TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIĞIR KARKASLARINDA VE KESİMHANE ORTAMINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇLİ EKSTRAİNTESTİNAL PATOJENİK *ESCHERİCHİA COLİ* (ExPEC) VARLIĞININ BELİRLENMESİ

Reşat ÇİFTÇİ

DOKTORA TEZİ

BESİN/GIDA HİJYENİ ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hüsnü Şahan GÜRAN

DİYARBAKIR-2023

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIĞIR KARKASLARINDA VE KESİMHANE ORTAMINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇLİ EKSTRAİNTESTİNAL PATOJENİK *ESCHERİCHİA COLİ* (ExPEC) VARLIĞININ BELİRLENMESİ

Reşat ÇİFTÇİ

DOKTORA TEZİ

BESİN/GIDA HİJYENİ ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hüsnü Şahan GÜRAN

DİYARBAKIR-2023

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Reşat ÇİFTÇİ'nin hazırladığı "Sığır Karkaslarında ve Kesimhane Ortamında Antibiyotik Dirençli Ekstraintestinal Patojenik *Escherichia coli* (ExPEC) Varlığının Belirlenmesi" başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 16/06/2023

Danışman	Prof. Dr. Hüsnü Şahan GÜRAN	_____
Jüri Üyeleri		İmza
Jüri Başkanı	Prof. Dr. Ali ARSLAN	_____
Üye	Prof. Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU	_____
Üye	Prof. Dr. Aydın VURAL	_____
Üye	Prof. Dr. Mehmet Emin ERKAN	_____
Üye	Prof. Dr. Hüsnü Şahan GÜRAN	_____

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun …./…/20.. tarih ve ……..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

20/06/2023

Prof. Dr. Mahmut BALKAN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tez planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

15/06/2023

Reşat ÇİFTÇİ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin başından sonuna kadar engin bilgi, birikim ve tecrübeleri ile her daim yanımda olan, her türlü konuda desteğini esirgemeyen, bilimsel çalışma disiplinini, bilim etiği ve bilimsel değerleri öğrendiğim, örnek aldığım, bana yol gösterici ve ışık tutan saygıdeğer danışman hocam, sayın Prof. Dr. Hüsnü Şahan GÜRAN'a çok teşekkür eder saygılarımı, hürmetlerimi sunarım.

Doktora süresince desteklerini esirgemeyen Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nın değerli hocaları Prof. Dr. Aydın VURAL, Prof. Dr. Mehmet Emin ERKAN ve Dr. Öğretim Üyesi Berna DUMAN AYDIN'a teşekkür ederim.

Doktora süresince daima yanımda olan, her türlü katkı ve desteği sağlayan Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anailim Dalı Öğretim Görevlisi Uğur UÇAR'a teşekkür ederim. Yüksek Lisans öğrencileri Veteriner Hekim Ruhal BENGİN ve Veteriner Hekim Sena Nur DEMİR'e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tezimin antibiyotik duyarlılık testi aşamasının gerçekleştirilmesinde her türlü destek ve katkı sağlayan sayın Uzm. Dr. Elif OKUMUŞ'a ve ERIC-PCR aşamasının gerçekleştirilmesinde destek ve katkı sağlayan sayın Doç. Dr. Serhat AL'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince maddi manevi hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve her daim yanımda olan sevgili eşim Fatma ÇİFTÇİ'ye, daima bana moral ve motivasyon sağlayan canım kızım Berfin ÇİFTÇİ ve oğlum Burak ÇİFTÇİ'ye çok teşekkür ederim.

Bu tez Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP) tarafından Veteriner.20.003 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Reşat ÇİFTÇİ

