksin (*Stx*) üretimi, enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC) enfeksiyonlarının oluşmasında ve ilerlemesinde kritik bir adımdır. Ölü ve ölmekte olan bakterilerden *Stx*'in olası salınımı ve direnç gelişimi riski EHEC'e karşı antibiyotik kullanımını kısıtlamıştır [40]. *E. coli* O157: H7, dünya çapında insan enfeksiyonlarına neden olan EHEC'in baskın serotipidir. β -glukuronidaz aktivitesinin (GUD⁻) olmaması ve sorbitolün (SOR⁻) fermente edilememesi STEC O157: H7'yi diğer *E. coli* suşlarından ayırt eder [41].

STEC, suş çeşitliliği ile karakterizedir. Çok lokuslu enzim elektroforezine dayalı olarak EHEC1, EHEC2, STEC1 ve STEC2 olmak üzere dört gruba ayrılırlar. STEC O157: H7 ve evrimsel atası O55: H7, EHEC1'i oluşturur. EHEC2, O157 olmayan *Stx* üreten suşların en yaygın grubudur ve O111: H8, O111: H-, O26: H11 ve O111: H11 gibi serotiplerden oluşur. STEC1 çok çeşitlidir. Bu gruptaki yaygın serotipler O113: H21, OX3: H21 ve O91: H21'dir. Diğer gruplarla karşılaştırıldığında, O103: H2, O103: H6 ve O45: H2 serotiplerinden oluşan STEC2'nin virülansı hakkında çok az şey bilinmektedir [42]. 1977'de, *Stx*'in orijinal olarak *Shigella dysenteriae*'nin kültür ekstrelerinde tanımlanmasından 100 yıl sonra, iki grup, bazı *E. coli* suşlarının, Vero hücrelerini öldürebilen ve anti-*Stx* serumu tarafından nötralize edilebilen sitotoksin

ürettiklerini bağımsız olarak göstermiştir. Bu sitotoksinlere *Shigella*'nın Stx'iyle olan çarpıcı benzerlikleri nedeniyle *Shiga* benzeri toksinler denir [43]. 1982'de ABD'de Oregon ve Michigan'da meydana gelen iki hemorajik kolit salgınını takiben STEC, önde gelen bir insan patojeni olarak bilim adamlarının ve halkın dikkatini çekmiştir. Bu gıda kaynaklı hastalık salgınları sırasında, serotip *E. coli* O157:H7 hem hasta insanlardan hem de dondurulmuş köftelerden izole edilmiştir [44].

STEC, yaygın olarak bakteriyofaj transdüksiyonu ile etkilenen yatay gen aktarımı yoluyla sayısız virülans faktörünün edinilmesi ile karakterize edilir ve çoğalma veya delesyon yoluyla daha hızlı gen kazanımı veya gen kaybına neden olur [38]. Yapılan çalışmalar da STEC enfeksiyonu, ABD ve diğer bazı ülkelerde sıklıkla görülen bir hastalıktır [45].

1.1.3.5. Enteroagregatif *Escherichia coli* (EAEC)

Enteroagregatif *Escherichia coli* (EAEC) ilk kez 1987 de Peru, Lima'da akut ishalleri bir çocukta tanımlanmıştır ve EAEC'nin endemik olduğu bölgelerde yaşayan çocuklarda inatçı diyare ile, insan bağışıklık eksikliği (HIV) virüs enfeksiyonlu bireylerde ve dünyanın daha az gelişmiş bölgelerini ziyaret eden sanayileşmiş ülkelerden gelen gezginlerde görülen diyare ile ilişkilendirilmiştir. Dünyanın çeşitli bölgelerinde EAEC, ABD'de ishal dışı örneklerinde tanımlanan en yaygın bakteriyel patojen olan enterotoksijenik (ETEC) *E. coli*'yi geride bırakmıştır. Ortaya çıkan bu patojen, sağlıklı yetişkinlerde ve çocuklarda nadir görülen diyarenin en önemli nedeni olarak giderek daha fazla fark edilmektedir. Kontamine yiyecekler, EAEC enfeksiyonunun ana kaynağı gibi görünmektedir ve çeşitli gıda kaynaklı ishal salgınlarında rol oynamaktadır [46].

İshal, özellikle beş yaşın altındaki çocuklarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Özellikle bebeklik döneminde tekrarlayan ishal dönemleri, gelişim eksiklikleri ve bozulmuş bilişi içeren gelişimsel engellere yol açan besin maddelerinin yetersiz kalmasına neden olmaktadır [47].

EAEC patogenezi, organizmanın bağırsak hücrelerine yapışması, enterotoksin ve sitotoksin üretme ve inflamasyonu indüklemesi ile belirlenir. EAEC, birbiri ile sıkı bir şekilde birleşebilen, insan HEP-2 hücrelerine yapışabilen ve ayrıca doku kültürü plakalarında büyütüldüğünde abiyotik yüzeylere yapışabilme özelliği ile karakterize edilir. Bu büyüme ortamında, EAEC kolonileri ışık mikroskobu ile görüntülendiğinde “yığılmış tuğlalara” benzemektedir. Moleküler düzeyde, bu toplayıcı (bir araya getirme) fenotipini kodlayan genler, büyük bir plazmitte (pAA) bulunur. pAA plazmitinde bulunan *aggR* regulonu EAEC kromozomundaki virülans faktörlerini ve en az 2 patojenite adasını kodlayan bir dizi plazmid genlerini kontrol eder [46].

2011 yılında, O104: H4 serotipi olan *Shiga-toksin* üreten EAEC suşu, Avrupa’da 816 HÜS vakası ve 54 ölüm vakasına neden olmuştur [48, 49].

1.1.3.6. Diffüz- aderent *Escherichia coli* (DAEC)

Diffüz Aderent *Escherichia coli* (DAEC), HeLa ve HEP-2 hücreleri üzerindeki yaygın yapışma düzenleri ile tanımlanır ve hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde sulu ishal ile ilişkilendirilmiştir ve ayrıca idrar yolu enfeksiyonlarının tekrarlanmasından sorumludur. DAEC’in sebep olduğu ishalin patogenezi henüz açıklığa kavuşturulmamıştır, ancak virülansla ilgili çeşitli özellikler tanımlanmıştır. Çoğu DAEC suşu, kromozom veya bir plazmid tarafından kodlanabilen F1845 olarak adlandırılan bir yüzey fimbriasını ifade eder [50].

1.1.3.7. Ekstra-İntestinal Patojenik *Escherichia coli* (ExPEC)

Ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olan *E. coli* patotipidir. Genellikle A ve B1 filogenetik sınıfına ait insan kommensal suşları ile karşılaştırıldığında, ExPEC suşlarının çoğu B2 ve D sınıfına aittir [51, 52, 53].

Diyarejenik türlerin aksine, ExPEC’in insanda gastrointestinal hastalık yapma yeteneği yoktur. Bununla birlikte, ExPEC, insan bağırsak yolu dışındaki farklı

anatomik bölgelerde çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir [54, 55]. Bu enfeksiyonlar; idrar yolu enfeksiyonları, yenidoğan menenjit, yenidoğan sepsisi, topluluk kaynaklı bakteriyemi, karın içi enfeksiyonları ve nozokomiyal pnömoni olarak örneklendirilebilir [55].

1.1.3.7.1. Üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC)

Üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC), ekstraintestinal patojenik *E. coli*'nin heterojen bir suş grubudur. Yaygın olarak idrar yolu enfeksiyonuna neden olurlar [56, 57]. İdrar yolu enfeksiyonları insanlarda sık rastlanan ve tedavi maliyeti yüksek olan en yaygın bakteriyel enfeksiyonlardır [57]. Genellikle UPEC izolatlarının birincil kaynağının insan bağırsak florası olduğu kabul edilir [58]. İdrar yolunun rektuma yakın olması dolayısıyla bu bakteriler ya idrar yoluna aktarılabilir ve burada sistite yola açabilirler ya da böbrek kanallarına ulaşarak piyelonefrit gibi idrar yolu enfeksiyonlarına neden olabilirler. Normalde UPEC enfeksiyonları, sporadik vakalara neden olurlar ve aynı suştan kaynaklanan salgınlar nadir görülür. Bir klonal UPEC izolatı grubunun gıda olarak tüketilecek yiyecekleri kirletmesi veya ortak kullanılan malzemelere bulaşması bu enfeksiyonun tek bir suştan toplu olarak yayılmasına neden olabilir [59]. İdrar yolu enfeksiyonu geçiren hastalarda bulunan UPEC, seks partnerlerinin fekal izolatlarıyla eşleşebilir, bu durum UPEC'in cinsel yolla da bulaşabileceğini gösterir [60].

UPEC suşları B2, D ve O (lipopolisakarit) filogruplarına sahip üropatojenik klonlar halinde (O1, O2, O4, O6, O8, O9, O18 ve O83) sınıflandırılabilirler [56, 57]. UPEC, bakterilerin izole edildiği enfeksiyonun şiddeti ve türü ile de sınıflandırılabilir. Piyelonefrit veya ürosepsis izolatları, böbrekleri enfekte eden ve kan dolaşımına erişim sağlayan en şiddetli idrar yolu enfeksiyonlarına neden olurlar [60].

UPEC tip 1, P, S, F1C gibi pili ve fimbria olarak adlandırılan çeşitli yapışkan yapıları şifrelerler. Bir UPEC suşu, birkaç farklı pili barındırabilir ve çevresel değişikliklere bağlı olarak bir tip pilustan diğerine geçebilir. Üriner sistem gibi düşük demir ortamlarında hayatta kalmak için UPEC, demir ihtiyacını karşılamak için konakçıdan demir almak üzere farklı demir alım sistemlerini ifade eder. Bunlar, aerobaktin,

salmochelin ve yersiniabaktin gibi, ortamdaki demiri temizleyebilen ve daha sonra bakteri hücre yüzeyindeki reseptörler yoluyla bakterilere geri alınabilen sideroforları salgırlar. UPEC'nin salgıladığı çeşitli toksinler idrar yolu enfeksiyonu (İYE) patogenezinde rol oynar. UPEC izolatlarının yarısından fazlası, konakçı hücrelerde gözenekler oluşturabilen alfa-hemolizin (HlyA) içerir. UPEC'in bir diğer önemli toksini UPEC izolatlarının üçte birinde bulunan sitotoksik nekrotizan faktör 1'dir (CNF1). CNF1, Rho GTPaz ailesini aktive ederek, zar yapısının bozulmasına, enflamatuvar sinyal yollarını ve apoptozun modülasyonuna neden olabilir [61].

1.1.4. İnsanlarda Görülen En Yaygın *Escherichia coli* Hastalıkları

E. coli'nin var olduğu doğal ortam sıcakkanlı canlıların bağırsaklarıdır. Bu yüzden dışkı yoluyla toprağa bulaşan veya su ve besinlerde ki fekal kirlenmeye sebep olan durum *E. coli*'nin varlığıdır. İnsanlarda ki bakteri kaynaklı enfeksiyonlarda en sık rastlanılan bakteri türü *E. coli* bakterisidir. Bu bakteri türünün insanlarda neden olduğu enfeksiyonlara, bağırsak enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonları örnek olarak verilebilir. Bu enfeksiyonlara ek olarak kolesistit, apandisit, ameliyat sonrası yara enfeksiyonları, peritonit ve septisemiler de örnek verilebilir [10]. *Escherichia coli*, insan kalın bağırsaklarına yerleştiiği zaman sindirim süreçlerine, gıda bozulmasına, gıda emilimine ve K vitamini üretimine yardımcı olabilir. *E. coli*'nin farklı suşları farklı hayvan türlerinde bulunabilir, bu nedenle dışkılarda hangi *E. coli* suşunun bulunduğunu inceleyerek dışkıların hangi hayvan türüne ait olduğu belirlenebilir. *E. coli*, sıcak su kaynaklarının kenarı veya daha yüksek sıcaklıktaki ortamlarda da bulunabilir [62, 63].

E. coli, sulara fekal kontaminasyonun göstergesi olarak yaygın olarak kullanılır. *E. coli*'nin bir gösterge olarak kullanılmasının nedeni, insan dışkısında bulunan diğer mikroorganizmalara göre *E. coli*'nin çok daha fazla bulunmasıdır. Çoğu *E. coli* suşu, konakçılara zararlı değildir fakat bazıları (*E. coli* O157: H7 gibi) ciddi hastalıklara neden olurlar. Bu patojenlerin ekolojisini anlamak, insanlar için gelecekteki riskleri en aza indirmede kritik öneme sahiptir [64].

1.1.5. *Escherichia coli* Enfeksiyonlarının Tedavisi

Diyarejenik *E. coli* suşlarının neden olduğu ishal normalde kendi kendini sınırlar ve antibiyotik tedavisi gerektirmez ancak semptomların süresini azaltmak için şiddetli ishal geçiren gezginlere antibiyotik verilebilir [65]. *Shiga* toksini üreten *Escherichia coli* (STEC)'nin neden olduğu enfeksiyonlar için, daha fazla toksin üretimine neden olma ve hastalığı daha da kötüleştirme riski nedeniyle antibiyotikler önerilmemektedir [66]. STEC'in neden olduğu ciddi Hemolitik Üremik Sendrom (HÜS) için diyalizle olası böbrek yetmezliğinin telafisi mevcut tedavi stratejisidir. Diyarejenik enfeksiyonların aksine, Ekstra-intestinal patojenik *Escherichia coli* (ExPEC)'nin sistit gibi hafif enfeksiyondan, bebek menenjiti gibi daha ağır ve potansiyel olarak ölümcül enfeksiyona kadar olan ekstraintestinal enfeksiyonlar genellikle antibiyotiklerle tedavi edilir. Ekstra-intestinal enfeksiyonlar için yaygın olarak reçete edilen antibiyotikler, trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX), florokinolonlar, sefalosporin ve nitrofurantoin nesillerdir. Her ne kadar geçmişte ExPEC enfeksiyonlarının tedavisinde antibiyotikler çok faydalı olsa da, *E. coli*'deki antibiyotik direncindeki artış, *E. coli* enfeksiyonlarının tedavisini zorlaştırmaktadır [62]. Bu durum göz önüne alındığında, ExPEC enfeksiyonlarını önlemek amacıyla etkin aşı geliştirme ve ExPEC'in neden olduğu enfeksiyonlar için risk faktörlerinin belirlenmesi üzerine araştırmalar devam etmektedir [67].

1.1.6. *Escherichia coli*'nin Tedavilerde Kullanımı

E. coli, uzun laboratuvar öyküsü nedeniyle mevcut biyolojik mühendislikte önemli bir rol oynar. *E. coli* çalışmaları hayvanlara ve insanlara uygulanabilir niteliktedir. *E. coli*, rekombinant DNA teknikleriyle insan enzimleri üretebildiğinden, ilaç olarak kullanılabilen bileşikler veya enzimler üretmek için çok iyi bir araç olarak yaygın şekilde kullanılır. *E. coli* rekombinant DNA'nın insanlığa en yararlı katkısı, diyabet hastalarının tedavisinde kullanılan insan gen ürünü insülinin sentetik olarak bu teknikle üretilmesi olmuştur [68, 69].

1.1.7. *Escherichia coli*'nin Tespit Edilme Metotları

Genel olarak, gıda örneklerinde *E. coli* kontaminasyonunun tespiti, uygun zenginleştirme ve seçici ortam kullanılarak ön zenginleştirme ve zenginleştirme ile gerçekleştirilir. Daha fazla serotip belirlemek için immünolojik yöntemler de kullanılabilir. Patojenik potansiyellerini değerlendirmek için spesifik hücre kültürleri veya hayvan modelleri kullanılabilir. Örneğin, HEp-2 hücre yapışma testi, Enteroagregatif *Escherichia coli* (EAEC) ve Diffüz-aderent *Escherichia coli* (DAEC) tespiti için hala altın standarttır. Her ne kadar hücre kültürü ve hayvan modelleri patojenik *E. coli*'nin varlığı hakkında doğrudan kanıtlar sunsa da, çoğu zaman alıcıdır ve özellikle analiz için çok sayıda örnek olduğunda, zahmetli çalışmalar gerektirir. Ek olarak, bazen bazı patojenik *E. coli* sadece insanlarda hastalığa neden olabileceğinden kullanılabilir ilgili hayvan modelleri yoktur. *E. coli* patogenezinin sorumlu olan genetik belirleyiciler hakkında bilgi elde etmek için, moleküler bazlı metodlar *E. coli*'nin saptanması ve karakterize edilmesinde daha sık kullanılmaya başlanmıştır. Fenotipik yöntemlerle karşılaştırıldığında, moleküler yöntemler genellikle otomasyon için daha hassas, daha hızlı ve daha kolaydır. Tüm moleküler yöntemler arasında, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), *E. coli* suşlarında spesifik virülans faktörlerini tanımlamak için en yaygın kullanılan yöntemdir. PCR, nispeten düşük sayıda hücrenin bulunduğu gıda numuneleriyle uğraşırken daha avantajlı olmaktadır. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) oluşumu, eş zamanlı miktar tayini ve *E. coli*'nin saptanmasını mümkün kılar. Geniş çeşitlilikteki virülans faktör saptama sistemleri, özellikle mikroarray sistemi, patojenik suşları patojenik olmayanlardan ayırt etmek ve spesifik patogrupların tanımlanmasında çok yararlı olmaktadır [63, 70, 71].

1.2. Virülans Faktörler

Patojenler tarafından üretilip hücre dışına salgılanarak hastalık oluşumuna ve hastalığın devam etmesine neden olan proteinler virülans faktörler olarak adlandırılırlar. Virülans faktörlerin çoğu patojen kolonizasyonunu ve gelişimini arttıran enzimlerdir [71].

Bakteriyal patojenlerin virülans genleri kromozom ya da plazmitler üzerinde kodlanmaktadır. Ancak bazı virülans genler transpozon ya da bakteriyofajlar (Shiga toksin) tarafından da kodlanmış olabilirler. Virülans faktörler çoğunlukla multifaktöriyeldir ve patojenite adaları (PAI) olarak adlandırılan ve genom üzerinde farklı bölgelerde kümelenmiş olup virülans genler ile düzenlenmektedir [72].

E. coli'de de çeşitli konaklarda farklı dokuları enfekte edebilen çok sayıda virülans faktör bulunmaktadır. Farklı hastalık fenotiplerine dayanarak tanımlanmış *E. coli*'nin patotipleri genellikle farklı hastalık fenotiplerini vermekten sorumlu virülans faktörlerini kodlayan farklı patojenite adalarına sahiptir [8], [72]. Bu virülans faktörler, *E. coli*'nin hücre yüzeyinde bulunanlar ve hücre içinde üretilerek hedef dokuya taşınanlar olmak üzere iki ayrı gruba ayrılabilir. Bu gruplardan hücre yüzeyinde bulunanlar, etken maddenin konak hücre yüzeyine tutunması, hedef dokuya invazyonu, biyofilm oluşumu ve sitokin indüksiyonu gibi rollerde görev alan farklı fimbria tiplerinden oluşurlar. Hücre içinde üretilerek dış ortama salınanlar ise, demirin sınırlı olduğu ortamlarda bakterinin üremesine yardımcı olurlar. Adezinler, invazinler, aerobaktin sideroforları, serum direnci, kolisin aktivitesi, kapsül polisakkaritleri ve toksinler önemli virülans faktörlerdir. *E. coli*'nin sentezlediği toksinler; enterotoksinler, nörotoksinler, endotoksinler ve hemolizinlerdir [36].

E. coli'de bulunan ve bu çalışmada kullanılan bazı virülans faktör genleri:

***iutA* Geni (Ferrik Aerobaktin Reseptör Geni)**

Demir; redoks aktivitesi olan birçok enzimin temel bir kofaktörüdür. Birkaç mikroorganizma türü hariç tüm canlı organizmalar için temel olan organik bir maddedir [73].

Demirin *E. coli* bakterilerinin üremesi için gerekli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak demir hayvan dokularında sınırlı miktarda bulunur. Bu nedenle, bakterilerin demir alımı için moleküler olarak açıklanmış birçok mekanizması vardır [74]. Bu mekanizmalardan biri; birçok bakteri tarafından demir için yüksek afiniteye sahip olan düşük moleküler ağırlıklı demir şelatlarının sentezlenmesi ve taşınmasında görevli olan sideroforların salgılanmasıdır. Gram negatif bakterilerde, demir-siderofor kompleksleri, ATP bağlayıcı taşıyıcılarla birleştirilmiş dış zar reseptörleri tarafından sitoplazmaya aktarılır. Patojenik *E. coli*'de demir alımı için bir başka mekanizma ise, konakçı demir bileşiklerinin (özellikle hem veya hemoglobinin) doğrudan kullanılmasıdır [75].