Diyarbakır-2023

Sevgili eşim Fatma, kızım Berfin ve
oğlum Burak'a ithafen…

İÇİNDEKİLER

BEYAN I
TEŞEKKÜR II
İÇİNDEKİLER..... IV
KISALTMALAR VE SİMGELER VII
ŞEKİLLER LİSTESİ IX
TABLOLAR LİSTESİ X
1.ÖZETLER 1
1.1. Türkçe Özet 1
1.2. İngilizce Özet 3
2. GİRİŞ ve AMAÇ 4
3. GENEL BİLGİLER 7
3.1. *Escherichia coli*..... 7
3.1.1. İntestinal patojenik *E. coli*..... 9
3.1.1.1. Enteropatojenik *E. coli*..... 9
3.1.1.2. Enteroaggregative *E. coli*..... 9
3.1.1.3. Enterotoksijenik *E. coli*..... 10
3.1.1.4. Enteroinvasive *E. coli*..... 11
3.1.1.5. Diffüz adherent *E. coli* (DAEC)..... 11
3.1.1.6. Enterohemorajik (Shiga toksin üreten) *E. coli* (EHEC/STEC)..... 12
3.2. Ekstraintestinal Patojenik *E. coli*..... 12
3.2.1. Üropatojenik *E. coli* (UPEC)..... 13
3.2.2. Kanatlı patojenik *E. coli* (APEC)..... 13
3.2.3. Yenidoğan meninjiti *E. coli* (NMEC)..... 14
3.2.4. Meme patojenik *E. coli* (MPEC)..... 14
3.2.5. Endometrial patojenik *E. coli* (EnPEC)..... 15
3.3. ExPEC Rezervuarları..... 15
3.3.1. İnsan rezervuarları..... 16
3.3.2. Evcil hayvan rezervuarları..... 16
3.3.3. Çevresel rezervuarları..... 18
3.3.4. Gıda rezervuarları..... 18

3.4. ExPEC Virülans Faktörler…… 19
3.4.1. Adezinler……... 19
3.4.1.1. Biofilm…… 19
3.4.2. İnvasinler……... 20
3.4.3. Demir alım faktörleri…… 20
3.4.3.1. Enterobaktin……... 23
3.4.3.2. Salmochelin…… 23
3.4.3.3. Aerobaktin…….. 23
3.4.3.4. Yersiniabaktin…… 23
3.4.4. Koruyucular/Serum direnci……... 24
3.4.4.1. TraT…… 24
3.4.4.2. OmpA……. 24
3.4.4.3. Kapsüler antijenler……. 25
3.4.5. Toksinler…… 25
3.4.5.1. α-Hemolysin……... 25
3.4.5.2. Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1(CNF1)…….. 26
3.4.5.3. Tip V salgı ailesi……. 26
3.5. *E. coli* suşlarının filogenetik grupları……... 26
3.6. ExPEC türlerinde antimikrobiyal direnç…….. 27
4. GEREÇ VE YÖNTEM…… 30
4.1. Gereç…… 30
4.1.1. Çalışma dizaynı ve örneklerin toplanması…… 30
4.1.1.1. Karkas örneklerinin alınması……. 31
4.1.1.2. Rektal örneklerinin alınması…….. 32
4.1.1.3. Deri örneklerinin alınması……. 32
4.1.1.4. Bıçaklardan örnek alınması…… 32
4.1.1.5. Personel ellerinden örnek alınması……. 32
4.1.1.6. Padoklardan örnek alınması……... 32
4.1.1.7. Su örneğinin alınması……. 32
4.2. Yöntem……. 33
4.2.1. Klasik kültür tekniği ile *E. coli* izolasyonu……... 33

4.2.2. *E. coli* izolatlarının bakteriyel identifikasyon sisteminde tanımlanması……... 36
4.2.3. *E. coli* izolatlarının moleküler karakterizasyonu……... 36
4.2.3.1. Referans suşlar……... 36
4.2.3.2. DNA ekstraksiyonu……... 37
4.2.3.3. DNA saflık kontrolleri ve miktar tayinleri……. 37
4.2.4. Moleküler analizler…… 37
4.2.4.1. 16S rRNA bölgesinin PCR ile tespiti……. 38
4.2.4.2. ExPEC varlığının multipleks PCR ile belirlenmesi……... 39
4.2.4.3. Filogenetik Grupların Belirlenmesi…… 40
4.2.4.4. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ve görüntülenmesi…… 41
4.3. Antibiyotik Duyarlılık Testi……. 41
4.4. ExPEC izolatları arasında klonal ilişkinin belirlenmesi……... 42
4.5. İstatiksel analizler……. 42
5. BULGULAR……..... 43
5.1. *E. coli*'nin Kültür Yöntemi ile Tanımlanması ve PCR'da doğrulanması. 43
5.2. ExPEC Varlığı…….. 44
5.3. ExPEC İzolatlarında Filogenetik Grupların Dağılımı…….. 48
5.4. ExPEC İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığının Tespit Edilmesi…..…. 50
5.5. ExPEC İzolatlarının ERIC-PCR Profilleri……... 53
6. TARTIŞMA……... 55
7. SONUÇ……... 61
8. KAYNAKÇA……. 62
9. ÖZGEÇMİŞ……... 83
10. EKLER……. 84
10.1. Doktora için makale şartı……... 84
11. ORİJİNALLİK RAPORU……..... 85