Aerobaktin plasmid tarafından kodlanan bir hidroksamat sideroforudur. Demir ayırma ve transport sistemi görevi görmektedir. *E. coli* suşları ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. *E. coli*'nin demirin az bulunduğu çevrelerde büyüebilmesine olanak sağlar [19].

iutA (Ferrik Aerobaktin Reseptör) geni, aerobaktin operonunun tanımlanmış beş geninden biridir. Fe^{3+} aerobaktinin yüksek afiniteli bağlanmasında rol oynayan bir dış zar proteinini kodlar [76]. *iutA* geni özellikle üropatojenik *E. coli*'de (UPEC), bazı *E. coli* suşlarının virülansı ile ilişkilendirilmiştir [77] ve idrar yolu enfeksiyonlarına neden olduğu belirtilmiştir [78]. Ayrıca *iutA* genini taşıyan *E. coli*'nin organlara ve kana karışarak septisemiye de neden olduğu belirtilmiştir [79].

***papC* Geni (Piyelonefritle İlişkili Pilus Geni)**

Pap (piyelonefritle ilişkili pilus) veya P fimbria, ekstraintestinal patojenik *Escherichia coli*'nin (ExPEC) önemli bir virülans belirteci olarak kabul edilir. Bu

fimbrialar, bir operon içine yerleştirilmiş onbir genden oluşan pap gen kümesi tarafından kodlanır. *papC*, alt birim-şaperon komplekslerini alan ve bunları farklı liflerle birleştiren bir kullanıcı kodunu kodlar [80].

Pili, reseptör tanımaya katılan protein polimerleridir. *papC* sentezinin, hücre yüzeyinde ifade edilen pili sayısını etkilediği bulunmuştur. Üropatojenik *Escherichia coli*'nin *papC* geni, disakkarid-bağlayıcı Pap pili oluşumu için gereklidir. *papC*, düzenleyici gen *papS*, ana pilin gen *papA*, küçük bir piline benzer gen *papH* ve *papC*'nin birlikte kopyalandığı bir operonun bir parçasını oluşturur [81]. *E. coli*'de, solunum epitelindeki bakteriyel kolonizasyona aracılık eden P-fimbria, piyelonefritle ilişkili pili (pap) (*papC*) geni tarafından kodlanır. Doku yapışmasına ek olarak, P-fimbria, *E. coli*'yi nötrofillerin antibakteriyel aktivitesinden korur [82, 83]. Çocuklarda idrar yolu enfeksiyonlarına neden olan *E. coli* genellikle Pap pili veya P-fimbria'yı ifade eder [82, 84]. Kısacası *papC* geni UPEC'in neden olduğu üriner sistem enfeksiyonlarına neden olur [84].

***bcsA* Geni (Selüloz Sentez Katalitik Alt Birim A)**

Selüloz, lineer yapıda olan hücre dışı bir polisakarittir [85, 86, 87]. *Escherichia coli* türleri gibi bakteriyel patojenler, biyofilm oluşumu ve konak kolonizasyonunda içinde yer aldığı gösterilen hücre dışı selüloz üretirler [87].

Bakteriyel selüloz sentaz (Bcs) en az üç gen, (*bcsA*, *B* ve *C*) içeren bir operonda kodlanmış çok bileşenli bir protein kompleksidir. Bakterilerde, selüloz sentezi ve translokasyonu, membranla ilişkili *BcsA* ve *BcsB* alt birimleri tarafından katalize edilir. Kısacası *bcsA* geni, selülozu sentezleyen katalitik bir alt birimdir [85] ve biyofilm oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Biyofilmler genellikle kendi kendini üreten bir matris içine alınmış ve inert veya canlı bir yüzeye yapışan bir bakteri hücresi topluluğu olarak tanımlanır. Biyofilmler çevresel streslere, antibiyotiklere ve konakçı bağışıklık sistemlerine karşı direnç sağlarlar [88, 89]. Yapılan çalışmalar selülozun aşırı ifadesinin biyofilm oluşumunu arttırdığını göstermektedir [7, 90].

***iss* Geni (Serum Direnç Geni)**

iss geni ilk olarak Binns ve arkadaşları tarafından 1979 yılında bir insan *E. coli* izolatının bir ColV plazmiti ile ilişkili kompleman direncindeki rolü için tanımlanmıştır [90]. *iss* geni, dış zar proteinlerinin karakteristik bir sinyal sekansına sahip olan *iss* proteinini ve bakteriyel dış zarın 9 ile 10 KDa büyüklüğünde ki lipoproteinini kodlar [91]. *iss* geninin, bir λ bakteriyofaj geni olan Bor'un türevi olduğu düşünülmektedir. *iss* ve Bor'un amino asit dizileri yaklaşık %90 oranında özdeştir. Bor geni, *E. coli* lambda lizojenlerinin hücre kılıfının bir lipoproteini olan Bor'u, bu lizojenlere tamamlayıcı direnç kazandırması için kodlar [90].

iss geni, Ekstraintestinal patojenik *Escherichia coli* (ExPEC) virülansındaki rolüyle uzun zamandır tanınmaktadır ve ekstraintestinal bağırsak patojenik suşları arasında en yaygın virülans genlerinden biri olarak kabul edilir [92, 93].

***tkl1* Geni (Transketolaz 1 Geni)**

Transketolaz, hayvanlarda, bitkilerde ve bakterilerde bulunan ve pentoz fosfat yolunda (PPP) bir ketol grubunun geri dönüşümlü transferini katalize eden bir enzimdir. PPP, amino asitler, NADPH ve birkaç şeker fosfat ara ürünü gibi temel hücre bileşenlerinin üretilmesinden sorumludur [1].

Ekstra patojenik *Escherichia coli* (ExPEC), pentoz fosfat yolunda yer alan transketolazları kodlayan *tktA* ve *tktB* genlerini içerir. Son çalışmalar, *tktA* ve *tktB* genleri dışında üçüncü bir genin varlığını ortaya çıkarmıştır. Bu gen filogenetik grup B₂'ye ait olan, kuş ve insan ExPEC suşlarında bir patojenik adada bulunarak bu suşların virülansına katkıda bulunduğunu gösteren transketolaz 1 (*tkl1*) genidir [93]. *tkl1* geni, metabolizma, hücre zarı ve bütünlüğü, taşıma sistemleri ve virülans faktör gibi çeşitli hücre fonksiyonlarda rol oynar [1].

***rfbEO157* Geni (O157 Somatik Antijen Geni)**

Shiga toksini üreten *Escherichia coli* (STEC) ve özellikle *E. coli* O157: H7 dünya çapında yaygın patojenlerdir. Birçok *Escherichia coli* suşu, *Shiga* benzeri toksinler (*Stx*) dahil olmak üzere çeşitli güçlü toksinler üretir. Bu toksinler genellikle STEC izolatlarıdır ve insanlar üzerinde virülans bir etki yaratırlar. *E. coli* O157: H7 izolatları dünyada ki insan gastrointestinal hastalıklarının en önemli nedenlerinden biri olarak tanımlanmışlardır [94, 95, 96].

rfbEO157 geni (O157 somatik antijen geni) genellikle kanlı diyare, hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom gibi ciddi klinik belirtilerle ilişkilendirilmiştir. *E. coli* O157: H7 suşları, yiyeceklerden, sulardan, hayvandan veya insanlardan insanlara temas dahil olmak üzere çeşitli yollarla bulaşabilir [97, 98]. *E. coli* O157: H7'nin rezervuarları genellikle ruminantlardır ve bu ruminantların ana taşıyıcıları olarak sığırlar kabul edilir [97].

1.3. Antimikrobiyal Direnç

Antibiyotik

Antibiyotikler mikroorganizmaların büyümesini ve gelişmesini engelleyebilen veya mikroorganizmaları öldürebilen biyolojik kaynaklı ya da sentetik olarak elde edilen biyoaktif maddelerdir [98]. Geçmişte, antibiyotiklerin bir mikroorganizma tarafından üretilen ve diğer mikroorganizmalar için toksik oluşturan organik bileşikler olduğu düşünülmüştür [99, 100]. Bu kavramın bir sonucu olarak, bir antibiyotik orijinal olarak, geniş ölçüde bir mikroorganizma tarafından üretilen ya da düşük konsantrasyonlarda diğer mikroorganizmaların büyümesini engelleyebilen ya da öldürücü olan biyolojik kökenli bir madde olarak tanımlanmıştır [84, 101]. Bununla birlikte, bu tanım modern zamanlarda kısmen veya tamamen sentetik yollarla üretilen antimikrobiyalleri içerecek şekilde değiştirilmiştir. Bazı antibiyotikler diğer bakterileri tamamen öldürebilirken, bazıları sadece büyümelerini inhibe edebilir. Bakterileri öldürenler bakterisidal olarak adlandırılırken, bakterilerin üremesini ve gelişmesini engelleyenler ise bakteriyostatik olarak adlandırılır. Antibiyotikler genel

olarak antibakteriyel anlamına gelse de, antibiyotik bileşikler, antagonize ettikleri mikroorganizmalar grubunu yansıtmak için antibakteriyeller, antifungaller ve antiviraller olarak farklılaştırılır [89].

Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikler birçok kritere göre gruplandırılabilir. Günümüzde en yaygın bilimsel sınıflandırma aşağıda belirtildiği gibi kimyasal yapılarına ve etki mekanizmalarına göre yapılan sınıflandırmadır [100].

1. Antibiyotiklerin Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması

Kimyasal yapılarına göre bazı yaygın antibiyotikler; Beta-laktamlar, Makrolidler, Tetrasiklinler, Kinolonlar, Aminoglikozitler, Sülfonamidler, Glikopeptitler ve Oksazolidinonlar olarak sınıflandırılabilirler [101].

- **Beta-Laktamlar**

Bu antibiyotik sınıfının üyeleri yüksek oranda reaktif olan 3 karbon ve 1 azot içeren bir halkaya sahiptir. Beta-Laktam'lar bakteriyel hücre çeperi sentezi için gerekli proteinlere müdahale ederler ve bu süreçte bakterileri öldürür veya üremelerini engellerler. Penisilin bağlayıcı protein (PBP) olarak adlandırılan bazı bakteriyel enzimler, peptidoglikanın sentezi sırasında peptit birimlerinin çapraz bağlanmasından sorumludur. Beta-laktam antibiyotik üyeleri, kendilerini bu PBP enzimlerine bağlayabilir ve bu sırada, lizis ve hücre ölümüyle sonuçlanan peptidoglikanın sentezine müdahale edebilirler. Beta-laktam sınıfının en önemli temsilcileri Penisilinler, Sefalosporinler, Monobaktamlar ve Karbapenemlerdir [102].

Penisilinler

İlk kez 1928 yılında Alexander Fleming tarafından keşfedilen ve keşfedildikten bir yıl sonra (1929) dünyaya tanıtılan ilk antibiyotiktir. Penisilin *Penicillium notatum* adlı bir tür küf mantarının metabolizma ürünlerinden elde edilmiştir [103].

Penisilin sınıfı üyeleri, Penisilin G, Penisilin V, Oksasilin (dikloksasilin), Metisilin, Nafsilin, Ampisilin, Amoksisilin, Karbenilin, Piprasilin, Mezlosilin ve Ticarilin'dir [83]. Antibiyotikler biyolojik kaynaklı olabilecekleri gibi ampisilin, karbenisilin ve amoksisilin gibi bazı farklı yan zincirlerle yarı sentetik olarak da geliştirilebilir. Bu yan zincirler, antibiyotikler üzerinde, belirli bakteri suşları tarafından üretilen belirli enzimlerin parçalayıcı kapasitesinden kaçınma yeteneğinin yanı sıra, antibiyotiklerin, bu tür bakteri hücre duvarlarının dış zarı boyunca hareketini de kolaylaştırmaktadır. Özellikle, Augmentin gibi bazı penisilinler, bakteriyel penisilinaz enziminin aktivitesini inhibe edebilen antibiyotik olmayan bileşik ile kombinasyon halinde üretilir [104].

Sefalosporin

Bu antibiyotik grubunun üyeleri, yapılarında ve etki tarzında penisiline benzer. En çok reçete edilen ve uygulanan antibiyotiklerin bir parçasını oluştururlar [105]. Sefalosporinler, Penisilin üreten, Metisiline duyarlı *Staphylococci* ve *Streptococci*, *Klebsiella pneumonia*, *Haemophilus influenza*, ve bazı *Escherichia coli* kaynaklı bakteriyel enfeksiyonların ve hastalıkların tedavisinde kullanılır [106]

Monobaktamlar

Monobaktam antibiyotikleri *Chromobacterium violaceum* bakterisinden elde edilmiştir. Bunlar beta-laktam bileşiklerinin bir parçasıdır ancak diğer beta laktamların aksine monobaktamların beta-laktam halkası tek başına durur ve başka bir halka ile kaynaşmaz. Monobaktamlar, Gram pozitif bakterilere veya anaeroblara karşı etkili değildir. Enjekte edilebilir ve inhalatörler olarak kullanılırlar [83].

Karbapenemler

Bu antibiyotik sınıfı, 1976'da keşfedilmiştir. Karbapenemler, beta laktam antibiyotiklerin en yeni grubunu oluşturan, spektrumları çok geniş antibiyotiklerdendir. Gram negatif, Gram pozitif aerob bakteriler ve anaerob bakterilere karşı etkilidirler [107].

- **Makrolidler**

Bu sınıfa ait ilk antibiyotik 1952 yılında J. M. McGuire tarafından bir mantar olan *Saccharopolyspora erythraea*'nın yaşadığı toprakta metabolik bir ürün olarak keşfedilmiş ve izole edilmiştir. Makrolidler bakteriyel protein sentezini etkili bir şekilde inhibe ederek mikroorganizmaları öldürme yeteneğine sahiptirler. Bunu bakteriyel ribozoma bağlanarak yaparlar ve bu sırada gerçekleşecek olan protein sentezinde polipeptit zincirlerine amino asit eklenmesini önlerler. Makrolidler vücutta birikme eğilimindedirler. Ayrıca iltihaplanma kapasitesine de sahiptirler [100].

- **Tetrasiklinler**

Tetrasiklin, 1945 yılında Benjamin Duggar tarafından *Streptomyces* cinsi bir toprak bakterisinde keşfedilmiştir. Tetrasiklinlerin bakterilerdeki antimikrobiyal aktivite hedefleri ribozomdur. Bu bakteri organelindeki protein sentezi sırasında polipeptit zincirlerine amino asitlerin eklenmesini engellerler [83].

- **Kinolonlar**

Bu antibiyotik sınıfı, ilk olarak antimalarial ilaçları araştırmaya katılan bilim adamları tarafından nalidiksik asit olarak keşfedilmiştir. İdrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde DNA giraz ve Topoizomeraz IV'ün sentezini inhibe ederler [89].

- **Aminoglikozitler**

Bu antibiyotik sınıfının üyeleri arasında keşfedilen ilk ilaç, ilk kez 1943'te izole edilen streptomisindir. Streptomisin, insanlar arasında tüberküloza sebep olan *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı büyük ölçüde kullanılmıştır. Aminoglikozid geniş bir antibakteriyel aktivite spektrumuna sahiptir. Bakterilerde protein sentezini ribozomal alt birimlerinden birine bağlayarak inhibe edebilirler ve aerobik gram-negatif çubuklara ve bazı gram-pozitif bakterilere karşı etkilidirler [108].

- **Sülfonamidler**

Sülfonamidlerin, terapötik tıpta kullanılan ilk antibiyotik grubu olduğu bildirilmektedir ve tıp ve veterinerlik uygulamalarında hala çok önemli bir rol oynamaktadır. Sülfonamidler, *Nocardia*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Enterobacter*, *Chlamydia trachomatis* ve bazı *Protozoa* gibi hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterileri inhibe ederler. Tonsillit, septisemi, meningokokalizit, basil dizanteri ve bazı idrar yolu enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılırlar [109].

- **Glikopeptidler**

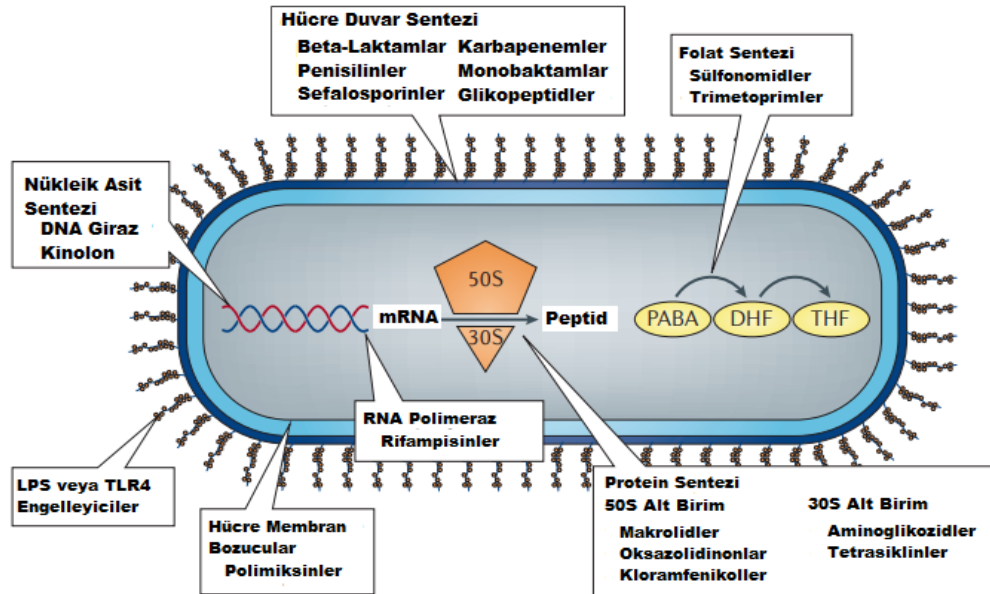
Glikopeptid antibiyotikler (GPA) başlangıçta doğal ürünler olarak elde edilmiştir, fakat son 20 yıl içerisinde geliştirilmiş aktivite ve farmakokinetik özelliklere sahip yarı sentetik türevleri ortaya çıkmıştır. Bu antibiyotikler genel olarak vankomisin ve teikoplanin olmak üzere iki ayrı gruba ayrılır. Gram negatif bakterilerin hücre duvarından nüfuz edemedikleri için, etki spektrumları sadece aerob ve anaerob Gram pozitif bakterilerinedir [83].

- **Oksazolidinonlar**

Oksazolidinonlar, sadece son zamanlarda kullanım için onaylanmış bir grup sentetik antibiyotiktir. Sentezlenecek ilk üyeyi temsil eden Linezolid, 2000 yılında yalnızca klinik uygulamalar için onaylanmıştır. Oksazolidinonun etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılmasına rağmen, protein sentezine müdahale ettikleri bildirilmektedir. Oksazolidinonlar, ribozomal 50S alt ünitesinin P bölgesine bağlanarak protein sentezini inhibe ederler. Metisilin ve vankomisin dirençli stafilocoklar, vankomisin dirençli enterokoklar, penisilin dirençli pnömokoklar ve anaeroblar dahil olmak üzere Gram pozitif bakterilere karşı geniş bir aktivite spektrumuna sahiptirler [110].

2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması

Çoğu antibiyotik sınıfının antimikrobiyal potansiyeli, bakterilerin yapısına ya da metabolik özelliklerine göredir. Antibiyotiklerin en yaygın hedefleri Şekil 1'de gösterilmektedir [71].



Şekil 1.1. Bakterilerin Antibakteriyel Etki Alanları ve Direnç Mekanizmaları [111].

Antibiyotikler bakterilerdeki etki mekanizmalarına göre 5 gruba ayrılırlar.

2.1. Hücre Duvarı Sentezinin İnhibisyonu

Bakteriyel hücrelerin çoğu, daha eski kaynaklarda murein olarak da adlandırılan sert bir peptidoglikan (PG) tabakası ile kaplıdır ve bunlar hem zorlu çevre koşulları hem de mevcut koşullar altında ozmotik basınç karşısında hücreleri korur. Hayatta kalabilmek için bakterilerin peptidoglikanı sentezlemesi gerekir; bunu, transglükosilaz ve transpeptidaz olan Penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) aktivitesi ile yaparlar [112, 113, 114]. Bu iki enzim, mevcut peptidoglikan molekülünün glikan ipliklerini ve ayrıca olgunlaşmamış peptidoglikan birimlerinin çapraz bağlanma ipliklerini uzatmak için disakarit pentapeptitleri ekleyerek çok önemli bir rol oynar [112]. Penisilinler, karbapenemler ve sefalosporinler gibi ilaçlar, PBP'ler tarafından katalize edilen peptid bağı oluşumunu inhibe ederek peptidoglikan birimlerinin çapraz bağlanmasını bloke edebilir. Glikopeptid sınıfı antibiyotiklere (örneğin, vankomisin) ait olan çoğu antibiyotik, PG'nin sentezini inhibe ederek bakteri üremesini engelleyebilir. Transglükosilaz ve transpeptidaz aktivitesini bloke etmenin yanı sıra kendilerini PG birimlerine bağlayarak PG'nin sentezini de inhibe edebilirler [89].

2.2. Hücre Zarı Yapısının Bozulması ve Fonksiyonunun Engellenmesi

Bakterilerin hücre zarlarına zarar veren antibiyotiklerin sınıfları, her bir mikrobiyal grupta hücre zarlarındaki lipit türlerine göre farklılık göstermektedir. Örneğin, Daptomisin kalsiyum bağımlı zarı depolarize eder ve bu makromoleküler sentezin durmasına ve bakterilerde hücre zarının bozulmasına neden olur. Polimiksinler ise bakteri hücreesindeki lipopolisakaritin lipit kısmına bağlanarak bakteri hücre zarının parçalanmasına neden olur. Genel olarak bu antibiyotik grubu deterjan etkisi yapan antibiyotik grubu olarak da bilinmektedir [113].

2.3. Nükleik Asit Sentezinin İnhibisyonu

Nükleik asit sentezi üzerine etki eden antibiyotikler, DNA ve RNA sentezini bozan antibiyotikler olarak da ifade edilebilirler. Nükleik asitlerin sentezi ile sonuçlanan metabolik yollar çok önemlidir; nükleik asit sentezinin bozulması, hem bakteriyel hücrelerin hayatta kalması hem de gelecek kuşaklara aktarılması için önemlidir. Bu antibiyotiklere kinolonlar, metronidazol ve rifampin örnek olarak verilebilir [114].

2.4. Protein Sentezinin İnhibisyonu

Protein sentezi, tüm bakteri hücrelerinin çoğalması ve yaşaması için gerekli olan önemli bir süreçtir. Bazı antibakteriyel maddeler, hücre içi ribozomların 30S veya 50S alt birimlerine bağlanarak bakteriyel protein sentezini hedeflerler. [115, 116]. Bu aktivite daha sonra bakterilerin normal hücre metabolizmasının bozulmasına neden olur ve sonuç olarak organizmanın ölümüne veya büyümesinin ve çoğalmasının inhibisyonuna yol açabilir. Bu antibiyotiklere aminoglikozitler, linkomisin ve tetrasiklinler örnek olarak verilebilir [117, 118].

2.5. Diğer Metabolik Yolların İnhibisyonu

Sulfonamidler ve trimetoprim gibi bazı antibiyotiklerin, bakterilerin hücre metabolizması için gerekli olan bir substratı taklit ettiği gösterilmiştir. Bu aldatma, bakteriyel enzimlerin kendilerini normal substrattan ziyade antibiyotiğe tutturmalarına neden olur. Özellikle sülfonamidler, bakteri hücrelerinde folik asidin sentezi için gerekli tetrahidrofolat gibi davranır. Folik asit, nükleik asit ve amino asitlerin metabolizmasında hayati öneme sahiptir; Bu nedenle, sülfonamidler, folik asit metabolizması için gerekli substratları taklit ettikleri için nükleik asitlerin (DNA ve RNA) ve amino asitlerin üretimini bozarlar [117].

Antimikrobiyal Direnç

Gastrointestinal enfeksiyonların önlenmesi veya tedavisi için ve gıda üreten hayvanlarda büyüme promotörleri olarak antibiyotik kullanımı, bağırsak ortamındaki kommensal mikrobiyota ve patojenler için seçici bir baskı ile sonuçlanır. Kommensal *Escherichia coli*, antimikrobiyal dirence dahil olan genleri ve mobil genetik elementleri (MGE) elde etme ve taşıma kabiliyetinin yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca komensal *E. coli* direnç genlerini tutma ve diğer bakterilere yayma (aktarma) yeteneğine de sahiptir [118].

Gıda üreten hayvanlarda bulunan Gram negatif bakterilerde çoklu ilaç direncinin (MDR) giderek arttığı bildirilmiştir. Farklı transpozitlenebilir elementleri barındırabilen dirençli plazmitler, antimikrobiyal direnç genlerini harekete geçirme ve diğer bakteri konaklarına transfer etme kabiliyetine sahiptirler [64].

Bakteriler, antimikrobiyal maddelere karşı yapısal olarak dirençli olabilirler, de novo mutasyonuna sebep olabilirler veya dirençli genlerin başka organizmalardan alınması yoluyla direnç kazanabilirler. Bu durum bakteriyel enfeksiyonların tedavisini, bakterilerin antimikrobiyal maddelere direnç geliştirebilmeleri nedeniyle giderek zorlaştırmaktadır. Kazanılan bu direnç genleri, bir bakterinin, antibakteriyel ilacı tahrip eden enzimler üretmesine veya ilacın hedef bölgeye ulaşmasını engellemesine sebep olurlar. Dirençli bakteri suşlarından antimikrobiyal duyarlı bakteriler tarafından yeni genetik materyalin alınması, çoğu zaman dirençli genlerin konakçının genomu veya plazmidlerine dahil edilmesini kolaylaştıran transpozonlarla konjugasyon, transformasyon veya transdüksiyon yoluyla oluşabilir. Antibakteriyel ajanların kullanımı, dirençli suşların ortaya çıkması için seçici bir baskı yaratır [119].

Dirençli bakteriler, sadece sağlık kurumlarında değil, toplumlarda da enfeksiyon kontrol problemlerini yayabilir veya daha da genişletebilir [120].

Escherichia coli'deki çoklu ilaç direnci, insanda olduğu kadar dünya çapında veterinerlikte de görülen endişe verici bir konu haline gelmiştir. *E. coli* hemen hemen tüm antimikrobiyal ajanların hepsine karşı hassastır, ancak bu bakteri türleri çoğunlukla yatay gen transferi yoluyla direnç genleri almak için büyük bir kapasiteye

sahiptir. *E. coli*'deki en problemleri mekanizmalara, geniş spektrumlu β -laktamazlar (geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç gösteren), karbapenemazlar (karbapenemlere direnç gösteren) örnek verilebilir [104].

E. coli'de bulunan ve bu çalışmada kullanılan antimikrobiyal direnç genleri;

***bla*_{CMY-2} Geni (Beta-Laktamaz CMY-2 Geni)**

AmpC beta-laktamazlar, birçok *Enterobacteriaceae* ve diğeri birkaç organizmanın kromozomları üzerinde kodlanan klinik olarak önemli sefalosporinazlardır [121].

AmpC-tipi genlerin, *E. coli*'de plazmitler aracılığıyla kazanılması, 1989 yılından beri bilinmesine rağmen son zamanlarda Amerika Birleşik Devletleri'nden çok merkezli numunelerde ortaya çıkması sonucunda yayınlanmıştır [64].

*bla*_{CMY-2} geni, *E. coli*'de bulunan en yaygın plazmid kaynaklı AmpC Beta-laktamaz olarak tanımlanmıştır [122]. *bla*_{CMY-2} geni, insanlardan ve hayvanlardan çok çeşitli ilaca dirençli *Escherichia coli* izolatlarında bulunan plazmitlerde tespit edilmiştir. [123]. *Bla*_{CMY} taşıyan plazmidler, çoklu ilaç direnci (MDR) ile sıklıkla ilişkilendirilirler. *E. coli*'lerde kromozomal kaynaklı ampC geninin ve yüksek seviyelerde AmpC proteininin aşırı ekspresyonu ile penisilin, üçüncü kuşak sefalosporinler, beta-laktamlar ve sefalosporinlerle bağlantılı β -laktamaz inhibitörlerine direnç sağlarlar [124].

***tetB* (Tetrasiklin Direnç Geni B)**

Tetrasiklin, çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif, hücre içi bakteri ve protozoa enfeksiyonlarında ve bulaşıcı olmayan hasarlarda tedavi için kullanılan antibiyotiklerdir. Tetrasiklinler, protein sentezine müdahale ederek bakterilerin üremesini engellerler. Bu genler genellikle plazmidler ve/veya transpozonlarla ilişkilidir ve sıklıkla konjugatifdirler. Çoğu bakteride tetrasiklin direnci, sıklıkla mobil elemanla ilişkili olan yeni genlerin edinilmesinden kaynaklanır [125]. Genel

olarak tetrasiklin akışı, ribozomun korunması ve tetrasiklin modifikasyonu olmak üzere üç farklı tetrasiklin direnç mekanizması tanımlanmıştır [126].

Gram negatif bakterilerde en yaygın direnç mekanizması *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* ve *tetG* genleri tarafından kodlanır ve *tetA* ve *tetB* genleri en sık ifade edilen genlerdir. Yapılan çalışmalarda bu antibiyotiklere karşı bakteri direncinin ortaya çıkması ile kullanımı sınırlandırılmıştır [127].

***aac(6')-Ib* Geni (Aminoglikozid 6'-N-Asetil Transferaz Tip Ib Geni)**

Enzimatik modifikasyon, bakterilerin antibiyotiklerin etkisini yitirmesine sebep olan yaygın bir mekanizmadır. Aminoglikozidler, genellikle kromozom, plazmitler ve diğer genetik elementlerde bulunan genler tarafından kodlanan aminoglikozid modifiye edici enzimler tarafından inaktive edilir [128].

Aminoglikozid değiştirici enzim olan (*6'*)-*Ib* (aminoglikosit 6'-*N* asetil transferaz tip *Ib*) geni ilk olarak 1986 yılında *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında tanımlanmıştır [129]. *aac(6')-Ib* geni, çok çeşitli Gram-negatif patojenlerde bulunan klinik öneme sahip bir enzimdir. *aac(6')-Ib* enzimi, sadece yaygınlığından dolayı değil, aynı zamanda diğer özelliklerinden dolayı da ilgi çekicidir, *N*-ucunda önemli bir mikrohidrojenite sunar ve *aac(6')-Ib* geni genellikle integron transpozonlarda plazmidlerde, genomik adalarda ve diğer genetik yapılarda bulunur [128, 129, 130].

Aminoglikozitler son derecede zararlı hidroksil radikallerinin üretimini uyarabilirler. Aminoglikozitler, Gram negatif basillerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için ve β -laktamlarla veya vankomisin ile birlikte, çoğunlukla stafilokoklar olmak üzere bazı Gram pozitif patojenleri tedavi etmek için kullanılırlar. En yaygın kullanımlarına ek olarak, tüberküloz gibi hastalıkların tedavisinde de aminoglikozitler kullanılmaktadır [131, 132, 133].

***qnrA* Geni (Kinolon Direnç Geni A)**

Kinolonlar ve florokinolonlar klinik ve veterinerlik tıbbında yaygın olarak kullanılan antimikrobiyallerdir [127]. *Escherichia coli*, idrar yolu enfeksiyonlarının en önemli etiyolojik ajanı olarak kabul edilir. Florokinolonlar ise bu enfeksiyonların tedavisinde rutin olarak kullanılırlar; fakat son yıllarda bu ilaçlara karşı direnç küresel olarak oldukça artmıştır [132].

Kinolon direncinin ana mekanizması, bakteriyel DNA replikasyonunda önemli rol oynayan iki bakteri enzimini; DNA giraz ve topoizomeraz IV'ü inhibe etmesidir [133]. Kinolon direncine plazmid aracılı pentapeptit ailesine ait olan proteinleri kodlayan genler (*qnr*) aracılık eder ve DNA giraz ve topoizomeraz IV'ü kinolon bileşiklerine karşı korur. *qnr* determinantlarının üç ana grubu vardır. Bunlar; *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS*'dir [121].

Bu çalışmada çalışılan *qnrA* geni ilk plazmid aracılı kinolon direnç genidir. 1998 yılında Alabama'da yapılan klinik bir çalışmada *Klebsiella pneumonia*'dan izole edilmiştir [134]. Yapılan bazı araştırmalar *qnr* direnç genlerinin, suda yaşayan organizmalarda veya çiftlik hayvanlarının kromozomlarında olabileceğini göstermektedir [127].

1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) in vitro koşullarda belirli bir DNA parçasının enzimatik olarak kopyalanması ve çoğaltılması yöntemidir. PCR 1980'lerin başında Cetus Corporation firmasında çalışan Kary Mullis ve çalışma arkadaşları tarafından bulunmuştur. Metot ilk olarak 1985 yılının Ekim ayında Amerikan İnsan Genetiği Konferansı Topluğunda resmi olarak sunulmuş ve aynı yıl orak hücre anemisinin bir analizi olan PCR için ilk klinik başvuru yayınlanmıştır [135].

Bu teknik, DNA klonlama ve dizileme, genlerin fonksiyonel analizi, kalıtsal veya bulaşıcı hastalıkların teşhisi, genetik parmak izlerinin tespiti dahil olmak üzere mevcut birçok araştırmada kullanılmaya başlanmıştır [136].

PCR Reaksiyon Bileşenleri

Temel PCR teması üzerinde sayısız varyasyon olmasına rağmen, reaksiyonun kendisi yalnızca birkaç bileşenden oluşur [137]. Bunlar aşağıdaki gibidir:

- Kalıp DNA
- Su
- Primerler (İleri Primer-Geri Primer)
- DNA Polimeraz Enzimi
- PCR Tamponu
- Nükleotitler (dNTP)
- $MgCl_2$

Kalıp DNA: Çoğaltılacak bölgeyi üzerinde taşıyan DNA'dır. Bu bölge için kalıp olma görevi vardır. PCR'da kalıp DNA'lar; plazmid DNA, genomik DNA veya hatta az miktarda bir doku örneği bile olabilir [137].

Su: Reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olan sıvı ortamı yaratır. Diğer bileşenlerin etkileşime girdiği matristir [136].

Primerler: Otomatik bir DNA sentezleyicide özel olarak sentezlenen spesifik bir sekansa sahip DNA'nın kısa oligonükleotitleridir (tipik olarak 15-25 nükleotit). Bugün istenen sekansa sahip primerler, oligomer tedarikinde uzmanlaşmış birçok şirketten birinde elde edilebilir. Primer tasarımı, başarılı bir PCR reaksiyonu için önemlidir. Genel olarak, iki primer, büyütmek istediğiniz DNA segmentinin iki ucuyla eşleşir [136].

DNA Polimeraz: Canlı bir organizmada hücre döngüsü sırasında DNA'yı sentezleyen bir enzim kompleksidir. Bir PCR reaksiyonunda kullanılan DNA polimeraz ise genellikle bir test tüpünde iki tamamlayıcı DNA şeridini ayırmak için gereken sıcaklık olan yüksek sıcaklığa (95°C) tolerans gösterebilir. Örneğin, kaplıcalarda yaşayan bir bakteri türü olan *Thermus aquaticus*'tan saflaştırılmış Taq polimeraz enzimi, kaynama sıcaklıklarının yakınında yaşayabilir ve 72°C'de oldukça iyi çalışır [73].

Nükleotitler: DNA moleküllerinin yapı taşlarıdır. DNA polimeraz, etrafındaki sıvıda yüzen tamamlayıcı nükleotitleri alır ve bunları bir primerin 3'ucuna bağlar ve DNA kalıbı ile eşleştirir. DNA'nın yapı taşı olan nükleotitler; dATP (deoksiadenozin trifosfat), dGTP (deoksiguinin trifosfat), dCTP (deoksisitozin trifosfat) ve dTTP (deoksitimin trifosfat)'dır. İsimlendirme kolaylığı açısından kısaca bu dört nükleotide dNTP (deoksinükleosid trifosfat) adı verilmiştir [73].

PCR tamponları: Reaksiyon döngüleri sırasında doğru pH'ın korunmasına yardımcı olur ve enzimlerin çalışması için gerekli iyonları sağlar. Tipik bir PCR tamponu stok çözeltisi, 10X veya 5X formatında sağlanır; PCR reaksiyonunda 1X'e seyreltmek gerekebilir [73].

MgCl₂: Ticari olarak tedarik edilen birçok PCR tamponu magnezyum klorür (MgCl₂) içerir. MgCl₂, Tip II enzimler için bir kofaktör olarak ihtiyaç duyulan Mg⁺⁺ iki değerlikli katyonları sağlar [73].

PCR'ın Temel Adımları

Belirli sıcaklık değişimleri olan 20-40 kez döngüden oluşan bir otomatik termal döngüleyici makinesinde tipik bir PCR prosedürü gerçekleştirilebilir. [138, 139].

PCR'ın üç temel adımı vardır;

Denatürasyon: Amplifiye edilecek çift iplikçikli DNA'yı 94°C'de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçiklerinin birbirlerinden ayıran basamaktır.

DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir [139].

Annealing (Bağlanma): Reaksiyon sıcaklığının, 37-65°C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede bir gerçekleşmektedir [76].

Extension (Uzama): DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin Taq DNA polimeraz enzimi vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polymerase 72°C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır [76].

PCR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamid jellerde yürütüldükten sonra, etidyum bromür (EtBr) veya gümüş nitrat (GN) ile boyanarak gözlemlenir [76].

PCR, şimdiye kadar icat edilmiş en güçlü laboratuvar tekniğidir. Yapılabilecek kolaylıklar ve nispeten düşük maliyetler ile birleştiğinde benzersiz özgüllük ve duyarlılık birleşimi genetikte gerçek bir devrime yol açmıştır [135].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. İzolasyon Örnekleri

Bu çalışma ile Bolu ilinde satışı sunulan ve çeşitli marketlerden temin edilen kıyma, et, tavuk ve peynirlerden izole edilen toplam 283 *E. coli* izolatında bazı antimikrobiyal direnç genleri ve virülans faktörlerinin sıklığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile moleküler olarak belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu çalışma için kullanılan *E. coli* izolatlarının 37'si kıyma, 135'i tavuk, 29'u et ve 82'si peynir örneklerinden izole edilmiştir. *E. coli* izolatlarının eldesi Bolu İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. İzole edilen *E. coli* izolatları gliserollü stok besiyerinde -20°C'de muhafaza edilmiştir ve DNA izolasyonları Kırıkkale Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır ve -20°C'de saklanmıştır. Bu çalışmada da DNA izolasyonları daha önceden yapılan ve -20°C'de muhafaza edilen bu stok DNA örnekleri kullanılmıştır.

2.1.2. Referans Mikroorganizma

Bu çalışma için referans mikroorganizma olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanılmıştır.

2.1.3. Tampon ve Çözeltiler

Bu çalışmada, TAE tamponu, bromofenol mavisi (Carlo ERBA), etidyum bromür, agaroz (Sigma) kimyasal maddeleri kullanılmıştır.

Taq polimeraz tamponu, nükleotid karışımı (dNTP mix) ve Taq polimeraz Thermo Fisher Scientific Dream marka kullanılmıştır.

2.1.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

- Taq polimeraz tamponu 10x: 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 1 mg/mL jelatin.
- MgCl₂ : 20 mM
- Nükleotit Karışımı: 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- Taq polimeraz: 5 u/ µL
- Primerler: Kullanılan primerler Çizelge 2.1. ve Çizelge 2.2.'de verilmiştir

Çizelge 2.1. *Escherichia coli* virülans genleri ve PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri.

Protein	Virülans Gen	Primer dizisi (5'→3' yönü)	Amplikon Boyutu (bç)	Referans
Ferrik Aerobaktin Reseptörü	<i>iutA</i>	F: GGCTGGACATCATGGAACTGG R: CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	[140]
P Fimbria	<i>papC</i>	F: TGATATCACGCAGTCAGTAGC R: CCGGCCATATTCACATAAC	501	[141]
Bakteriyel Selüloz Sentaz Proteini	<i>bcsA</i>	F: GCTTCTCGGCGCTAATGTTG R: GAGGTATAGCCACGACGGTG	816	[141]
Lipoprotein	<i>iss</i>	F: GTGGCGAAAAGTAGTAAAACA GC R: CGCCTCGGGGTGGATAA	760	[142]
Transketolaz	<i>tkt1</i>	F: CTTACGGCGGTA CTTTCCTG R: GTACGCCGCATCCTGATTAT	300	[143]
Shiga toksini	<i>rfbE₀₁₅₇</i>	F: CGGACATCCATGTGATATGG R: TTGCCTATGTACAGCTAATCC	259	[144]

Çizelge 2.2. *Escherichia coli* antimikrobiyal direnç genleri ve PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri ve elde edilen PCR ürünlerinin uzunlukları

Antimikrobiyal Ajan	Antimikrobiyal Direnç Geni	Primer dizisi (5'→3' yönü)	Amplikon boyutu (bp)	Referans
Beta-Laktam	<i>bla_{CMY-2}</i>	F: GACAGCCTCTTTCTCCACA R: TG GAACGAAGGCTACGTA	1000	[145]
Tetrasiklin	<i>tetB</i>	F: CTCAGTATTCCAAGCCTTTG R: CTAAGCACTTGTCTCCTGTT	416	[145]
Aminoglikozid	<i>aac(6')-Ib</i>	F: TTGCGATGCTCTATGAGTG GCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGT TT	482	[145]
Kinolon	<i>qnrA</i>	F: ATTTCTCACGCCAGGATT TG R: GATCGGCAAAGGTTAGGT CA	516	[145]

2.1.3.2. Agaroz Jel Elektrofrezisi İçin Kullanılan Çözeltiler

- Agaroz: %2'lik (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.
- Tris asetat (TAE) tamponu (x50) (pH 8): 242 g Tris base, 57,1 mL Glisial asetik asit, 0,5 M 100 ml EDTA (pH 8), saf su.
- Yükleme tamponu: %40 sukroz, %0,025 bromofenol mavisi, %0,25 ksilen siyanol.
- Etidyum bromür: 10 mg/mL derişimde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

2.1.3.3. Sterilizasyon

Steril kullanılması gereken tüm tampon ve çözeltiler için 121°C'de 20 dakika sterilizasyon işlemi uygulanmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR uygulamaları için Çizelge 2.1. ve Çizelge 2.2.'de baz dizimleri verilen primerlerin her biri ile hedef DNA'nın amplifiye olması beklenen bölgeleri çoğaltılmıştır. Tüm PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR karışımları 50 µL toplam hacimde, 50mM 10X Taq tampon çözeltisi, 20 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 0,4 pmol ileri primer (F), 0,4 pmol geri primer (R), 1 U Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific Dream), 20 ng DNA olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. *Escherichia coli* virülans faktör genleri ve antimikrobiyal direnç genleri analizinde kullanılan PCR amplifikasyon programları ise Çizelge 2.3.'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. *Escherichia coli* virülans faktör genleri ve antimikrobiyal direnç genleri analizinde kullanılan PCR amplifikasyon programları.