KISALTMALAR ve SİMGELER

AB	:	Avrupa Birliği
ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
aEPEC	:	Atipik Enteropatojenik *E. coli*
Afa	:	Afimbrial adezinler
AMR	:	Antimikrobiyal direnç
APEC	:	Kanatlı patojenik *E. coli*
bp	:	Base pair
CDC	:	Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi
CNF1	:	Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1
DAEC	:	Diffüz adherent *E. coli*
E. coli	:	*Escherichia coli*
EAEC	:	Enteroagregatif *E. coli*
EAF	:	Enteropatojenik *E. coli* aderens faktörü
EFSA	:	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EHEC	:	Enterohemorajik *E. coli*
EIEC	:	Enteroinvazif *E. coli*
EMB	:	Eosin Methylene-Blue
EnPEC	:	Endometriyal patojenik *E. coli*
EPEC	:	Enteropatojenik *E. coli*
ERIC-PCR	:	Enterobakteriyal Tekrarlayan İntergenik Konsensüs Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ETEC	:	Enterotoksijenik *E. coli*
EUCAST	:	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
ExPEC	:	Ekstra intestinal patojenik *E. coli*
HBMEC	:	İnsan Beyni Mikrovasküler Endotel Hücrelerinin
İYE	:	İdrar yolu infeksiyonları
kDa	:	Kilodalton
kob	:	Koloni oluşturan birim
LT	:	Isı labil toksin
MİK	:	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

MLST : Multilokus dizi tiplemesi

MLVA : Çok lokuslu değişken sayılı tandem tekrar analizi

MPEC : Meme patojenik *E. coli*

NMEC : Yenidoğan meninjiti *E. coli*

OECD : Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü

OEP : Dış zar akış proteini

pEAF : Enteropatojenik *E. coli* plazmidi

PFGE : Darbeli alan jel elektroforezi

Pic : Kolonizasyonda yer alan proteaz

Sat : Salgılanan ototransporter toksin

SePEC : Sepsis ilişkili *E. coli*

Sfa : S-fimbrial adezinler

ST : Isı stabil toksin

STEC : Shiga toksin üreten *E. coli*

tEPEC : Tipik Enteropatojenik *E. coli*

UPEC : Üropatojenik *E. coli*

USDA : Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı

Vat : Vakumlanan ototransporter

VF : Virülans faktörleri

VT : Verositotoksinler

VTEC : Verositotoksin üreten *E. coli*

WGS : Tüm genom sekanslama

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER LİSTESİ

		Sayfa No
Şekil 1	Patojenik *E. coli* suşlarının sınıflandırılması……..	8
Şekil 2	ExPEC'in gıda, hayvanlar ve insanlar arasındaki döngüsü…..	17
Şekil 3	Antibiyotik dirençli ExPEC'in insan, hayvan ve çevre yoluyla yayılması …….....	29
Şekil 4	Batman ve Diyarbakır İli Haritası……	30
Şekil 5	Karkas örneklem bölgeleri……	31
Şekil 6	Karkas, deri, padok, personel eli ve bıçak örnekleri için kullanılan sünger svab……...	34
Şekil 7	Rektal örnekler için kullanılan eküvyon çubuğu……..	34
Şekil 8	MacConkey agar besiyerinde üreyen *E. coli* şüpheli kolonilerin görünümü.....	35
Şekil 9	EMB agar besiyerinde üreyen *E. coli* şüpheli kolonilerin görünümü……..	35
Şekil 10	İndol testi pozitif örnek…….	36
Şekil 11	Filogenetik karar ağacı……..	41
Şekil 12	PCR ile *E. coli* olarak tespit edilen izolatların agaroz jel görüntüsü…….	44
Şekil 13	ExPEC izolatlarında Multipleks PCR ile tespit edilen *papA, papC, fimH* ve *iutA* genlerinin agaroz jel görünümü ……...	46
Şekil 14	ERIC-PCR ile ExPEC izolatlarından elde edilen bantların dendrogram analizi…….....	54