Primerler	Ön Denatürasyon	Denatürasyon	Primerlerin Bağlanması	Uzama	Son Uzama	Döngü Sayısı
<i>iutA</i>	94°C, 4 dakika	94°C, 30 saniye	60°C, 1 dakika	68°C, 2 dakika	72°C, 7 dakika	30
<i>papC</i>	95°C, 3 dakika	94°C, 30 saniye	60°C, 30 saniye	72°C, 1 dakika	72°C, 5 dakika	30
<i>bcsA</i>	95°C, 3 dakika	94°C, 30 saniye	60°C, 30 saniye	72°C, 1 dakika	72°C, 5 dakika	30
<i>iss</i>	Yok	94°C, 1 dakika	61°C, 1 dakika	72°C, 2 dakika	Yok	30
<i>tkl1</i>	94°C, 4 dakika	94°C, 30 saniye	55°C, 30 saniye	72°C, 2 dakika	72°C, 10 dakika	30
<i>rfbE_{O157}</i>	95°C, 1 dakika	95°C, 1 dakika	65°C, 1 dakika	72°C, 90 saniye	72°C, 5 dakika	35
<i>bla_{CMY-2}</i>	94°C, 15 dakika	94°C, 1 dakika	55 °C, 1 dakika	72°C, 1 dakika	72°C, 10 dakika	30
<i>tetB</i>	94°C, 5 dakika	94°C, 30 saniye	53,1°C, 40 saniye	72°C, 40 saniye	Yok	30
<i>aac(6')-Ib</i>	94°C, 5 dakika	94°C, 30 saniye	55°C, 40 saniye	72°C, 40 saniye	Yok	30
<i>qnrA</i>	94°C, 5 dakika	94°C, 30 saniye	59°C, 40 saniye	72°C, 40 saniye	Yok	30

Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi için –20°C’da saklanmıştır.

2.2.2. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

Kullanılan elektroforez (BIORAD) yatay konumda olup jel plaklarının büyüklüğü 70x70 mm'dir. %2 (w/v) agaroz, TAE tamponu içinde kaynatılarak çözüldükten sonra etidyum bromür çözeltisi eklenmiş ve plağa dökülmüştür. Jel polimerleştikten sonra 0,2 mL tüplerde oluşturulan 50 µL'lik PCR ürünlerinden 12'ser µL pipet yardımıyla alınıp, 3 µL 6x loading dye ile karıştırılmıştır. Oluşturulan karışımın tamamı alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklenmiştir. Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve marker (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder) yükleme yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 90 V serbest akımda yürütülmüştür. Elektroforez işleminin ardından yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirilmiş ve UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları değerlendirilmiştir.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada Bolu ilinde bulunan çeşitli yerlerden toplanarak izole edilen 37 kıyma, 29 et, 135 tavuk ve 82 peynire ait toplam 283 *E. coli* izolatında *iutA*, *papC*, *bcsA*, *iss*, *tkl1* ve *rfbE₀₁₅₇* virülans faktör genlerini ve *bla_{CMY-2}*, *tetB*, *aac(6')-Ib*, *qnrA* antibiyotik direnç genlerini saptamak için Çizelge 2.1. ve Çizelge 2.2.'de verilen spesifik primer dizilerini ve Çizelge 2.3.'te verilen PCR programlarını kullanılarak PCR yapılmıştır. PCR sonucunda *E. coli* suşlarında tespit edilen virülans faktör ve antibiyotik direnç genlerinin toplu sonuçları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *E. coli* suşlarında tespit edilen virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin sonuçları.

Suş No	Virülans Faktör Geni						Antibiyotik Direnç Geni			
	<i>bcsA</i>	<i>iutA</i>	<i>tkl1</i>	<i>papC</i>	<i>iss</i>	<i>rfbE₀₁₅₇</i>	<i>tetB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>qnrA</i>	<i>bla_{CMY-2}</i>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
K1	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
K2	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K3	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K4	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K5	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K6	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
K8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
K9	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+
K10	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+
K11	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+

Çizelge 3.1. (devam) *E. coli* suşlarında tespit edilen virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin sonuçları.

Suş No	Virülans Faktör Geni						Antibiyotik Direnç Geni			
	<i>bcsA</i>	<i>iutA</i>	<i>tkl1</i>	<i>papC</i>	<i>iss</i>	<i>rfbE_{O157}</i>	<i>tetB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>qnrA</i>	<i>bla_{CMY-2}</i>
K12	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K13	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K14	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
K15	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K16	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K17	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
K18	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K19	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K20	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K21	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
K22	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
K23	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
K24	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K25	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K26	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
K27	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K28	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
K29	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
K30	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
K31	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
K32	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
K33	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
K34	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K35	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K36	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K37	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+

Çizelge 3.1. (devam) *E. coli* suşlarında tespit edilen virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin sonuçları.

Suş No	Virülans Faktör Geni						Antibiyotik Direnç Geni			
	<i>bcsA</i>	<i>iutA</i>	<i>tkl1</i>	<i>papC</i>	<i>iss</i>	<i>rfbE_{O157}</i>	<i>tetB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>qnrA</i>	<i>bla_{CMY-2}</i>
T38	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
T39	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
T40	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
T41	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
T42	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
T43	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
T44	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
T45	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
T46	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
T47	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
T48	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
T49	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
T50	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
T51	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
T52	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
T53	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
T54	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
T55	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
T56	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
T57	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T58	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
T59	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
T60	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T61	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T62	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
T63	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-

Çizelge 3.1. (devam) *E. coli* suşlarında tespit edilen virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin sonuçları.

Suş No	Virülans Faktör Geni						Antibiyotik Direnç Geni			
	<i>bcsA</i>	<i>iutA</i>	<i>tkl1</i>	<i>papC</i>	<i>iss</i>	<i>rfbE₀₁₅₇</i>	<i>tetB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>qnrA</i>	<i>bla_{CMY-2}</i>
T64	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
T65	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
T66	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T67	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
T68	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T69	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T70	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T71	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
T72	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
T73	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
T74	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
T75	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T76	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
T77	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
T78	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
T79	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
T80	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
T81	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
T82	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
T83	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T85	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
T86	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
T87	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
T88	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
T89	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+

Çizelge 3.1. (devam) *E. coli* suşlarında tespit edilen virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin sonuçları.

Suş No	Virülans Faktör Geni						Antibiyotik Direnç Geni			
	<i>bcsA</i>	<i>iutA</i>	<i>tkl1</i>	<i>papC</i>	<i>iss</i>	<i>rfbE₀₁₅₇</i>	<i>tetB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>qnrA</i>	<i>bla_{CMY-2}</i>
T90	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
T91	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
T92	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
T93	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
T94	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
T95	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
T96	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
T97	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
T98	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
T99	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
T100	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
T101	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
T102	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
T103	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
T104	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
T105	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+
T106	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
T107	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
T108	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
T109	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
T110	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
T111	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
T112	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+
T113	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+
T114	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
T115	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-

Çizelge 3.1. (devam) *E. coli* suşlarında tespit edilen virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin sonuçları.

Suş No	Virülans Faktör Geni						Antibiyotik Direnç Geni			
	<i>bcsA</i>	<i>iutA</i>	<i>tkl1</i>	<i>papC</i>	<i>iss</i>	<i>rfbE₀₁₅₇</i>	<i>tetB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>qnrA</i>	<i>bla_{CMY-2}</i>
T116	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
T117	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
T118	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
T119	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
T120	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
T121	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
T122	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
T123	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
T124	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
T125	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
T126	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
T127	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+
T128	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
T129	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
T130	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T131	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
T132	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
T133	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
T134	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
T135	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
T136	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
T137	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
T138	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
T139	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T140	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T141	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-

Çizelge 3.1. (devam) *E. coli* suşlarında tespit edilen virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin sonuçları.

Suş No	Virülans Faktör Geni						Antibiyotik Direnç Geni			
	<i>bcsA</i>	<i>iutA</i>	<i>tkl1</i>	<i>papC</i>	<i>iss</i>	<i>rfbE_{O157}</i>	<i>tetB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>qnrA</i>	<i>bla_{CMY-2}</i>
T142	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
T143	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
T144	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
T145	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
T146	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
T147	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+
T148	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
T149	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T150	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
T151	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
T152	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
T153	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
T154	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
T155	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
T156	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
T157	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
T158	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
T159	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T160	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T161	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
T162	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
T163	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T164	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T165	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
T166	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T167	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-

Çizelge 3.1. (devam) *E. coli* suşlarında tespit edilen virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin sonuçları.

Suş No	Virülans Faktör Geni						Antibiyotik Direnç Geni			
	<i>bcsA</i>	<i>iutA</i>	<i>tkl1</i>	<i>papC</i>	<i>iss</i>	<i>rfbE_{O157}</i>	<i>tetB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>qnrA</i>	<i>bla_{CMY-2}</i>
T168	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T169	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T170	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
T171	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
T172	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
E173	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E174	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
E175	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
E176	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
E177	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
E178	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
E179	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
E180	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
E181	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
E182	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
E183	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
E184	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
E185	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
E186	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
E187	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
E188	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
E189	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
E190	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
E191	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
E192	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E193	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 3.1. (devam) *E. coli* suşlarında tespit edilen virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin sonuçları.

Suş No	Virülans Faktör Geni						Antibiyotik Direnç Geni			
	<i>bcsA</i>	<i>iutA</i>	<i>tkl1</i>	<i>papC</i>	<i>iss</i>	<i>rfbE₀₁₅₇</i>	<i>tetB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>qnrA</i>	<i>bla_{CMY-2}</i>
E194	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E195	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E196	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E197	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E198	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E199	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E200	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E201	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P202	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P203	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P204	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P205	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P206	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P207	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P208	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P209	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P210	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P211	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P212	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P213	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P214	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P215	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P216	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P217	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P218	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P219	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 3.1. (devam) *E. coli* suşlarında tespit edilen virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin sonuçları.

Suş No	Virülans Faktör Geni						Antibiyotik Direnç Geni			
	<i>bcsA</i>	<i>iutA</i>	<i>tkl1</i>	<i>papC</i>	<i>iss</i>	<i>rfbE₀₁₅₇</i>	<i>tetB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>qnrA</i>	<i>bla_{CMY-2}</i>
P220	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P221	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P222	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P223	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P224	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P225	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
P226	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P227	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P228	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P229	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P230	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P231	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P232	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P233	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P234	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P235	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P236	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P237	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P238	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P239	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P240	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P241	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P242	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P243	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
P244	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
P245	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 3.1. (devam) *E. coli* suşlarında tespit edilen virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin sonuçları.

Suş No	Virülans Faktör Geni						Antibiyotik Direnç Geni			
	<i>bcsA</i>	<i>iutA</i>	<i>tkl1</i>	<i>papC</i>	<i>iss</i>	<i>rfbE₀₁₅₇</i>	<i>tetB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>qnrA</i>	<i>bla_{CMY-2}</i>
P246	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
P247	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P248	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P249	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P250	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P251	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P252	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P253	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P254	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
P255	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
P256	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
P257	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P258	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P259	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
P260	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
P261	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
P262	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
P263	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P264	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
P265	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
P266	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
P267	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P268	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P269	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P270	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P271	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-

Çizelge 3.1. (devam) *E. coli* suşlarında tespit edilen virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin sonuçları.

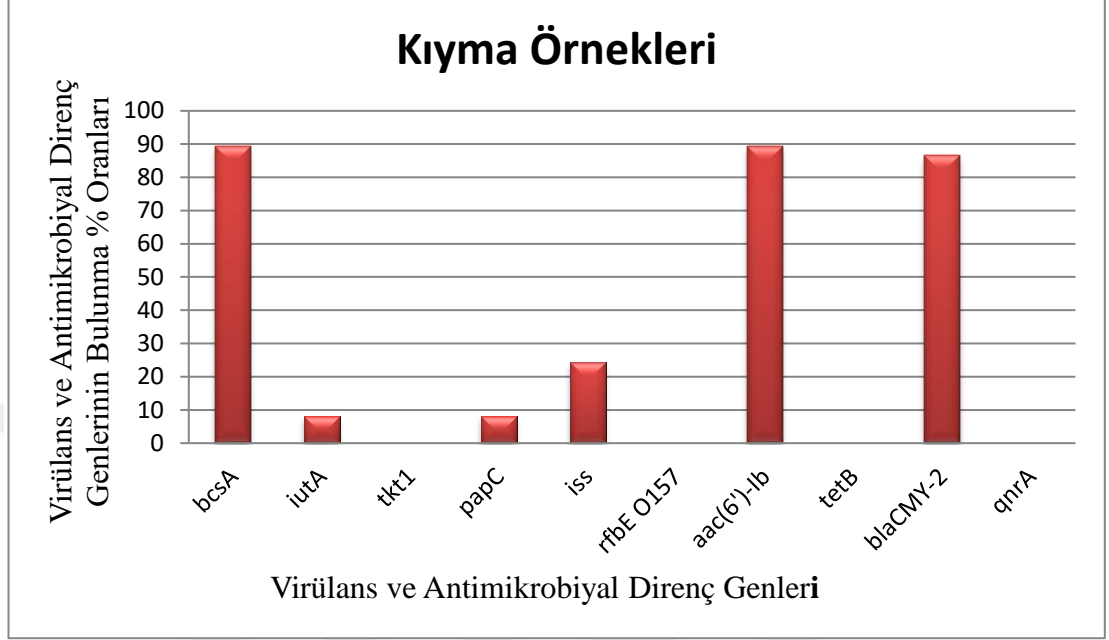
Suş No	Virülans Faktör Geni						Antibiyotik Direnç Geni			
	<i>bcsA</i>	<i>iutA</i>	<i>tkl1</i>	<i>papC</i>	<i>iss</i>	<i>rfbE_{O157}</i>	<i>tetB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>qnrA</i>	<i>bla_{CMY-2}</i>
P272	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
P273	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
P274	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
P275	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
P276	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
P277	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P278	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P279	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
P280	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P281	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P282	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
P283	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-

*Çizelgede K1- K37 numaralı örnekler Kıyma, T38-T172 numaralı örnekler Tavuk, E173-E201 numaralı örnekler Et, P202-P283 numaralı örnekler Peynir olarak numaralandırılmıştır. *E. coli* suşlarında tespit edilen virülans faktör genleri ve antibiyotik direnç genleri “+ “ olarak işaretlenmiştir.

3.1. *E. coli* Kıyma Örneklerinin PCR Sonuçları

İncelenen 283 *E. coli* suşundan 37 kıyma izolatının spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonuçlarına göre; 37 kıyma izolatının 33 (%89,2)'ünde 826 bç uzunluğunda *bcsA*, 3 (%8,1)'ünde 302 bç uzunluğunda *iutA*, 3 (%8,1)'ünde 501 bç uzunluğunda *papC*, 9 (%24,3)'ünde 760 bç uzunluğunda *iss*, virülans genleri, 33 (%89,2)'sinde 300 bç uzunluğunda *aac(6')-Ib*, 32 (%86,48)'sinde 1000 bç uzunluğunda *bla_{CMY-2}*, antimikrobiyal direnç genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. *tkl1*, *RfbE_{O157}* virülans faktör genleri ve *tetB*, *qnrA* antimikrobiyal direnç genleri ise çalışılan kıyma izolatlarının hiçbirinde tespit edilememiştir.

İzolatlardaki virülans faktör genleri ve antimikrobiyal direnç genlerinin % oranları Şekil 3.1.'de verilmiştir.

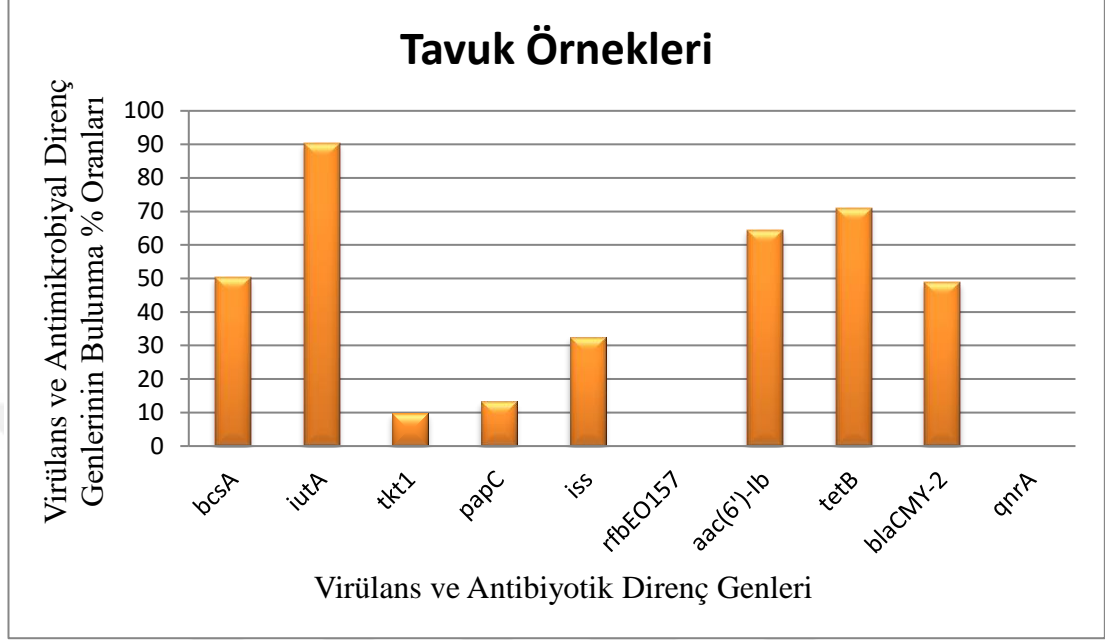


Şekil 3.1. 37 *E. coli* kıyma örneğindeki virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin % oranları

3.2. *E. coli* Tavuk Örneklerinin PCR Sonuçları

İncelenen 283 *E. coli* suşundan 135 tavuk izolatının spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonuçlarına göre; 135 tavuk izolatının 67 (%50,3)'sinde 826 bp uzunluğunda *bcsA*, 122 (%90,37)'sinde 302 bp uzunluğunda *iutA*, 13 (%9,62)'ünde 500 bp uzunluğunda *tkt1*, 18 (%13,3)'inde 501 bp uzunluğunda *papC*, 44 (%32,59)'ünde 760 bp uzunluğunda *iss* virülans genleri, 96 (%71,1)'sında 416 bp uzunluğunda *tetB*, 87 (%64,4)'sinde 300 bp uzunluğunda *aac(6)-Ib*, 66 (%48,8)'sında 1000 bp uzunluğunda *bla_{CMY-2}* antimikrobiyal direnç genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. *RfbE_{O157}* virülans faktör ve *qnrA* antimikrobiyal direnç genleri ise çalışılan tavuk izolatlarının hiçbirinde tespit edilememiştir.

İzolatlardaki virülans faktör genleri ve antimikrobiyal direnç genlerinin % oranları Şekil 3.2.'de verilmiştir.