TABLOLAR LİSTESİ

		Sayfa No
Tablo 1	ExPEC patotiplerinde virülans genler ve fonksiyonları ……..	21
Tablo 2	İllere göre toplanan örneklerin sayısı ve dağılımı…….....	32
Tablo 3	Moleküler analizlerinde kullanılan primerler….....	38
Tablo 4	Multipleks PCR reaksiyon içeriği……	39
Tablo 5	Multipleks PCR siklus protokolü…….	40
Tablo 6	Tripleks PCR reaksiyon içeriği……	40
Tablo 7	Tripleks PCR siklus protokolü…….	40
Tablo 8	*E. coli* varlığının dağılımı……	43
Tablo 9	Örneklere göre ExPEC'nin dağılımı ……...	45
Tablo 10	İl bazında ExPEC olarak tanımlanan izolatlarda virulens genlerin dağılımı……...……...	47
Tablo 11	İkili karar ağacına göre filogenetik grupların yorumlanması..	48
Tablo 12	Örneklerden elde edilen ExPEC izolatlarının filogenetik gruplara göre dağılımı……..	48
Tablo 13	ExPEC olarak tanımlanan izolatlarda filogenetik grupların dağılımı……	49
Tablo 14	ExPEC izolatlarının antibiyotiklere karşı direnç ve duyarlılık düzeyleri……...	51
Tablo 15	ExPEC izolatlarında virülens genlerin, antibiyotik direnç fenotiplerinin ve filogenetik grupların dağılımı……...	52

Sığır Karkaslarında ve Kesimhane Ortamında Antibiyotik Dirençli Ekstraintestinal Patojenik *Escherichia coli* (ExPEC) Varlığının Belirlenmesi

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Reşat ÇİFTÇİ
Danışmanı: Prof. Dr. Hüsnü Şahan GÜRAN
Anabilim Dalı: Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi

1. ÖZETLER

1.1. Türkçe Özet

Amaç: Bu çalışmada, besi sığırlarında ve kesimhane ortamında ExPEC varlığının, filogenetik gruplarının, antimikrobiyal direnç fenotiplerinin ve bunların klonal ilişkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Toplam 447 besi sığırı örneği [rektum (n:133), deri (n:133), karkas (n:133)], çevre örnekleri [padok (n:12), bıçak (n:18), su (n:6)] ve personel eli örneklerinde [(n:12)] klasik mikrobiyolojik yöntemler ve multipleks PCR (*papA, papC, iutA, kpsMTII* ve *fimH* virülans genleri) kullanılarak ExPEC varlığı analiz edildi. Filogenetik grupları triplex PCR ile (*TspE4.C2* klonu, *chuA* ve *yjaA* genleri), ERIC-PCR ile klonal ilişkileri test edildi ve EUCAST standartlarına göre antibiyotik duyarlılığı tarandı.

Bulgular: Analiz edilen 447 numuneden 36'sının (% 8,80) ExPEC ile kontamine olduğu tespit edildi. Karakterize edilen 36 ExPEC izolatı arasında, D (14/36, % 38,88), B2 (9/36, % 25), B1 (9/36, %25) ve A (2/36, % 5,55) olmak üzere dört filogenetik grup tanımlanmıştır. İzolatların % 61,11'inin (22/36) en az iki antibiyotiğe dirençli olduğu ve en yüksek direncin % 61,11 ile ampisiline karşı olduğu belirlendi. ERIC-PCR sonuçları, 100 ile 1500 bp arasında değişen çok sayıda bandın (1-5 bant) çoğaldığını gösterdi. Ayrıca, ERIC-PCR paternleri 19 kümede sınıflandırıldı.

Sonuç: Bu çalışma sonuçları, besi sığırı ve kesimhane ortamlarının genetik olarak benzer antibiyotiğe dirençli ExPEC'ler için potansiyel bir kontaminasyon kaynağı

olabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, besi sığırlarında ExPEC'in düzenli olarak izlenmesi ve Tek Sağlık yaklaşımı içinde ele alınması önemli olacaktır.

Anahtar sözcükler: Besi sığırı, Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC), kesimhane, antimikrobiyal duyarlılık, filogenetik grup, klonal ilişki

Determination of Presence of Antibiotic Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in Cattle Carcasses and Slaughterhouse Environment

Student's Surname and Name: ÇİFTÇİ Reşat
Adviser of Thesis: Prof. Dr. Hüsnü Şahan GÜRAN
Department: Food Hygiene and Technology

1.2. Abstract

Aim: In this study, it was aimed to determine ExPEC presence, phylogenetic groups, antimicrobial-resistant phenotypes, and their clonal relatedness in beef cattle and slaughterhouse environment.

Materials and Methods: A total of 447 beef cattle samples [rectum (n:133), hides (n: 133), carcass (n:133)], environment samples [paddock (n:12), knife (n:18), water (n:6)], and workers hand samples [(n:12)] were analyzed for the presence of ExPEC using classic microbiological methods and multiplex PCR (*papA*, *papC*, *iutA*, *kpsMTII* and *fimH* virulence genes). Phylogenetic groups were tested by triplex PCR (TspE4.C2 clone, *chuA* and *yjaA* genes), and clonal relatedness was tested by ERIC-PCR, and screened for antibiotic susceptibility according to the EUCAST standards.