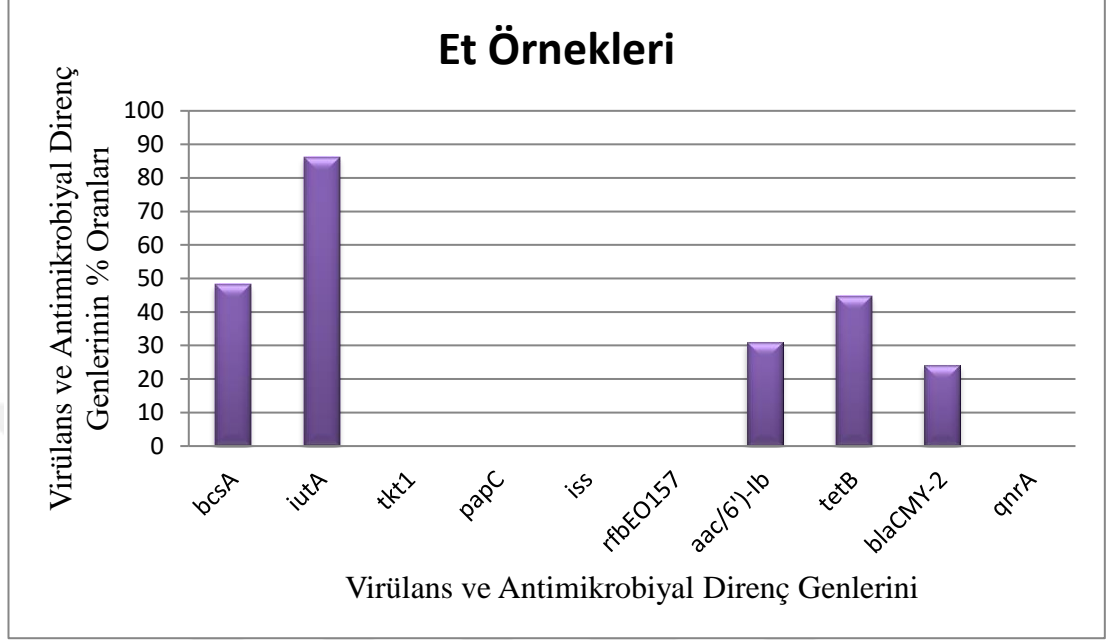


Şekil 3.2. 135 *E. coli* tavuk örneğindeki virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin % oranları

3.3. *E. coli* Et Örneklerinin PCR Sonuçları

İncelenen 283 *E. coli* suşundan 29 et izolatının spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonuçlarına göre; 29 tavuk izolatının 14 (%48,27)'ünde 826 bç uzunluğunda *bcsA*, 25 (%86,20)'inde 302 bç uzunluğunda *iutA* virülans genleri, 13 (%44,82)'ünde 416 bç uzunluğunda *tetB*, 9 (%31,03)'unda 300 bç uzunluğunda *aac(6)-Ib*, 7 (%24,13)'sinde 1000 bç uzunluğunda *bla_{CMY-2}* antimikrobiyal direnç genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. *tkt1*, *papC*, *iss*, *RfbE_{O157}* virülans faktör ve *qnrA* antimikrobiyal direnç genleri ise tespit edilememiştir.

İzolatlardaki virülans faktör genleri ve antimikrobiyal direnç genlerinin % oranları Şekil 3.3.'de verilmiştir.

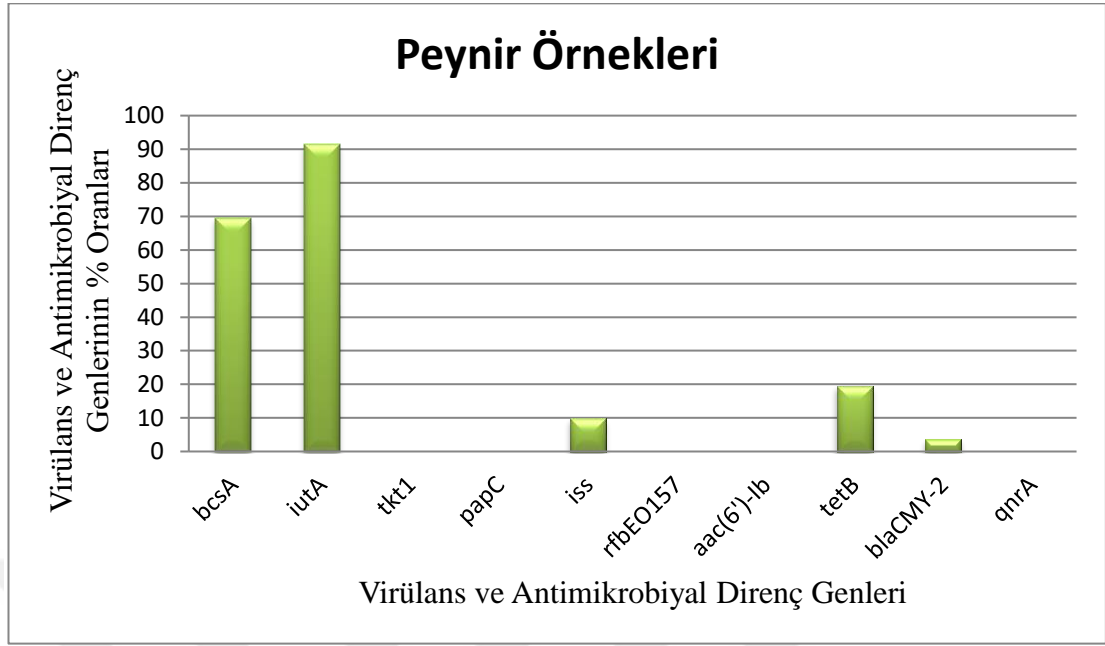


Şekil 3.3. 29 *E. coli* et örneğindeki virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin % oranları

3.4. *E. coli* Peynir Örneklerinin PCR Sonuçları

İncelenen 283 *E. coli* suşundan 82 peynir izolatının spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonuçlarına göre; 82 tavuk izolatının 57 (%69,51)'sinde 826 bç uzunluğunda *bcsA*, 75 (%91,46)'inde 302 bç uzunluğunda *iutA*, 8 (%9,75)'inde 760 bç uzunluğunda *iss* virülans genleri, 16 (%19,51)'sında 416 bç uzunluğunda *tetB*, 3 (%3,65)'ünde 1000 bç uzunluğunda *blaCMY-2* antimikrobiyal direnç genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. *tkt1*, *papC*, *rfbEO157* virülans faktör ve *aac(6')-Ib*, *qnrA* antimikrobiyal direnç genleri ise çalışılan peynir izolatlarının hiçbirinde tespit edilememiştir.

İzolatlardaki virülans faktör genleri ve antimikrobiyal direnç genlerinin % oranları Şekil 3.4.'de verilmiştir.



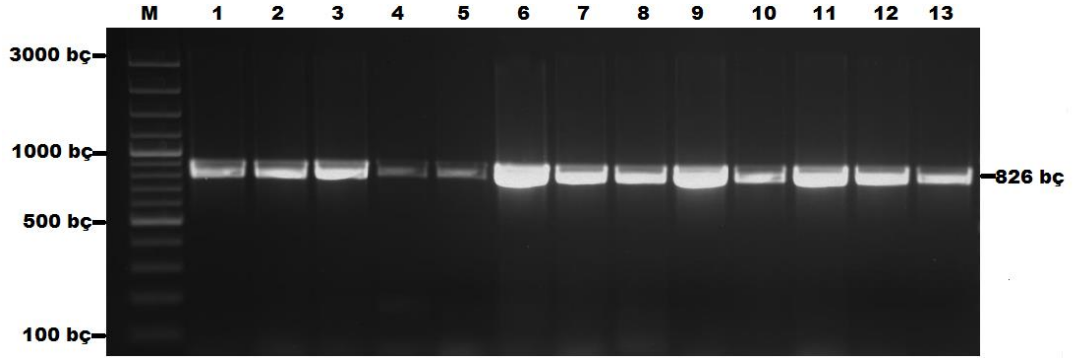
Şekil 3.4. 82 *E. coli* peynir örneğindeki virülans faktör ve antimikrobiyal direnç genlerinin % oranları

Çizelge 3.2. 283 *E. coli* suşunda tespit edilen antibiyotik direnç ve virülans genlerinin kıyma, et, tavuk ve peynir örneklerindeki yüzde (%) dağılımı

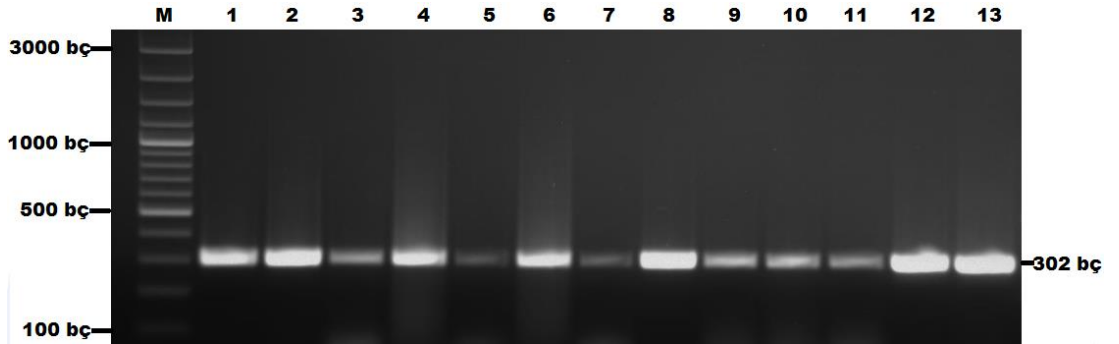
	Kıyma (37)	Tavuk (135)	Et (29)	Peynir (82)	ATCC 25922	TOPLAM (283)
<i>bcsA</i>	33 (%89,2)	68 (%50,3)	14 (%48,27)	57 (%69,51)	+	172 (%60,78)
<i>iutA</i>	3 (%8,1)	122 (%90,37)	25 (%86,20)	75 (%91,46)	+	225 (%79,5)
<i>papC</i>	3 (%8,1)	18 (%13,3)	-	-	+	21 (%7,4)
<i>tkt1</i>	-	13 (%9,62)	-	-	+	13 (%4,6)
<i>iss</i>	9 (%24,3)	44 (%32,59)	-	8 (%9,75)	+	61 (%21,5)
<i>rfbE0157</i>	-	-	-	-	-	0
<i>tetB</i>	-	96 (%71,1)	13 (%44,82)	16 (%19,51)	+	125 (%44,1)
<i>qnrA</i>	-	-	-	-	-	0
<i>aac(6')-Ib</i>	33 (%89,2)	87 (%64,4)	9 (%31,03)	-	+	120 (%45,6)
<i>blaCMY-2</i>	32 (%86,48)	66 (%48,8)	7 (%24,13)	3 (%3,65)	+	108 (%38,2)

3.5. *E. coli* İzolatlarının PCR Amplifikasyonu Sonucu Elde Edilen Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçları

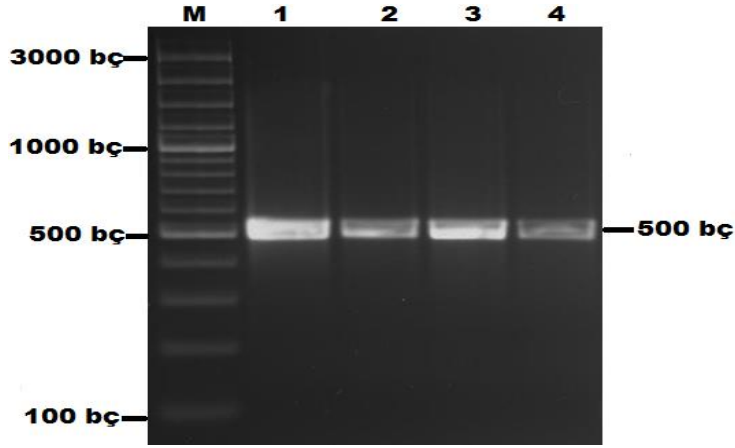
Çalışmamızda kullanılan virülans ve antibiyotik direnç genlerinin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi sonuçları Şekil 3.5 - Şekil 3.12'de verilmiştir.



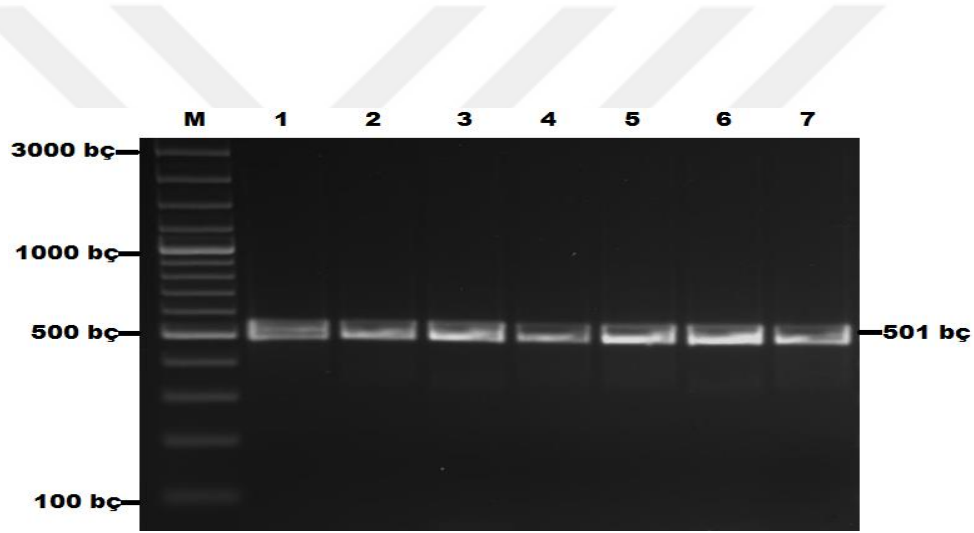
Şekil 3.5. *E. coli* izolatlarındaki *bcsA* geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M; marker, 1; ATCC 25922, 2-4; et, 5-7; kıyma, 8-10; tavuk, 11-13; peynir



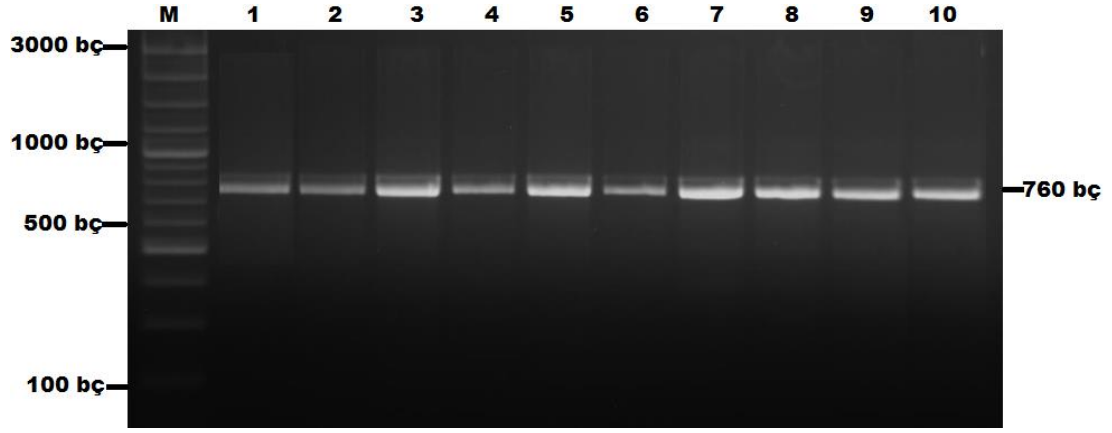
Şekil 3.6. *E. coli* izolatlarındaki *iutA* geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M; marker, 1; ATCC 25922, 2-4; et, 5-7; kıyma, 8-10; tavuk, 11-13; peynir



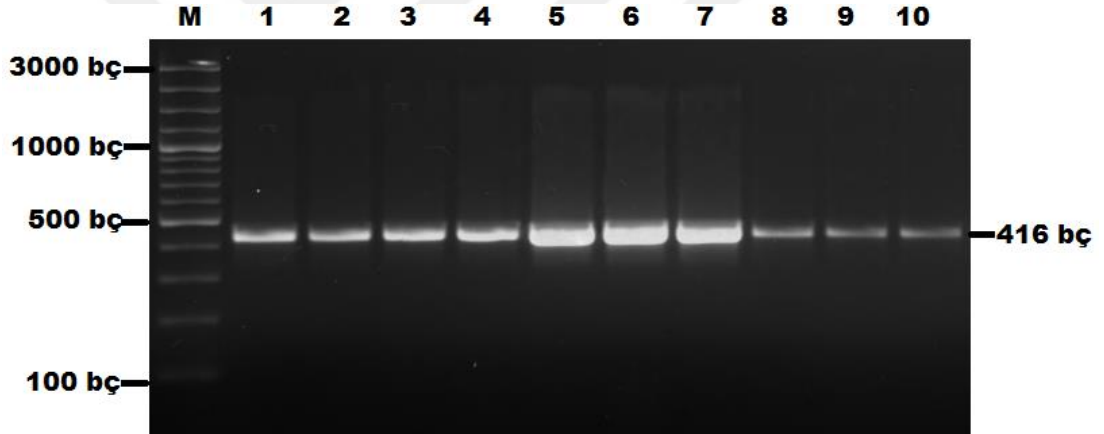
Şekil 3.7. *E. coli* izolatlarındaki *tkt1* geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M; marker, 1; ATCC 25922, 2-4; tavuk



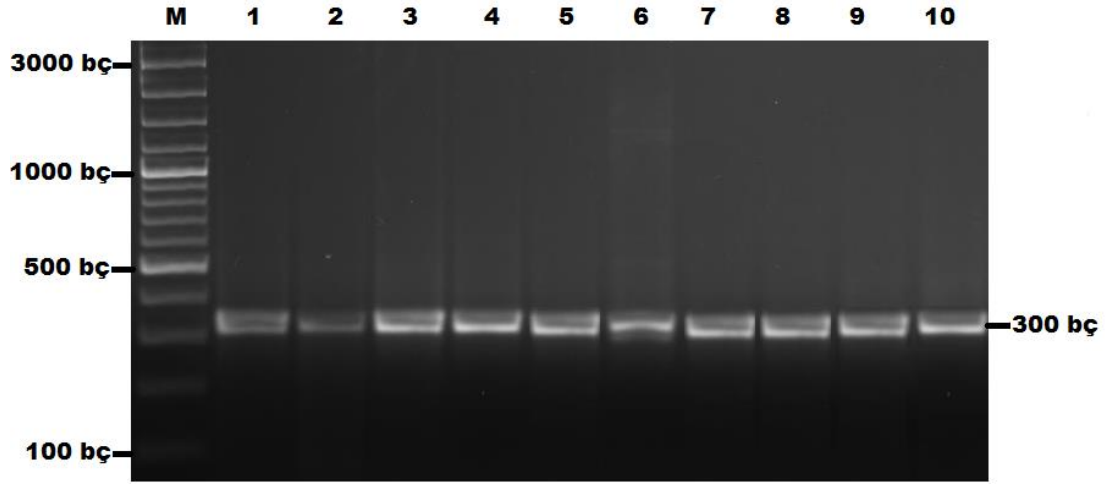
Şekil 3.8. *E. coli* izolatlarındaki *papC* geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M; marker, 1; ATCC 25922, 2-4; kıyma, 5-7; tavuk



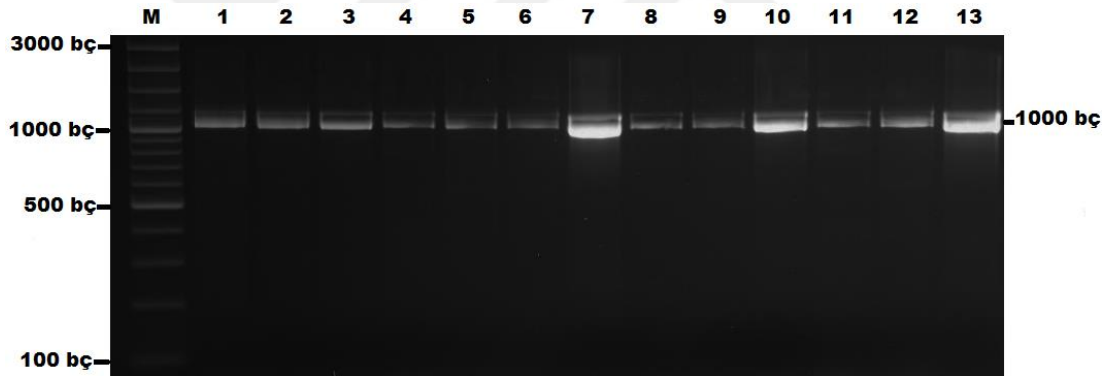
Şekil 3.9. *E. coli* izolatlarındaki *iss* geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M; marker, 1; ATCC 25922, 2-4; kıyma, 5-7; tavuk, 8-10; peynir



Şekil 3.10. *E. coli* izolatlarındaki *tetB* geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M; marker, 1; ATCC 25922, 2-4; et, 5-7; tavuk, 8-10; peynir



Şekil 3.11. *E. coli* izolatlarındaki *aac(6')-Ib* geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M; marker, 1; ATCC 25922, 2-4; et, 5-7; kıyma, 8-10; tavuk



Şekil 3.12. *E. coli* izolatlarındaki *bla_{CMY-2}* geninin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M; marker, 1; ATCC 25922, 2-4; et, 5-7; kıyma, 8-10; tavuk, 11-13; peynir

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

İnsanların yaşamlarını sürdürebilmeleri ve sağlıklı olabilmeleri için her gün yeterli miktarda gıda almaları gerekmektedir. Bu yüzden alınan bu gıdaların güvenliği oldukça önemlidir. Fakat gıda güvenliği son zamanlarda dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Yapılan çalışmalar, çoğu bulaşıcı olan ve çeşitli bakterilerin neden olduğu gıda kaynaklı 250'den fazla hastalık tespit etmiştir. Gıda kaynaklı bakteriyel hastalıklar, özellikle gelişmekte olan ülkelerde endişe verici bir şekilde artmaya başlamıştır [146].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2015 yılında, gıda kaynaklı hastalıkların insanlarda görülme sıklığını ve 2017 yılında da bu hastalıklara neden olan gıda kaynaklarını belirli gıda gruplarına bağlamıştır. WHO her yıl 600 milyon insanın gıda kaynaklı hastalıklar nedeniyle hastalandığını ve bu hastaların yaklaşık 435000'inin öldüğünü tahmin etmektedir. Bu gıda kaynaklı hastalıkların %38'inin hayvansal kaynaklı gıdalardan, %12'sinin ise süt ürünlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [147].