Results: 36 (8,80%) out of the 447 samples analyzed were contaminated with ExPEC. Among the 36 ExPEC isolates characterized, four phylogenetic groups were identified including D (14/36, 38,88%), B2 (9/36, 25%), B1 (9/36, 25%) and A (2/36, 5,55%). It was determined that 61,11 % (22/36) of the isolates were resistant to at least two antibiotics and the highest resistance was found against ampicillin with 61,11 %. The ERIC-PCR results showed that proliferated numerous bands (1-5 bands), ranging from 100 to 1500 bp. Moreover, the ERIC-PCR patterns were classified into 19 clusters.

Conclusion: The results of this study show that beef cattle and slaughterhouse environments can be a potential contamination source of genetically similar antibiotic-resistant ExPECs. In this context, it will be important to monitor ExPEC regularly in beef cattle, and to deal with it within the framework of One Health approach.

Keywords: Beef cattle, Extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), slaughterhouse, antimicrobial susceptibility, phylogenetic groups, clonal relatedness

2. GİRİŞ VE AMAÇ

Sağlıklı ve dengeli beslenmede, kırmızı et içerdiği yüksek protein oranı, zengin mineral maddeler (demir, çinko) ve vitaminler (B12) nedeniyle insan beslenmesinde vazgeçilmez bir gıda maddesidir. Özellikle yapısında bulunan esansiyel aminoasitler çocukların zihinsel ve fiziksel gelişimi için hayati öneme sahiptir (1). Dünyada kırmızı et üretimine baktığımızda, Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde 2019 yılında 7.900/Bin ton, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 12.381/Bin ton sığır ve dana eti üretilirken, Türkiye'de ise 2019 yılında 1.075,48 ton sığır eti üretimi gerçekleştiği bildirilmiştir (https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf, Erişim tarihi: 30 Nisan 2023, https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Kirmizi-Et-Uretim-Istatistikleri-2020-2021, Erişim tarihi: 30 Nisan 2023). Yine 2019 yılı verilerine göre yıllık kişi başı sığır eti tüketimi, AB ülkelerinde 14,4 kg/kişi, ABD'de 26 kg/kişi iken, Türkiye'de ise bunun 11,1 kg/kişi olarak gerçekleşmiştir. Yapılan projeksiyonlar dünyada hayvansal kaynaklı gıdaların gelecekte de insan beslenmesinde önemli protein kaynağı olmaya devam edeceğini göstermektedir (https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm, Erişim tarihi: 30 Nisan 2023). Ancak hayvansal kaynaklı gıdalar patojenler ile kontamine olabilmekte ve bu gıdaların tüketilmesi sonucu insanlarda gıda kaynaklı zehirlenmeler ile sonuçlanabilmektedir. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC)'ne göre ABD'de her yıl yaklaşık 48 milyon insan gıda kaynaklı zehirlemelerden hastalandığı tahmin edilmektedir. Bu tahmin, 128 000 hastaneye yatış ve 3.000 ölümle sonuçlandığı verilerin, kontamine gıdalardan her 6 Amerikalıdan 1'inin hastalanmasına eşdeğerdir. Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA)'na göre gıda kaynaklı hastalıkların ABD'ye maliyetinin yılda 15,6 milyar dolardan fazla olduğu bildirilmektedir (https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf, Erişim tarihi: 30 Nisan 2023). Gıda kaynaklı salgınların % 22'sinin hayvansal orijinli gıdalardan kaynaklanırken, bunun % 9'unun sığır eti kaynaklı olduğu bildirilmektedir (https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/3/11-1866_article, Erişim tarihi: 30 Nisan 2023). Hastaneye yatış ve ölümle sonuçlanan gıda kaynaklı salgınlara çoğunlukla

Salmonella spp., *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp., Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC), Norovirus ve *Listeria monocytogenes* gibi patojenler neden olmaktadır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından 2021 yılında toplam 4.005 gıda kaynaklı salgın ve 20.017 insan vakası rapor edilmiştir. Bu salgın ve vakaların çoğunluğundan *Campylobacter* ve *Salmonella* patojenlerinin sorumlu olduğu bildirilmiştir (https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/monitoring-foodborne-diseases, Erişim tarihi: 30 Nisan 2023).