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de gıda kaynaklı hastalıklar ciddi oranlarda hastalıklara ve ekonomik kayıplara neden olan bir halk sağlığı sorunudur. Gelişmiş ülkelerin aksine, Türkiye gibi gelişmekte olan ülkeler veya gelişmemiş ülkelerde bu konuda tutulan istatistikler ve vaka bildirimleri için yeterli bir çalışma ne yazık ki bulunmamaktadır [148, 149].

Gıda kaynaklı hastalıkların epidemiyolojisi, bilinen patojenlerin (*Salmonella spp.*, *Escherichia coli O157: H7/H* , *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica*, vb.) prevansta artması ve yeni tanınan patojenlerin ortaya çıkması ile hızla değişmektedir. [150, 151, 152]. *Escherichia coli* bakterisi hayvansal kaynaklı gıdalarda yaygın olarak bulunan bir bakteri çeşididir ve sahip olduğu virülans faktörleriyle insanlarda ve hayvanlarda birçok hastalığa sebep olmaktadır. *E. coli* bakterisinin sahip olduğu virülans faktörleri sıklıkla adezinler (P fimbria, bazı diğer mannoz dirençli adezinler ve tip 1 fimbria), aerobaktin sistemi, hemolizin, K kapsülü ve serum öldürmeye karşı direnç göstermektedirler [73, 153].

Son yıllarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) belirli bir genin veya patojenik bir organizmanın tür düzeyinde tespiti için sıklıkla kullanılmaktadır. PCR, diğer moleküler tespit tekniklerine kıyasla, patojenleri ve hedef genleri daha etkili, hızlı ve doğru bir şekilde tespit etme yeteneğine sahiptir [152].

Yapılan bu tez çalışması kapsamında *E. coli* mikroorganizmasında yer alan bazı önemli virülans genlerden; gram negatif bakterilerde demir alımını sağlayan *iutA* geni, üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan ve P fimbriyalarını kodlayan *papC* geni, selüloz sentezi ile ilişkili ve biyofilm oluşumunda rol oynayan *bcsA* geni, serum direncinde rol oynayan *iss* geni, insan ExPEC suşlarında bir patojenik adada bulunarak bu suşların virülanslığına katkıda bulunduğunu gösteren transketolaz 1 (*tkt1*) geni ve genellikle kanlı diyare, hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom gibi ciddi klinik belirtilerle ilişkilendirilen shiga toksin üreten *rfbE_{O157}* genlerinin varlığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi ile tespit edilmeye çalışılmıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre Bolu ilinde bulunan çeşitli yerlerden toplanarak izole edilen 37'si kıyama, 29'u et, 135'i tavuk ve 82'si peynire ait olan toplam 283 *E. coli* izolatında;

iutA geni; kıyama izolatlarının %8,1 (3)'ünde, tavuk izolatlarının %90,37 (122)'sinde, et izolatlarının %86,20 (25)'sinde, peynir izolatlarının %91,46 (75)'sında,

papC geni; kıyama izolatlarının %8,1 (3)'ünde, tavuk izolatlarının %13,3 (18)'ünde,

bcsA geni; kıyama izolatlarının %89,18 (33)'ünde, tavuk izolatlarının %50,3 (68)'ünde, et izolatlarının %48,27 (14)'sinde, peynir izolatlarının %69,51 (57)'inde,

iss geni; kıyama izolatlarının %24,3 (9)'ünde, tavuk izolatlarının %32,59 (44)'unda, peynir izolatlarının %9,75 (8)'inde,

tkt1 geni; tavuk izolatlarının %9,62 (13)'sinde tespit edilmiştir.

rfbE_{O157} geni ise hiçbir izolatta tespit edilememiştir.

Elde edilen bu sonuçlara göre; *iutA* geni virülans genler arasında tavuk, et ve peynir izolatlarında en fazla tespit edilen gen olurken, *bcsA* geni ise virülans genler arasında kıyma izolatlarında en fazla tespit edilen gen olmuştur. *tkl1* geni sadece tavuk izolatlarında tespit edilmiştir ve virülans genler arasında tavuk izolatlarında en az tespit edilen gen olmuştur. *rfbEO157* geni ise çalışılan hiçbir izolatta tespit edilememiştir. *rfbEO157* geninin hiçbir izolatta bulunamaması çalıştığımız gıda örneklerinin *Shiga* toksini içermediğini göstermektedir.

Subedi vd. (2018)'nin yapmış oldukları çalışmada Nepal'in Chitwan ilinde tavuklardan izole edilen *E. coli* suşlarında *iutA*, *iss* ve *papC* virülans genlerinin varlığını analiz etmişler ve 50 *E. coli* suşunun 38 (%76)'inde *iutA* genini, 45 (%90)'inde *iss* genini ve 25 (%50)'inde *papC* genini PCR yöntemi ile tespit etmişlerdir. Bu çalışmada Nepal'in Chitwan ilinde kolibakillöz şüpheli piliçlerden izole edilen APEC suşlarında yüksek sıklıkta bulunan virülans genlerini göstermişlerdir [140]. Subedi vd. (2018) elde ettikleri bu sonuçları, bu tez çalışmasıyla karşılaştırdığımızda *papC* geninin her iki çalışmada da diğer genlere (*iutA* ve *iss*) kıyasla daha düşük oranda tespit edildiğini görmekteyiz. Yaptığımız tez çalışmasında 135 tavuk izolatının; 122 (%90,37)'sinde *iutA* geni, 44 (%32,59)'ünde *iss* geni, 18 (%13,3)'inde ise *papC* geni tespit edilmiştir.

Altalhi vd. (2009)'nin yapmış oldukları bir çalışmada Suudi Arabistan'ın Taif bölgesinden toplanan 33 çiğ süt ve süt ürününden ExPEC suşlarını izole etmişler ve 33 ExPEC suşunun 11 (%33,3)'inde *iutA* geninin varlığını PCR yöntemi ile tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmanın sonucunda sağım ve daha sonra ki işlemlerde yetersiz hijyen koşulları nedeniyle numunelerin yoğun biçimde kirlendiğini bildirmişlerdir [153]. Bu tez çalışmasında ise *iutA* geni 82 peynir izolatının 75 (%91,46)'inde tespit edilmiştir. Sonuçlar bizim örneklerimizin de yoğun bir şekilde kontaminasyona maruz kaldığını göstermektedir.

Kwon vd. (2008)'nin yapmış olduğu bir çalışma da ise Kore'de tavuk örneklerinden toplam 216 *E. coli* suşu izole etmişler ve 216 *E. coli* izolatının 5 (%2,3)'inde *papC* geninin, 113 (%52,3)'ünde *iss* geninin varlığını PCR yöntemi ile tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışma ile Kore'de bulunan bazı tavuk çiftlikleri ve kuluçkahanelerdeki

APEC kontaminasyonunun varlığını göstermişlerdir [154]. Yapılan bu çalışmayı bizim tez çalışmamızla karşılaştırdığımızda, bizim çalışmamızda; *iss* geni oranının benzer olduğunu, *papC* geninin ise daha yüksek oranlarda tespit edildiğini görmekteyiz. Yaptığımız bu tez çalışmasında 135 tavuk izolatinin; 44 (%32,59)'ünde *iss* geni, 18 (%13,3)'inde ise *papC* geni tespit edilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada; De Carli vd. (2015) Brezilya'nın farklı bölgelerinden aldıkları tavuk ve hindi etinden 138 *E. coli* suşu izole etmişlerdir. 138 *E. coli* izolatinin 72 (%52,2)'sinde *iutA* geninin, 79 (%57,2)'unda *iss* geninin varlığını PCR yöntemi ile tespit etmişlerdir. Bu çalışmada De Carli vd. (2015) APEC suşlarının kolibakilloza neden olma yeteneği ile doğrudan ilişkili olan faktörleri kodlayan virülans genleri taşıdığını göstermişlerdir [155]. Bu çalışmada da tavuk izolatlarımız bakımından *iutA* geninin (%90,37) daha yüksek, *iss* geninin (%32,5) ise daha az tespit edildiğini görmekteyiz.

Xia vd. (2011) yapmış olduğu bir çalışmada; Georgia, Maryland, Oregon ve Tennessee eyaletlerinden aldıkları dana kıyma, hindi kıyma, tavuk göğsü ve domuz pirzolasından toplam 1275 ExPEC suşu izole etmişlerdir. Domuz pirzolasından izole edilen 180 *E. coli* izolatinin 13 (%7,2)'ünde *papC* geninin, 33 (%18,3)'ünde *iutA* geninin, hindi kıymasından izole edilen 387 *E. coli* izolatinin 53 (%13,7)'ünde *papC* geninin, 207 (%53,2)'sinde *iutA* geninin, tavuk göğsünden izole edilen 415 *E. coli* izolatinin 44 (%10,6)'ünde *papC* geninin, 262 (%63,1)'sinde *iutA* geninin, dana kıymasından izole edilen 293 *E. coli* izolatinin 7 (%2,4)'sinde *papC* geninin, 25 (%8,5)'inde *iutA* geninin varlığını PCR yöntemi ile tespit etmişlerdir. Xia vd. (2011) bu çalışmanın sonucunda, özellikle kümes hayvanı ürünleri ve daha az oranda da kıyma ve domuz etlerinin klinik ExPEC'e benzeyen ExPEC ile kirlendiğini ortaya koymuşlardır [156]. Xiaodong ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmayı, bu tez çalışmasıyla karşılaştırdığımızda *papC* geninin sonuçlarının benzer olduğunu, *iutA* geninin ise bizim çalışmamızda çok daha yüksek oranda bulunduğunu görmekteyiz. Yaptığımız tez çalışmasında 37 kıyma izolatlarının 3 (%8,1)'ünde *papC* geni, 3 (%8,1)'ünde *iutA* geni, 135 adet tavuk izolatlarının 18 (%13,3)'inde *papC* geni, 122 (90,37)'sinde *iutA* geni tespit edilmiştir

Ekstraintestinal patojenik *Escherichia coli* (ExPEC), insan ve hayvan konakçılarının önemli patojenleridir. Bazı insan ve kuş ekstraintestinal patojenik *E. coli*'nin neden olduğu hastalıklar taşıdıkları özellikler açısından (multilokus dizisi, filogenetik grup, vb.) birbirinden ayırt edilemezler. Li vd. (2012) yaptıkları çalışmada insan dışkılarından alınan 96 *E. coli* izolatu ve sağlıklı tavuk dışkılarından alınan 48 *E. coli* izolatından sırasıyla 38 (%39,6)'inde ve 3 (%6,25)'ünde *tkl1* geninin varlığını PCR yöntemi ile tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları *tkl1* geninin insan ve kuş kaynaklı filogenetik grup B2'nin ExPEC suşları ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu ve yapılan çalışmalarda *tkl1* geninin ekstraintestinal hastalık enfeksiyonu riskini arttırmada etkisini ortaya koymuşlardır [143]. Bu çalışmayı bizim tez çalışması ile karşılaştırdığımızda sonuçlarımızın benzer olduğunu görmekteyiz. Çalışmamızda 135 tavuk izolatının 13 (%9,62)'ünde *tkl1* geni tespit edilirken, çalıştığımız diğer gıda örneklerinde (kıyma, et ve peynir) *tkl1* geni tespit edilememiştir.

Escherichia coli ilgili gıda kaynaklı hastalıklar, dünyadaki en önemli küresel halk sağlığı sorunlarından biri olmaya devam ediyor. Bununla birlikte, Shiga toksin üreten *E. coli* özellikle *E. coli* O157: H7 serotipleri gıda kaynaklı patojenlerin ana grubudur. Makhubalo vd. (2017)'nin yapmış oldukları bir çalışmada Güney Afrika'nın Kuzey Bölgesi'ndeki bazı süpermarket ve kasaplardan almış oldukları sığır eti ve kıyma örneklerinden toplam 128 *E. coli* suşu izole etmişlerdir. İzole ettikleri 128 *E. coli* suşunun 31 (%24,2)'inde *rfbE_{O157}* geninin varlığını PCR yöntemi ile tespit etmişlerdir [157]. Bu çalışmada ise *rfbE_{O157}* virülans geni çalıştığımız hiçbir gıda örneğinde tespit edilememiştir. Bu nedenle çalıştığımız et, kıyma, peynir ve tavuk örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatlarının Shiga toksini içermediğini söyleyebiliriz.

Yapılan başka bir çalışmada Schiebel vd. (2017) çeşitli klinik izolatlardan aldıkları 24 İnsan İntestinal Kommensal *E. coli* (HFEC), 24 Üropatojenik *E. coli* (UPEC), 24 Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), 24 atipikal Enteropatojenik *E. coli* (AEPEC), 24 Enteroagregatif *E. coli* (EAEC), 24 Sepsis İlişkili *E. coli* (SAEC), 19 Crohn Hastalığı ile ilişkili *E. coli* (CAEC) ve kontrol grubu olarak 24 Kuş İntestinal Kommensal *E. coli* (AFEC) suşlarını izole etmişler ve toplam 187 *E. coli* izolatının 180 (%96,3)'ünde *bcsA* geninin, 63 (%33,7)'ünde *papC* geninin varlığını tespit

etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise tavuk izolatlarının 68 (%50,3)'inde, toplam da ise bütün izolatların (172/283) %60,77'sinde *bcsA* geni pozitif bulunmuştur. *papC* geni ise 135 tavuk izolatının 13 (%9,62)'ünde, bütün izolatlarımızda ise %7,4 oranında varlığı tespit edilmiştir. Yapılan başka çalışmalar da insan ve hayvan izolatları arasındaki genetik ilişkinin birbirine benzer olduğunu rapor etmişlerdir. [141, 158].

Gıda olarak tüketilen veya ticari kaynak olarak kullanılan hayvan endüstrisi, hayvanlarda ve insanlarda oluşabilecek hastalıkların önlenmesi ve büyümenin teşviki için çok çeşitli antibiyotik tüketmektedir. Özellikle kanatlı hayvan endüstrisinde antimikrobialların terapötik kullanımı *Escherichia coli* için etkin kontrol önlemi olarak kabul edilir [140]. *E. coli*'nin çoklu ilaca dirençli suşlarının evrimi, direnç genlerinin iletimi ile birlikte enfeksiyonların riskini azaltmada zorluklar yaratmıştır [155]. Küresel olarak, gıda hayvancılığındaki antimikrobiyal tüketimin 2030 yılına kadar % 67 oranında artacağı tahmin edilmektedir [140].

Bu tez çalışmamızda yer alan bazı önemli antimikrobiyal direnç genleri ise; *tetB*, *aac(6')-lb*, *bla_{CMY-2}* ve *qnrA*'dır.

Çalışmamızda varlığını araştırdığımız antimikrobiyal direnç genleri farklı oranlarda tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında tetrasikline dirençli *tetB* geni; tavuk izolatlarının 96 (%71,1)'sında, et izolatlarının 13 (%44,82)'ünde, peynir izolatlarının 16 (%19,51)'sında tespit edilmiş, kıyım izolatlarında ise tespit edilememiştir. Aminoglikozide dirençli *aac(6')-lb* geni; kıyım izolatlarının 33 (%89,18)'ünde, tavuk izolatlarının 87 (%64,4)'sinde, et izolatlarının 9 (%31,03)'unda tespit edilmiş, peynir izolatlarında tespit edilememiştir. Beta laktamlara dirençli *bla_{CMY-2}* geni; kıyım izolatlarının 32 (%86,48)'sinde, tavuk izolatlarının 66 (%48,8)'sında, et izolatlarının 7 (%24,13)'sinde, peynir izolatlarının 3 (%3,65)'ünde tespit edilmiştir. Kinolona dirençli *qnrA* geni ise çalışılan hiçbir gıda izolatında tespit edilememiştir. Çalışmamızdaki izolatlardan 38 tanesinde (T88, T89, T100, T101, T102, T103, T104, T105, T107, T108, T109, T110, T111, T112, T113, T114, T116, T121, T122, T123, T127, T128, T129, T131, T132, T134, T144, T146, T147, T148, T150, T151, T161, T162, T171, E176, E179, E180) 3 tane (*tetB*, *aac(6')-lb*, *bla_{CMY-2}*)

antimikrobiyal direnç geni tespit edilmiştir. T84 ve T159 izolatları dışında diğer tüm izolatlarda en az bir adet virülans faktör geni veya antibiyotik direnç geni tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal direnç genleri ve virülans genlerini taşıması tüketilecek gıdaların kontaminasyonu ile ilgili oldukça önemli bir sorun olduğunu ve bu genleri taşıyan suşların neden olduğu hastalıkların tedavisini oldukça zorlaştıracağını göstermektedir.

Bonnet vd. (2009)'nin yaptığı çalışmada tavuklardan izole edilen 256 *E. coli* suşunun 78 (%30,5)'inde *tetB* geninin varlığı PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda Bonnet vd. (2009) *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal maddelere karşı direncin artmasının, hayvan ve insan sağlığı için potansiyel bir tehdit oluşturacağını bildirmişlerdir. [159]. Bu tez çalışmasında ise *tetB* geni oldukça yüksek bir oranda olup 135 tavuk izolatının 96 (%71,1)'sında tespit edilmiştir. *tetB* antimikrobiyal direnç geni et izolatlarında ise %44,5 oranında bulunurken, peynir örneklerinde %19,5 oranında tespit edilmiştir.

Tetrasiklin, 1992'den beri Danimarka'da gıda hayvanlarının tedavisi için en çok kullanılan antimikrobiyal ajan olmuştur. Sengeløv vd. (2003)'nin yaptığı bir çalışmada Danimarka'da çeşitli yerlerden alınan tavuk, sığır ve domuz etinden izole edilen 45 patojen olmayan ve 55 patojenik olmak üzere toplam 100 *E. coli* suşunun 25 (%25)'inde *tetB* varlığı PCR yöntemi ile tespit edilmiştir. *tetB* geni en çok tavuk izolatlarında bulunmuştur. 35 tavuk izolatının 14 (%40)'ünde tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasıyla karşılaştırıldığında *tetB* geni bizim çalışmamızda da en çok tavuk izolatlarında bulunmuştur. 135 tavuk izolatının 96 (%71,1)'sında, 27 et izolatının 13 (%44,82)'ünde *tetB* geni tespit edilmiştir.

Yang vd. (2017) Tibet bölgesinde yaşayan ve dört farklı bölgeden alınan Yaklardan (Tibet Sığı) izole edilen 278 *E. coli* izolatında *tetB*, *aac(6')-lb* dahil olmak üzere bir çok antibiyotik direnç geninin bulunma sıklığına bakmışlardır. 278 *E. coli* izolatının 23 (%10)'ünde *tetB* genini, 26 (%11)'sında *aac(6')-lb* genini PCR yöntemiyle tespit etmişlerdir. Bu çalışmada Yang vd. (2017) yaklardan izole edilen *E. coli* izolatlarının antibiyotiklere dirençli olduğunu göstermişlerdir [160]. Bizim çalışmamızda 29 et izolatının 13 (%44,82)'ünde *tetB* geni, 9 (%31,03)'unda *aac(6')-lb* geni tespit

edilmiştir. Bizim çalışmamızda bu genlerin yüksek oranda bulunmasının coğrafi bölgelerin farklılıklarının etkisi olabilir. Ülkemizde Çin'e göre daha yüksek oranlara sahip antibiyotik direnci taşıyan hayvanların bulunduğunu söyleyebiliriz.

Yapılan başka bir çalışmada Yue vd. (2008) Çin'in Guangdong eyaletinde ki gıda üreten hayvan çiftliklerinden aldıkları toplam 58 domuz ve tavuk izolatlarından 232 *E. coli* izole etmişlerdir. İzole edilen 232 *E. coli* suşunun hiçbirinde *qnrA* genini tespit edememişlerdir. Yue vd. (2008) bu çalışma ile gıda üreten hayvanlarda çeşitli nedenlerden dolayı *qnr* genlerinin kinolon antibiyotiklere karşı bakteri direncinde artışa neden olabileceğini ve bu durumun insan sağlığı açısından ciddi bir sorun olabileceğini bildirmişlerdir [161]. Yapılan çalışma bu tez çalışmasıyla karşılaştırıldığında sonuçların aynı olduğunu görmekteyiz. Bu tez çalışmasında da *qnrA* geni çalışılan hiçbir izolatta tespit edilememiştir.

Awosile vd. (2017)'nin yapmış olduğu bir çalışmada Kanada'daki kolostrum örneklerinden izole ettikleri 452 *E. coli* izolatının 20'sinde çoklu ilaç direnci (ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, sefoksitine, siprofloksasin ve gentamisin) olan *E. coli* izolatları belirlenmiş ve 20 *E. coli* izolatının 9 (%45)'unda *bla_{CMY-2}* geninin varlığı tespit edilmiştir. [162]. Bu sonuç bu tez çalışmasıyla karşılaştırıldığında sonuçların benzer olduğunu görmekteyiz. Bu tez çalışmasında *bla_{CMY-2}* geni 273 *E. coli* izolatının 108 (%38,2)'inde tespit edilmiştir.

Yapılan bir diğer çalışma da Barrios-Villa vd. (2018) Meksika'da 36 tavuk ve 10 domuz etinden 46 *E. coli* izolatı elde etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada 36 tavuk izolatının 6 (%17)'sında, 10 domuz eti izolatının 2 (%20)'sinde *bla_{CMY-2}* geninin varlığını PCR yöntemi ile tespit etmişlerdir [163]. Bizim çalışmamız ile karşılaştırıldığında et izolatlarının sonuçlarının benzer olduğunu söyleyebiliriz. Bu tez çalışmasında 135 tavuk eti izolatının 66 (%48,8)'sında, 29 et izolatının 7 (24,13)'sinde *bla_{CMY-2}* geninin varlığı tespit edilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada Koo vd. (2012) Kore'de çiğ et, balık ve işlenmiş yiyeceklerden alınan gıda örneklerinden toplam 162 *E. coli* suşu izole etmişlerdir. *qnrA* ve *bla_{CMY-2}* genleride dahil olmak üzere bir çok antimikrobiyal genin varlığını

tespit etmeye çalışmışlardır. 162 izolatın 1 (%0,6)'inde *bla_{CMY-2}* geninin varlığı PCR yöntemi ile tespit edilmiştir. Ancak *qnrA* geni hiçbir izolatta tespit edilememiştir. Bu çalışmada CMY üreten *E. coli* ile kontamine olmuş yiyeceklerin *bla_{CMY-2}*'nin rezervuarları olabileceği ve bu direnç belirleyicilerin yayılmasına neden olacağı sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu izolatların hayvancılıkta kullanılan antibiyotiklere karşı oldukça dirençli olduğunu bildirmişlerdir [164]. Bu tez çalışmasında ise; *bla_{CMY-2}* geni çalışmamızda çok daha yüksek oranlarda tespit edilirken, *qnrA* geni bizim çalışmamızda da çalışılan hiçbir izolatta tespit edilememiştir.

Aydın vd. (2010)'nin yaptıkları çalışmada Türkiye'nin Kayseri yöresindeki çeşitli sığırlardan toplanan sütlerden izole edilen 500 *E. coli* izolatının 107 (%21,4)'sinde *rfbE_{O157}* geninin varlığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada süt örneklerinin kontamine olduğunu ve bu sonucun insanlarda HC, HÜS ve TTP gibi klinik tablolar oluşturması sebebiyle önemli bir halk sağlığı sorunu olabileceğini rapor etmişlerdir [165]. Bizim çalışmamızda ise *rfbE_{O157}* geni çalışılan hiçbir izolatta tespit edilememiştir.

Yapılan başka bir çalışma ise Sezgin, E.,(2013) tarafından Türkiye'nin Aydın ilinde ki çeşitli marketlerden alınan kıyma ve 30 hamburger köftelerinden izole edilen 80 *E. coli* izolatının 34 (%40,4)'ünde *E. coli* O157:H7 varlığı tespit edilmiştir [166]. Bu tez çalışmasında ise, kıyma örnekleri de dahil olmak üzere gıda örneklerinde *rfbE_{O157}* geninin varlığı araştırılmış fakat *rfbE_{O157}* genine hiçbir izolatta rastlanmamıştır.

Yapılan bir diğer çalışma da Jahed, R., (2012) tarafından Türkiye'nin Ankara ilinde çeşitli yerlerden temin edilen tavuk örneklerinden izole edilen 213 *E. coli* izolatının 121 (%56,4)'inde tetrasikline dirençli *tetB* genlerin varlığı PCR yöntemi ile tespit edilmiştir [167]. Bu tez çalışmasında ise *tetB* geninin varlığı tavuk izolatlarında %71,1 olarak bulunmuştur.

Can vd. (2017)'nin yaptıkları çalışmada Türkiye'nin Hatay ilinden alınan kıyma ve yöresel peynirleri olan Carra ve Sürk peynirlerinden izole edilen toplam 131 *E. coli* izolatının 30 (%23)'unda *rfbE_{O157}* geninin varlığı PCR yöntemi ile tespit edilmiştir [168]. Bizim çalışmamızda ise *rfbE_{O157}* geni hiçbir izolatta tespit edilememiştir.

Cantekin, Z., (2008) Türkiye'nin Ankara ilinde bulunan kolibasilozisli kanatlı hayvanlardan 200 *E. coli* suşu izole etmişler ve *E. coli* izolatlarının 28 (%14)'inde *papC* geninin varlığı tespit etmişlerdir [169]. Bu tez çalışmasında da 135 tavuk izolatının 18 (%13,3)'inde *papC* geni tespit edilmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında Bolu yöresinde ki çeşitli marketlerden alınan hayvansal kaynaklı gıda örneklerinde bulunan ve insanda hastalık yapabileceği düşünülen *E. coli* bakterisinin bazı virülans faktör ve antibiyotik direnç genlerinin varlığını moleküler olarak PCR yöntemi ile tespit etmeye çalıştık. Yapılan araştırmalar sonucunda hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunan *E. coli* bakterisinin virülans faktör ve antibiyotik direnç genlerinin araştırılmasıyla ilgili Amerika ve Avrupa kaynaklı çok fazla çalışma bulunmasına rağmen ülkemizde ise bu tür çalışmalar bulunmakla beraber yetersizdir. Özellikle *bcsA* virülans faktör geninin hayvansal kaynaklı gıdalardaki bulunma sıklığı ile ilgili yeteri kadar çalışmaya rastlanmamış olup, yapılan bu tez çalışmasının bilime ve araştırmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak; Hayvansal kaynaklı gıda olarak tüketilen kıyma, tavuk, et ve peynir insanların en sık tükettiği besin gruplarıdır. Bu gıdaların herhangi bir nedenle kontamine olması, çok sayıda insanın hasta olmasına hatta bu hastalıkların ölümle sonuçlanmasına neden olan ciddi bir halk sorununa dönüşecektir. Bu çalışmada gıdalara çeşitli yollarla bulaşmış olan *Escherichia coli* bakterisinin taşıdığı virülans faktör genleri ve çeşitli antibiyotiklere karşı gösterdiği antimikrobiyal direnç genleri tespit edilmeye çalışılmıştır. *E. coli* bakterisinin sahip olduğu bu virülans faktör genleri insanların ve hayvanların hasta olmasına, antimikrobiyal direnç genleri ise tedavi sürecinin uzamasına ve zorlaşmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle hem Dünya'da hem de ülkemizde antibiyotiğe dirençli *E. coli* suşları ile ilişkili virülans faktör genlerinin düzenli olarak taranması ve izlenmesinin kolibakilloz riskini azaltmada etkili olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın sonuçları ülkemizde görülen *E. coli* kaynaklı hastalıkların tanısı ve tedavi sürecinde moleküler metotların daha etkin, hızlı bir biçimde kullanılmasına ve bu konuda yapılacak başka çalışmalara da katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Tuntufye, H. N., Lebeer, S., Gwakisa, P. S., Goddeeris, B. M., Identification of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Genes That Are Induced in Vivoduring Infection in Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (9): 3343–3351, 2012.
- [2] Hammerum, A. M., Heuer, O. E., Human Health Hazards from Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* of Animal Origin. *Clinical Infectious Diseases*. 48 (7): 916–921, 2009.
- [3] Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., Choroszy-Krol, I., Virulence factors, Prevalence and Potential Transmission of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Different Sources: Recent Reports. *Gut Pathogens*. 11 (1), 2019.
- [4] Krumperman, P. H., Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-risk Sources of Fecal Contamination of Foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 46 (1): 165-170, 1983.
- [5] Van, T. T. H., Chin, J., Chapman, T., Tran, L. T., Coloe, P. J., Safety of Raw Meat and Shellfish in Vietnam: An analysis of *Escherichia coli* Isolations for Antibiotic Resistance and Virulence Genes. *International Journal of Food Microbiology*. 124 (3): 217–223, 2008.
- [6] El Hag, M., Feng, Z., Su, Y., Wang, X., Yassin, A., Chen, S., Liu, X., Contribution of the *csgA* and *bcsA* Genes to *Salmonella enterica* Serovar Pullorum Biofilm Formation and Virulence. *Avian Pathology*. 46 (5): 541–547, 2017.

- [7] Fluit, A. C., Visser, M. R., Schmitz, F.-J., Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 14 (4): 836–871, 2001.
- [8] Donnenberg, M. S., Whittam, T. S., Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*. 107 (5): 539–548, 2001.
- [9] Byappanahalli, M. N., Fujioka R. S., Evidence that tropical soil environment can support the growth of *Escherichia coli*. *Water Science Technology*. 38 (12): 171-174, 1998.
- [10] Kayser, Fritz H., Bienz, Kurt A., Eckert, J., Zinkernagel, Rolf M., Tibbi Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2002.
- [11] Power, M. L., Littlefield-Wyer, J., Gordon, D. M., Veal, D. A., Slade, M. B., Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from blooms in two Australian lakes. *Environmental Microbiology*. 7 (5): 631–640, 2005.
- [12] Battesti, A., Majdalani, N., Gottesman, S., The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*. 65(1): 189–213, 2011.
- [13] Sheldon, J. R., Yim, M.-S., Saliba, J. H., Chung, W.-H., Wong, K.-Y., Leung, K. T., Role of *rpoS* in *Escherichia coli* O157:H7 Strain H32 Biofilm Development and Survival. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (23): 8331–8339, 2012.
- [14] Stewart, E. J., Satorius, A. E., Younger, J. G., Solomon, M. J., Role of Environmental and Antibiotic Stress on *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Microstructure. *Langmuir*. 29 (23): 7017–7024, 2013.

- [15] Mercer, R. G., Zheng, J., Garcia-Hernandez, R., Ruan, L., Gänzle, M. G., McMullen, L. M., Genetic determinants of heat resistance in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. 6 (932): 2015.
- [16] Reed, J. L., Model Driven Analysis of *Escherichia coli* Metabolism. Doctor of Philosophy. University of California, San Diego, 2005.
- [17] Wytock, T. P., Fiebig, A., Willett, J. W., Herrou, J., Fergin, A., Motter, A. E., Crosson, S., Experimental evolution of diverse *Escherichia coli* metabolic mutants identifies genetic loci for convergent adaptation of growth rate. *PLOS Genetics*. 14 (3): 2018.
- [18] DebRoy, C., Fratamico, P. M., Roberts, E., Molecular serogrouping of *Escherichia coli*. *Animal Health Research Reviews*. 19 (1): 1–16, 2018.
- [19] Omerovic, M., Müştak, H. K., Kaya, İ. B., *Escherichia coli* Patotiplerinin Virülens Faktörleri Virulence Factors of *Escherichia coli* Pathotypes. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 28 (1): 1-6, 2017.
- [20] Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., Gordon, D. M., The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*. 5 (1): 58–65, 2012.
- [21] Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., Choroszy-Krol, I., Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*. 11 (1): 2019.
- [22] Baldy-Chudzik, K., Bok, E., Mazurek, J., Well-known and new variants of pathogenic *Escherichia coli* as a consequence of the plastic genome. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 69 (345-361): 1732-2693, 2015.

- [23] Parry, S. M., Palmer, S. R., The public health significance of VTEC O157. *Journal of Applied Microbiology*. 88 (1): 1-9, 2000.
- [24] Nguyen, T. V., Le Van, P., Le Huy, C., Gia, K. N., Weintraub, A., Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*. 43 (2): 755–760, 2005.
- [25] Palaniappan, R. U. M., Zhang, Y., Chiu, D., Torres, A., DebRoy, C., Whittam, T. S., Chang, Y.-F., Differentiation of *Escherichia coli* Pathotypes by Oligonucleotide Spotted Array. *Journal of Clinical Microbiology*. 44 (4): 1495–1501, 2006.
- [26] Sack, R. B., The discovery of cholera like enterotoxins produced by *Escherichia coli* causing secretory diarrhoea in humans. *Indian Journal of Medical Research*. 133 (2): 171–178, 2011.
- [27] Fleckenstein, J. M., *Escherichia coli*. Enterotoxigenic *Escherichia Coli*. 183–213. Academic Press, USA, 2013.
- [28] Torres, A. G., Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America., University of Texas, USA, 2016.
- [29] Ingle, D. J., Levine, M. M., Kotloff, K. L., Holt, K. E., Robins-Browne, R. M., Dynamics of antimicrobial resistance in intestinal *Escherichia coli* from children in community settings in South Asia and sub-Saharan Africa. *Nature Microbiology*. 2018.
- [30] Hazen, T. H., Michalski, J., Luo, Q., Shetty, A. C., Daugherty, S. C., Fleckenstein, J. M., Rasko, D. A., Comparative genomics and transcriptomics of *Escherichia coli* isolates carrying virulence factors of both enteropathogenic and enterotoxigenic *E. coli* . *Scientific Reports*. 7 (1): 2017.
- [31] Taylor, J., Host Specificity and Enteropathogenicity of *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology*. 24 (3): 316–325, 1961.

- [32] Nisa, S., Scanlon, K. M., Donnenberg, M. S., *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of Pathogenesis. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Academic Press, USA, 2013.
- [33] Nakhjavani, F. A., Iman-Eini, H., Haghi-Ashtiani, M. T., Emaneini, M., Aligholi, M., Taherikalani, M., Jabalameli, F., Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*. 62 (2): 191–195, 2013.
- [34] Brenner, D. J., Fanning, G. R., Miklos, G. V., Steigerwalt, A. G., Polynucleotide Sequence Relatedness Among *Shigella* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 23 (1): 1–7, 1973.
- [35] Van den Beld, M. J. C., de Boer, R. F., Reubsæet, F. A. G., Rossen, J. W. A., Zhou, K., Kuiling, S., Kooistra-Smid, M. A. M. D., Evaluation of a culture dependent algorithm and a molecular algorithm for identification of *Shigella* spp., *Escherichia coli*, and enteroinvasive *E. coli* (EIEC). *Journal of Clinical Microbiology*. 2018.
- [36] Kaira, S. S., Pai, C., Study of uropathogenic *Escherichia coli* with special reference to its virulence factors. *International Journal Community Medicine and Public Health*. 5 (1): 2017.
- [37] Cowley, L. A., Oresgun, D. R., Chattaway, M. A., Dallman, T. J., Jenkins, C., Phylogenetic comparison of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated from cases of diarrhoeal disease in England, 2005–2016. *Journal of Medical Microbiology*. 67 (6): 2018.
- [38] Pasqua, M., Michelacci, V., Di Martino, M. L., Tozzoli, R., Grossi, M., Colonna, B., Prosseda, G., The Intriguing Evolutionary Journey of Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward Pathogenicity. *Frontiers in Microbiology*. 8, 2017.

- [39] Abay, S., Aydın, F., Ertuş, N., Hızlısoy H., Erdoğan, S., Gönülalan Z., Kanatlılardan *Escherichia coli* O157 İzolasyonu Üzerine Çalışmalar, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 11 (1): 1-6, 2014.
- [40] Cheng, C., Balasubramanian, S., Fekete, A., Krischke, M., Mueller, M. J., Hentschel, U., Abdelmohsen, U. R., Inhibitory potential of streptonium A against Shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strain EDL933. Natural Product Research. 31 (23): 2818–2823, 2017.
- [41] Jajarmi, M., Askari Badouei, M., Imani Fooladi, A. A., Ghanbarpour, R., Ahmadi, A., Pathogenic potential of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of caprine origin: virulence genes, Shiga toxin subtypes, phylogenetic background and clonal relatedness. BMC Veterinary Research. 14(1): 2018.
- [42] Moxley, R., Francis, D., Tamura, M., Marx, D., Santiago-Mateo, K., Zhao, M., Efficacy of Urtoxazumab (TMA-15 Humanized Monoclonal Antibody Specific for Shiga Toxin 2) Against Post-Diarrheal Neurological Sequelae Caused by *Escherichia coli* O157:H7 Infection in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Model. Toxins. 9 (2): 49, 2017.
- [43] Schmidt, H., Hensel, M., Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. Clinical Microbiology Reviews. 17 (1): 14–56, 2004.
- [44] Mallick, E. M., McBee, Megan E., Vanguri, V. K., Melton-Celsa, A. R., Schlieper, K., Karalius, B. J., A novel murine infection model for Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. The Journal of Clinical Investigation. 122 (11): 4012-4024, 2012.
- [45] Vygen-Bonnet, S., Rosner, B., Wilking, H., Fruth A., Prager, R., Kossow, A., Lang, C., Simon, S., Seidel, J., Faber, M., Schielke, A., Michaelis, K., Holzer, A., Kamphausen, R., Kalhöfer, D., Thole, S., Mellmann, A., Flieger, A., Stark, K., Ongoing haemolytic uraemic syndrome (HUS) outbreak caused by sorbitol-fermenting (SF) shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157, Germany, December 2016 to May 2017. Eurosurveillance. 22 (21): 2017.

- [46] Okhuysen, P. C., DuPont, H. L., Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): A Cause of Acute and Persistent Diarrhea of Worldwide Importance. *The Journal of Infectious Diseases*. 202 (4): 503–505, 2010.
- [47] Black, R. E., Cousens, S., Johnson, H. L., Lawn, J. E., Rudan, I., Bassani, D. G., Mathers, C., Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *The Lancet*. 375 (9730): 1969–1987, 2010.
- [48] Borgersen, Q., Bolick, D. T., Kolling, G. L., Aijuka, M., Ruiz-Perez, F., Guerrant, R. L., Santiago, A. E., Abundant production of exopolysaccharide by EAEC strains enhances the formation of bacterial biofilms in contaminated sprouts. *Gut Microbes*. 9 (3): 264–278, 2018.
- [49] Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Blanco, J., Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria. *European Journal of Epidemiology*. 12 (2): 191–198, 1996.
- [50] Pitout, J. D. D., Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. *Frontiers in Microbiology*. 3, 2012.
- [51] Russo, T., Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*. 5 (5): 449–456, 2003.
- [52] Russo, T. A., Johnson, J. R., Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*. 181 (5): 1753–1754, 2000.
- [53] Kucheria, R., Dasgupta, P., Sacks, S. H., Khan, M. S., Sheerin, N. S., Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgraduate Medical Journal*. 81 (952): 6-83, 2005.

- [54] Pong, A., Bradley, J. S., Bacterial meningitis and the newborn infant. *Infectious Disease Clinics of North America*. 13 (3) 33-711, 1999.
- [55] Xia, X., Pathogenic *Escherichia coli* in Retail Meats. Doctor of Philosophy. The University of Maryland, Maryland, 2010.
- [56] Spurbeck, R. R., Mobley, H. L. T., *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of Pathogenesis. Uropathogenic *Escherichia coli*. Academic Press, USA, 2013.
- [57] Foxman, B., Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *The American Journal of Medicine*. 113 (1): 5–13, 2002.
- [58] Russo, T. A., Stapleton, A., Wenderoth, S., Hooton, T. M., Stamm, W. E., Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. *The Journal of Infectious Diseases*. 172 (2): 5-440, 1995.
- [59] Manges, A. R., Johnson, J. R., Foxman, B., O'Bryan, T. T., Fullerton, K. E., Riley, L. W., Widespread Distribution of Urinary Tract Infections Caused by a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Clonal Group. *New England Journal of Medicine*. 345 (14): 1007–1013, 2001.
- [60] Foxman, B., Uropathogenic *Escherichia coli* Are More Likely than Commensal *E. coli* to Be Shared between Heterosexual Sex Partners. *American Journal of Epidemiology*. 156 (12): 1133–1140, 2002.
- [61] Lloyd, A. L., Henderson, T. A., Vigil, P. D., & Mobley, H. L. T., Genomic Islands of Uropathogenic *Escherichia coli* Contribute to Virulence. *Journal of Bacteriology*. 191 (11): 3469–3481, 2009.
- [62] Lemonnier, M., Landraud, L., Lemichez, E., Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiology Reviews*. 31 (5): 515–34, 2007.