Hayvansal kaynaklı gıdalar ekstra intestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) gibi gastro-intestinal organlar dışında hastalık yapan etkenler için kontaminasyon kaynağı ve/veya vektör olarak rol oynayabilmektedir (2,3). Bu alanda yapılan araştırmalar, kanatlı eti, domuz eti, sığır eti, süt, bitkisel gıdalar ve suların ExPEC açısından potansiyel kontaminasyon kaynağı olabileceğini göstermektedir (4-7). Kanatlı patojenik *E. coli* (APEC) ile insan klinik ExPEC suşları arasında klonal benzerliklerin olması, APEC ile insan üropatojenik *E. coli* (UPEC) ve yenidoğan meninjiti *E. coli* (NMEC) suşları arasında da önemli bir ilişkinin olduğunu ortaya koymaktadır (5,8).

Mikrobiyal kontaminasyonun kaynağının tespiti, bulaş yollarının izlenilmesi ve izolatlar arası genetik yakınlığın belirlenmesinde farklı moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır (9,10). Darbeli alan jel elektroforezi (PFGE), ribotipleme, çok lokuslu değişken sayılı tandem tekrar analizi (MLVA), multilokus dizi tiplemesi (MLST) ve tüm genom sekanslama (WGS) gibi birçok moleküler genomik teknolojiye rağmen, Enterobakteriyel Tekrarlayan İntergenik Konsensüs Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ERIC-PCR) yöntemi farklı *E. coli* suşlarının klonal yakınlığının saptanmasında hızlı ve uygun maliyetli bir yöntem olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir (11-13).

ExPEC'in zoonotik potansiyel durumu ile ilgili yapılan çalışmalar sığırların ExPEC için kontaminasyon kaynağı olabileceğini desteklese de, bu alanda literatürde sınırlı sayıda çalışma olduğu dikkati çekmektedir. Ülkemizde ExPEC ile ilişkili gerçekleştirilen araştırmaların çok önemli bir bölümünün insan klinik materyallerinde yapıldığı ve hayvansal gıdalarda ExPEC varlığı ile ilgili pek araştırmanın bulunmadığı görülmektedir.

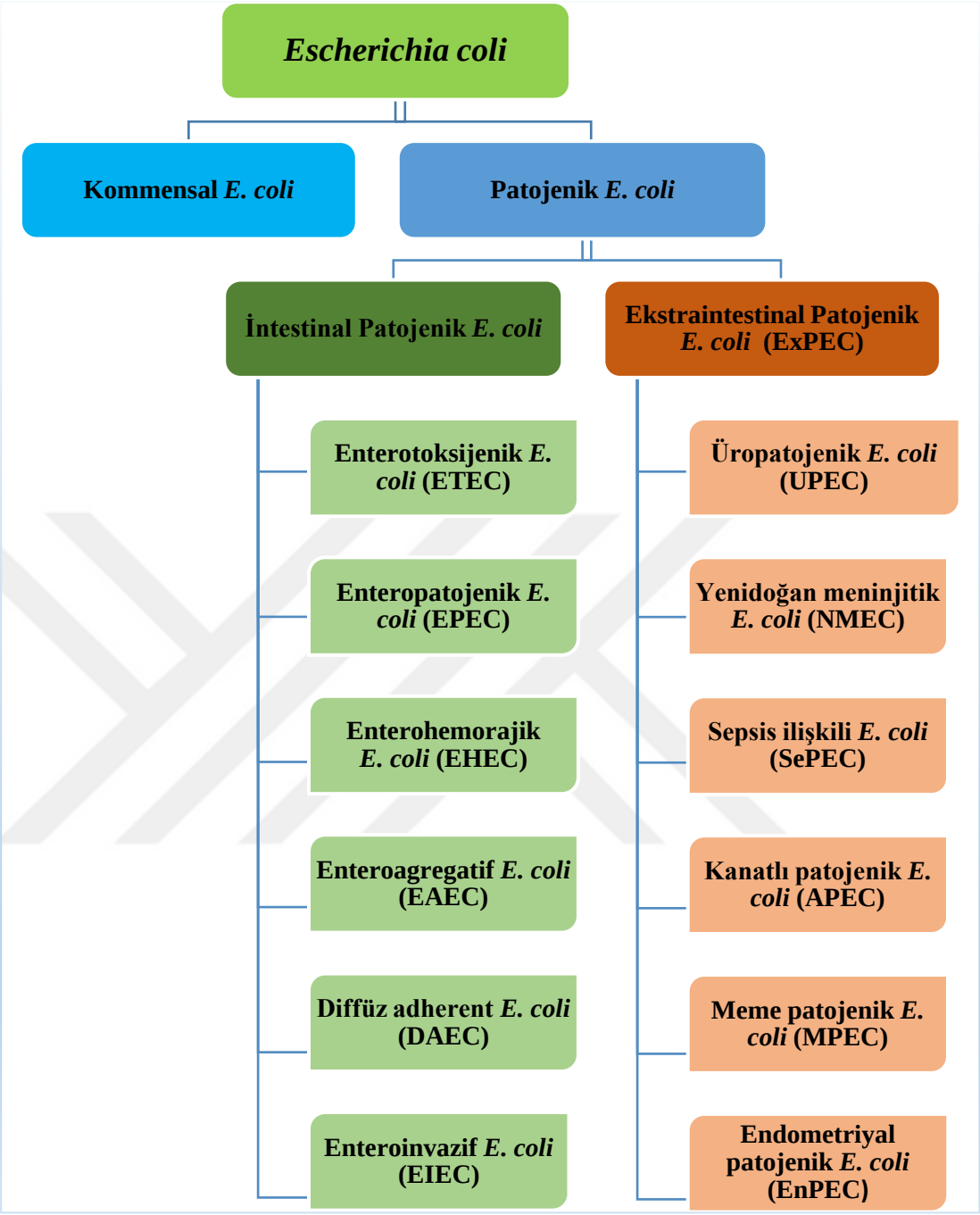
Bu kapsamda bu tez çalışması ile: i) sığır karkas, rektal ve deri materyalleri ile kesimhane ortamıyla ilişkili örneklerde ExPEC varlığının ortaya koyulması, ii) ExPEC izolatlarında filogenetik gruplarının belirlenmesi, iii) antibiyotik direnç durumunun tespiti ve iv) izolatlar arasında klonal ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. *Escherichia Coli*

Escherichia coli (*E. coli*), *Bacteria* aleminde, *Negibacteria* alt aleminde, *Proteobacteria* şubesinde, *Gammaproteobacteria* sınıfında, *Enterobacteriales* takımında, *Enterobacteriaceae* familyasına ait Gram negatif çubuk şeklinde bir bakteri olup, hem insanların hem de hayvanların gastrointestinal sisteminde normal floranın bir parçasıdır (14). 1885 yılında Alman çocuk doktoru Theodero Escherich tarafından tanımlandıktan sonra, Castellani ve Chalmers tarafından 1919 yılında *Escherichia coli* adı verilmiştir. Fakültatif anaerob, spor oluşturmayan bir bakteri olan *E. coli* katalaz pozitif ve oksidaz negatif özelliktedir. Sahip olduğu flagelları ile tipik harekete sahip iken, bazılarında ise flagella olmadığından hareketsiz özelliktedir. *E. coli* 'nin serolojik tiplendirilmesinde somatik (O), kapsüler (K) ve flagellar (H) antijenine göre değerlendirme yapılmaktadır (15,16). Bazı patojenik *E. coli* suşları intestinal hastalıklara (intestinal patojenik *E. coli*) neden olurken, diğerleri ekstraintestinal hastalıklara neden olur (ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) (17).

İntestinal patojenik *E. coli* virulans özelliklerine göre; Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Enteroagregatif *E. coli* (EAEC), Diffüz adherent *E. coli* (DAEC) ve Enteroinvazif *E. coli* (EIEC) olmak üzere 6 farklı patotipte tanımlanmaktadır. Benzer şekilde Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC)'ler ise virulens özelliklerine göre kendi içinde üropatojenik *E. coli* (UPEC), yenidoğan meninjitik *E. coli* (NMEC), sepsis ilişkili *E. coli* (SePEC), kanatlı patojenik *E. coli* (APEC), meme patojenik *E. coli* (MPEC) ve endometriyal patojenik *E. coli* (EnPEC) olarak sınıflandırılır (Şekil 1) (18,19).



Şekil 1. Patojenik *E. coli* suşlarının sınıflandırılması (20)

3.1.1. İntestinal patojenik *E. coli*

3.1.1.1. Enteropatojenik *E. coli*

Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) ifadesi ilk olarak 1995 yılında, 1940'lar ve 1950'lerde epidemiyolojik olarak infantil ishal salgınıyla ilişkili bir dizi *E. coli* suşunu tanımlanması amacıyla kullanılmıştır (21). EPEC serotipleri shiga toksin üretmeyen, başlıca virulens faktörü olan adherenz özelliği ile bağırsak epitelyumuna yapışarak ishale neden olmaktadır. EPEC özellikle yeni doğan bebeklerde ve 2 yaşın altındaki çocuklarda en önemli ishal nedenleri arasında gösterilmektedir (17**)**. Diğer ishal yapan *E. coli* suşlarında olduğu gibi, EPEC'in bulaşması fekal-oral yolla, kontamine eller, kontamine bebek mamaları veya kontamine servis araçları ile olmaktadır. Bebeklerdeki enfeksiyonlarda enfeksiyöz doz bilinmemekle birlikte 10^8 kob (koloni oluşturan birim)'dan çok daha düşük olduğu tahmin edilmektedir. EPEC'in en yaygın serogrupları arasında O18ac, O20, O25, O44, O55, O86, O91, O111, O114, O119, O125ac, O126, O127, O128, O142 ve O158 yer almaktadır (22**,**23).