- [63] Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., Ishii, S., Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology*. 123 (3): 570–581, 2017.
- [64] Vounba, P., Arsenault, J., Bada-Alambédji, R., Fairbrother, J. M., Pathogenic potential and the role of clones and plasmids in beta-lactamase-producing *E. coli* from chicken faeces in Vietnam. *BMC Veterinary Research*. 15 (1): 2019.
- [65] King, C. K., Glass, R., Bresee, J. S., Duggan, C., Centers for Disease Control and Prevention, Managing acute gastroenteritis among children: oral rehydration, maintenance, and nutritional therapy. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. 52 (6): 1–16, 2003.
- [66] Wong, C. S., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Watkins, S. L., Tarr, P. I., The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *The New England Journal of Medicine*. 342 (26): 1930–6, 2000.
- [67] Russo, T. A. and Johnson, J. R., Extraintestinal isolates of *Escherichia coli*: identification and prospects for vaccine development. *Expert Review of Vaccines*. 5 (1): 45–54, 2006.
- [68] Philpott, F., Shiga Toxin Methods and Protocols. Ed: Philpott Dana and Ebel Frank. Humana Press, Totowa, 2003.
- [69] Kuhnert, P., Hacker, J., Mühlendorfer, I., Burnens, A. P., Nicolet, J., Frey, J., Detection system for *Escherichia coli*-specific virulence genes: absence of virulence determinants in B and C strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (2): 9-703, 1997.
- [70] Bauer, A. P., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., A novel DNA microarray design for accurate and straightforward identification of *Escherichia coli* safety and laboratory strains. *Systematic and Applied Microbiology*. 31 (1): 50–61, 2008.

- [71] Madigan, M., Martinko, J., Brock Biology of Microorganism. Pearson Prentice Hall, 2016.
- [72] Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. T., Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology. 2 (2): 123–140, 2004.
- [73] Guerinot, M. L., Microbial iron transport. Annual Review of Microbiology. 48, 72-743, 1994.
- [74] Martínez, J. L., Herrero, M., de Lorenzo, V., The organization of intercistronic regions of the aerobactin operon of pColV-K30 may account for the differential expression of the iut ABCD *iutA* genes. Journal of Molecular Biology. 238 (2): 93-288, 1994.
- [75] Torres, A. G., Redford, P., Welch, R. A., Payne, S. M. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. Infection and Immunity. 69 (10): 85-6179, 2001.
- [76] Mbanga, J., Nyararai, Y. O., Virulence gene profiles of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from chickens with coli bacillosis in Bulawayo, Zimbabwe. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 82 (1): 2015.
- [77] Fernandes, F. F., Milanezi, M. L., Martinez, R., Panunto-Castelo, A., The ferric aerobactin receptor *iutA*, a protein isolated on agarose column, is not essential for uropathogenic *Escherichia coli* infection. Revista Latino-Americana de Enfermagem. 20 (2): 340–345, 2012.
- [78] Garcia, E. C., Brumbaugh, A. R., Mobley, H. L. T., Redundancy and Specificity of *Escherichia coli* Iron Acquisition Systems during Urinary Tract Infection. Infection and Immunity. 79 (3): 1225–1235, 2011.

- [79] Ahmad, B., Issa, M., Adwan, G., Virulence Factors and Phylogenetic Grouping in Uropathogenic Isolates of *Escherichia coli* Recovered from Thabet Hospital-Tulkarm, Palestine. The Degree of Master. An-Najah National University, Nablus, 2014.
- [80] Kariyawasam, S., Nolan, L. K., *papA* gene of avian pathogenic *Escherichia coli*. Avian Diseases. 55 (4): 8-532, 2011.
- [81] Norgren, M., Båga, M., Tennent, J. M., Normark, S., Nucleotide sequence, regulation and functional analysis of the *papC* gene required for cell surface localization of Pap pili of uropathogenic *Escherichia coli*. Molecular Microbiology. 1 (2): 78-169, 1987.
- [82] Hasani, B., Banani, M., Nouri, A., Goudarzi, H., Akhijahani, M., Detection of three virulence genes in *E. coli* isolates from commercial broilers with colibacillosis and their antibiotic resistance profiles in Tabriz area, Iran. Archives of Razi Institute. 72 (1): 1-8, 2017.
- [83] Etebu Ebimieowei, A. I., Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research. 90 (101): 1818-2053, 2016.
- [84] Colowick, S. P., Nathan, Kaplan, Preparation and assay of enzymes. Volume 2. Academic Press, 1964.
- [85] Omadjela, O., Narahari, A., Strumillo, J., Melida, H., Mazur, O., Bulone, V., Zimmer, J., *bcsA* and *bcsB* form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 110 (44): 17856–17861, 2013.
- [86] Serra, D. O., Richter, A. M., Hengge, R., Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured *Escherichia coli* Biofilms. Journal of Bacteriology. 195 (24): 2013.

- [87] Hu, L., Grim, C. J., Franco, A. A., Jarvis, K. G., Sathyamoorthy, V., Kothary, M. H., Tall, B. D., Analysis of the cellulose synthase operon genes, *bcsA*, *bcsB*, and *bcsC* in Cronobacter species: Prevalence among species and their roles in biofilm formation and cell–cell aggregation. *Food Microbiology*, 52, 97–105, 2015.
- [88] Römling, U., Galperin, M. Y., Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products and functions. *Trends Microbiol.* 23 (9), 545, 2015.
- [89] Culler, H., Couto, S., Higa, J., Ruiz, R., Yang, M., Bueris, V., Sircili, M., Role of SdiA on Biofilm Formation by Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Genes*, 9 (5): 253, 2018.
- [90] Lynne, A. M., Skyberg, J. A., Logue, C. M., Nolan, L. K., Detection of Iss and Bor on the surface of *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 102 (3): 660–666, 2007.
- [91] Askari Badouei, M., Joseph Blackall, P., Koochakzadeh, A., Haghbin Nazarpak, H., Sepehri, M. A., Prevalence and clonal distribution of avian *Escherichia coli* isolates harboring increased serum survival (*iss*) gene. *The Journal of Applied Poultry Research*, 25 (1): 67–73, 2015.
- [92] Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., Nolan, L. K., Evolution of the *iss* Gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (8): 2360–2369, 2008.
- [93] Tuntufye, H. N., Gwakisa, P. S., Goddeeris, B. M., In silico analysis of *tkl1* from avian pathogenic *Escherichia coli* and its virulence evaluation in chickens. *Research in Microbiology*. 164 (4): 310–318, 2013.

- [94] Griffin, P. M., Tauxe, R. V., The Epidemiology of Infections Caused by *Escherichia coli* O157: H7, Other Enterohemorrhagic *E. coli*, and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Epidemiologic Reviews*. 13 (1): 60–98, 1991.
- [95] Bertrand, R., Roig, B., Evaluation of enrichment-free PCR-based detection on the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157, Application to municipal wastewater. *Water Research*. 41 (6): 1280–1286, 2007.
- [96] Noll, L. W., Shridhar, P. B., Shi, X., An, B., Cernicchiaro, N., Renter, D. G., Bai, J., A Four-Plex Real-Time PCR Assay, Based on *rfbE*, *stx1*, *stx2*, and *eae* Genes, for the Detection and Quantification of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* O157 in Cattle Feces. *Foodborne Pathogens and Disease*. 12 (9): 787–794, 2015.
- [97] Armstrong, G. L., Hollingsworth, J., Morris, J. G., Emerging Foodborne Pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a Model of Entry of a New Pathogen into the Food Supply of the Developed World. *Epidemiologic Reviews*. 18 (1): 29–51, 1996.
- [98] Saygı, Ş., Battal, D., Şahin, N. Ö., Çevre ve İnsan Sağlığı Yönünden İlaç Atıklarının Önemi. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 16, 82-90, 2012.
- [99] Denyer S. P., Hodges, N., Gorman, S. P., Gilmore, M., Hugo and Russel's *Pharmaceutical Microbiology*. Blackwell Science, 2004.
- [100] Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, Avery C., *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. CRC Press, Boca Raton, 2007.
- [101] Akkan, G., *Pratikte Antibiyotik Kullanımı. Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları*. 53-62. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, İstanbul, 1997.

- [102] Heesemann, J., Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Infection*. 21 (1): 4-9, 1993.
- [103] Aminov, R. I., A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology*. 1, 2010.
- [104] Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S., Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*. 6 (4): 2018.
- [105] Chess, B., Talaro, K. P., *Foundations in microbiology*. McGraw-Hill Learning Solutions, New York, 2012.
- [106] Pegler, S., Healy, B., In patients allergic to penicillin, consider second and third generation cephalosporins for life threatening infections. *BMJ*. 335 (7627): 991–991, 2007.
- [107] Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., Bonomo, R. A., Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55 (11): 4943–4960, 2011.
- [108] Mahajan, G. B., Balachandran, L., Antibacterial agents from actinomycetes a review. *Frontiers in Bioscience*. 1 (4): 53-240, 2012.
- [109] Xu, F., Xu, H., Wang, X., Zhang, L., Wen, Q., Zhang, Y., Xu, W., Discovery of N-(3-((7H-purin-6-yl)thio)-4-hydroxynaphthalen-1-yl) sulfonamide derivatives as novel protein kinase and angiogenesis inhibitors for the treatment of cancer: Synthesis and biological evaluation. Part III. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. 22 (4): 1487–1495, 2014..
- [110] Bozdogan, B., Appelbaum, P. C., Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 23 (2): 113–119, 2004.

- [111] Brown, D., Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void. *Nature Reviews Drug Discovery*. 14 (12): 821–832, 2015.
- [112] Park, J. T., Uehara, T., How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72 (2): 211–227, 2008.
- [113] Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., Matthaiou, D. K., Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates*. 13 (4-5): 132–138, 2010.
- [114] Chen, C.-R., Malik, M., Snyder, M., Drlica, K., DNA Gyrase and Topoisomerase IV on the Bacterial Chromosome: Quinolone-induced DNA Cleavage. *Journal of Molecular Biology*. 258 (4): 627–637, 1996.
- [115] Tenson, T., Lovmar, M., Ehrenberg, M., The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *Journal of Molecular Biology*. 330 (5): 1005–1014, 2003.
- [116] Epe, B., Woolley, P. The binding of 6-demethylchlortetracycline to 70S, 50S and 30S ribosomal particles: a quantitative study by fluorescence anisotropy. *The EMBO Journal*. 3 (1): 6-121, 1984.
- [117] Talaro, K. P., Chess, B., *Foundations in microbiology*. McGraw-Hill Learning Solutions, New York, 2008.
- [118] Da Costa, P., Loureiro, L., Matos, A., Transfer of Multidrug-Resistant Bacteria Between Intermingled Ecological Niches: The Interface Between Humans, Animals and the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 10 (1): 278–294, 2013.

- [119] Tenover, F. C., Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*. 119 (6): 3–10, 2006.
- [120] Kang, C.-I., Kim, S.-H., Park, W. B., Lee, K.-D., Kim, H.-B., Kim, E., Choe, K.-W., Bloodstream Infections Caused by Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli: Risk Factors for Mortality and Impact of Inappropriate Initial Antimicrobial Therapy on Outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49 (2): 760–766, 2005.
- [121] Kim, H. B., Park, C. H., Kim, C. J., Kim, E.-C., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants over a 9-Year Period. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53 (2): 639–645, 2008.
- [122] Alvarez, M., Tran, J. H., Chow, N., Jacoby, G. A., Epidemiology of Conjugative Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48 (2): 533–537, 2004.
- [123] Kang, M.-S., Besser, T. E., Call, D. R., Variability in the Region Downstream of the *bla**CMY-2* β -Lactamase Gene in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50 (4): 1590–1593, 2006.
- [124] Pfeifer, Y., Cullik, A., Witte, W., Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 300 (6): 371–379, 2010.
- [125] Roberts, M. C., Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*. 245 (2): 195–203, 2005.
- [126] Olowe, O. A., Idris, O. J., Taiwo, S. S., Prevalence of TET genes mediating tetracycline resistance in *Escherichia coli* clinical isolates in Osun State, Nigeria. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 3 (2): 135–140, 2013.

- [127] Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M., Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69 (5): 1265–1274, 2014.
- [128] Ramirez, M. S., Nikolaidis, N., Tolmasky, M. E., Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: The *aac(6)-Ib* paradigm. *Frontiers in Microbiology*. 4, 2013.
- [129] Vakulenko, S. B., Mobashery, S., Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clinical Microbiology Reviews*. 16 (3): 430–450, 2003.
- [130] Menzies, D., Benedetti, A., Paydar, A., Martin, I., Royce, S., Pai, M., Burman, W., Effect of Duration and Intermittency of Rifampin on Tuberculosis Treatment Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Medicine*. 6(9): 2009.
- [131] Brossier, F., Veziris, N., Aubry, A., Jarlier, V., Sougakoff, W. Detection by GenoType MTBDRsl Test of Complex Mechanisms of Resistance to Second-Line Drugs and Ethambutol in Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 48 (5): 1683–1689, 2010.
- [132] Rezazadeh, M., Baghchesaraei, H., Peymani, A., Plasmid-Mediated Quinolone-Resistance (*qnr*) Genes in Clinical Isolates of *Escherichia coli* Collected from Several Hospitals of Qazvin and Zanzan Provinces, Iran. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 7 (5): 307–312, 2016.
- [133] Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., Robicsek, A., Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 22 (4): 664–689, 2009.

- [134] Mammeri, H., Van De Loo, M., Poirel, L., Martinez-Martinez, L., Nordmann, P., Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49 (1): 71–76, 2004.
- [135] Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., Arnheim, N., Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230 (4732): 1350–1354, 1985.
- [136] Delong, R., Zhou, Q., *Introductory Experiments on Biomolecules and Their Interactions*. Academic Press, 2015.
- [137] Bustin, S. A., Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*. 29 (1): 23-29, 2002.
- [138] Seidman, J. G., *Manipulating the Mouse Genome*. *Current Protocols in Molecular Biology*. 85 (1): 23.0.1–23.0.2, 2009.
- [139] Devran, Z., Yılmaz S., Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları. *DergiPark*. 20–1 (31–42): 2016.
- [140] Subedi, M., Luitel, H., Devkota, B., Bhattarai, R. K., Phuyal, S., Panthi, P., Chaudhary, D. K., Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. *BMC Veterinary Research*. 14 (1): 2018.
- [141] Schiebel, J., Böhm, A., Nitschke, J., Burdukiewicz, M., Weinreich, J., Ali, A., Schierack, P., Genotypic and Phenotypic Characteristics Associated with Biofilm Formation by Human Clinical *Escherichia coli* Isolates of Different Pathotypes. *Applied and Environmental Microbiology*. 83 (24): 2017.

- [142] Delicato, E. R., de Brito, B. G., Gaziri, L. C. J., Vidotto, M. C., Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology*. 94 (2): 97–103, 2003.
- [143] Li, G., Kariyawasam, S., Tivendale, K. A., Wannemuehler, Y., Ewers, C., Wieler, L. H., Nolan, L. K., *tkt1*, located on a novel pathogenicity island, is prevalent in avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*. 12 (1): 51, 2012.
- [144] Paton, A. W., Paton, J. C., Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *Journal of Clinical Microbiology*. 36, (2): 598–602, 1998.
- [145] Chen, C.-M., Ke, S.-C., Li, C.-R., Wu, Y.-C., Chen, T.-H., Lai, C.-H., Wu, L.-T., High Diversity of Antimicrobial Resistance Genes, Class 1 Integrons, and Genotypes of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Beef Carcasses. *Microbial Drug Resistance*. 23 (7): 915–924, 2017.
- [146] Liu, Y., Cao, Y., Wang, T., Dong, Q., Li, J., Niu, C., Detection of 12 Common Food-Borne Bacterial Pathogens by TaqMan Real-Time PCR Using a Single Set of Reaction Conditions. *Frontiers in Microbiology*. 10, 2019.
- [147] Havelaar, A., Grace, D., Wu, F. Photo Credit Goes Here Foodborne diseases from dairy products in developing countries: Hazards and health implications. *Feed the Future*. 2019.
- [148] Muratoğlu, Ç. Ö., Çolak, H., Besin Kaynaklı Hastalıkların Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri Food Hygiene and Technology Special Topics*. 1 (3): 1-8, 2015.
- [149] Sağlam, D., Şeker E., Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojenler. *Kocatepe Veterinary Journal*. 9 (2): 105–113, 2016.

- [150] Medeiros, L. C., Hillers, V. N., Kendall, P. A., Mason, A., Food Safety Education: What Should We Be Teaching To Consumers. *Journal of Nutrition Education*. 33 (2): 108–113, 2001.
- [151] Johnson, J. R., Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 4 (1): 80–128, 1991.
- [152] Zambri, M., Cloutier, M., Adam, Z., Lapen, D. R., Wilkes, G., Sunohara, M., Khan, I. U. H., Novel virulence, antibiotic resistance and toxin gene-specific PCR-based assays for rapid pathogenicity assessment of *Arcobacter faecis* and *Arcobacter lanthieri*. *BMC Microbiology*. 19 (1): 2019.
- [153] Altalhi, A. D., Hassan, S. A., Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. *Food Control*. 20 (10): 913–917, 2009.
- [154] Kwon, S.-G., Cha, S.-Y., Choi, E.-J., Kim, B., Song, H.-J., Jang, H.-K., Epidemiological Prevalence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Differentiated by Multiplex PCR from Commercial Chickens and Hatchery in Korea. *Journal of Bacteriology and Virology*. 38 (4): 179, 2008.
- [155] De Carli S., Ikuta N., Lehmann F. K., da Silveira V. P., de Melo Predebon G., Fonseca A. S., Lunge V. R., Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil. *Poultry Science*. 94 (11): 40-2635, 2015.
- [156] Xia, X., Meng, J., Zhao, S., Bodeis-Jones, S., Gaines, S. A., Ayers, S. L., McDermott, P. F., Identification and Antimicrobial Resistance of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Retail Meats. *Journal of Food Protection*. 74 (1): 38–44, 2011.

- [157] Makhubalo, K., Manganyi, M., Kumar, A., Mbewe, M., Ateba, C. N., Phenotypic and Genetic Characterization of Sorbitol-Fermenting *Escherichia coli* O157: H7 Isolated from Retail Beef and Mince Beef. *Journal of Human Ecology*. 56 (1,2): 20-30, 2016.
- [158] Kalender, H., Şen, S., Tavuk Etleri ve Tavuklardan İzole Edilen Salmonella enterica subsp. enterica Serovar Enteritidis Suşlarının Faj Tiplendirilmesi ve Pulsed-Field Gel Electrophoresis ile Analizi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 34 (2): 15-24, 2008.
- [159] Bonnet, C., Diarrassouba, F., Brousseau, R., Masson, L., Topp, E., Diarra, M. S., Pathotype and Antibiotic Resistance Gene Distributions of *Escherichia coli* Isolates from Broiler Chickens Raised on Antimicrobial-Supplemented Diets. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (22): 6955–6962, 2009.
- [160] Yang, X., Zou, W., Zeng, J., Xie, S., An, T., Luo, X., Wang, H., Prevalence of antimicrobial resistance and integron gene cassettes in *Escherichia coli* isolated from yaks (*Poephagus grunniens*) in Aba Tibetan Autonomous Prefecture, China. *Microbial Pathogenesis*. 111, 274–279, 2017.
- [161] Yue, L., Jiang, H.-X., Liao, X.-P., Liu, J.-H., Li, S.-J., Chen, X.-Y., Liu, Y.-H., Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*. 132 (3-4): 414–420, 2008.
- [162] Awosile, B. B., McClure, J. T., Sanchez, J., VanLeeuwen, J., Rodriguez-Lecompte, J. C., Keefe, G., Heider, L. C., Short communication: Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in colostrum from New Brunswick, Canada, dairy cows harbor bla CMY-2 and bla TEM resistance genes. *Journal of Dairy Science*. 100 (10): 7901–7905, 2017.

- [163] Barrios-Villa, E., Cortés-Cortés, G., Lozano Zarain, P., Romero-Romero, S., Lara Flores, N., Estepa, V., Rocha-Gracia, R. del C., Characterization of extended-spectrum and CMY-2 β -lactamases, and associated virulence genes in *Escherichia coli* from food of animal origin in México. *British Food Journal*. 120 (7): 1457–1473, 2018.
- [164] Koo, H.-J., Woo, G.-J., Characterization of Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Recovered from Foods of Animal and Fish Origin in Korea. *Journal of Food Protection*, 75 (5): 966–972, 2012.
- [165] Aydın, F., İça, T., Yontar, A., Kayseri Yöresinde Süt Sığırlarında *Escherichia coli* O157:H7'nin Konvensiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*. 19 (3) : 159-166, 2010.
- [166] Sezgin, E., Aydın'da Tüketime Sunulan Kıyma Ve Hamburger Köftelerde *Escherichia coli* O157:H7 Varlığının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 2013.
- [167] Jahed, R., Tavuklardan İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Dirençliliğinin Saptanması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, 2012.
- [168] Can, H. Y., Elmali, M., Seasonal Distribution and Virulence Properties of *Escherichia coli* O157, *Escherichia coli* O157:H7 Isolated from Minced Meat and Traditional Cheese Samples. *Kocatepe Veteriner Dergisi*. 10 (4): 256–263, 2017.
- [169] Cantekin, Z., Kanatlı Orijinli *Escherichia coli* Suşlarının Virülens Özelliklerinin Fenotipik ve Moleküler Metotlarla Belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, 2008.