EPEC suşları arasındaki genom ve virülans mekanizmaları arasındaki farklılıklara bağlı olarak tipik EPEC (tEPEC) ve atipik EPEC (aEPEC) olmak üzere iki farklı grupta sınıflandırılır (24). İnsanda enfeksiyöz ishale neden olan tipik EPEC suşları, EPEC aderens faktörü (EAF) plazmidi (pEAF) olarak bilinen ve mikrokoloni formasyonundan sorumlu olan BFP (bundle-forming pili) adı verilen tip IV fimbriaları kodlayan büyük bir virülans plazmidi içerirken, aEPEC bu plazmide sahip değildir (25).

3.1.1.2. Enteroaggregative *E. coli*

Enteroagregatif *E. coli* (EAEC), dünya çapında çocuk ishallerinden sorumlu tutulan bir patojendir. Yapılan araştırmalar EAEC'nin gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde her yaştan insan grubunu etkileyen önemli bir ishal nedeni olduğunu göstermektedir. EAEC'nin patojenik hastalık oluşturabilmesi için vücuda 10^{10} kob düzeyinde alınması gerekmektedir. EAEC, genellikle agregatif yapışma fimbrialarının aracılığı ile bağırsakta kolonize olduktan sonra, mukoid biyofilm oluşumu ve enterotoksinler ile sitotoksinlerin salgılanmasıyla ishale neden olmaktadır. EAEC'nin neden olduğu ishal sulu, genellikle mukuslu, kanlı veya kansız, karın ağrısı, kusma ve düşük ateşle seyreder. Akut kendi kendini sınırlayan ishal olağan patolojisi olup, ancak

bazı hastalarda 14 günden fazla süren uzun süreli ishal gelişebilir. Uzun süreli ishal, konağın bağışıklığına, beslenme durumuna ve genetik yatkınlığına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (26,27).

Yapılan çalışmalarda insan ve hayvanlarda EAEC'nin jejunal, ileal ve kolonik epitelyuma bağlanabildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, en büyük hasarı EAEC'nin IL-8 gibi enflamatuar mediatörleri ortaya çıkardığı ve mikrovillus vezikülasyonu, genişlemiş kript açıklıkları ve artan epitel hücre ekstrüzyonu gibi sitotoksik etkiler ürettiği kolondadır. EAEC O3, O7, O15, O21, O44, O77, O82, O86, O111, O126, O127 ve O128 olmak üzere farklı serogruplar içinde yer alır (28,29).

3.1.1.3. Enterotoksijenik *E. coli*

Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) suşları, kolonizasyon faktörlerinin üretimi ve oluşturduğu enterotoksin LT (ısı labil toksin) ve ST (ısı stabil toksin)'den en az biri ile karakterize edilir. ETEC suşları bağırsak mukozasına yapıştıktan sonra, ishale neden olan enterotoksinler üretir. LT ve ST toksinleri, epitelyal membrandaki membran iyon kanallarının bozulmasına neden olduktan sonra, yüksek oranda iyon ve su kaybı ile sulu ishale yol açarlar. ETEC hafif ve kendi kendini sınırlayan ishalden, ölümlerle sonuçlanabilecek şiddetli ishale kadar değişen derecelerde hastalıklara neden olabilmektedir (30,31). Özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki çocuklarda ve bu ülkelere seyahat edenlerde görülen ishallerden ETEC suşları sorumlu tutulmaktadır. İnsanlar dışında tavuk, domuz, sığır ve diğer çiftlik hayvanlarında ishallerle seyretmesinden dolayı önemli ekonomik kayıplara da neden olmaktadır (32).

ETEC suşlarının serolojik tiplendirmesi, dış zar proteinlerinin kompozisyonuna bağlı olarak, 100'den fazla somatik serogrup (O) ile en az 34 flagellar (H) tipten oluşur. ETEC ile ilişkili ishallerin sıklıkla O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159 ve O173 serotip kaynaklı olduğu bildirilmektedir. ETEC insan dışkısı ile kontamine olmuş yiyecek ve/veya su yoluyla yayılmakta ve insanlar bu patojenin temel bulaş kaynağını oluşturmaktadır. Enfeksiyöz dozun bu patojen için 10^6 - 10^{10} kob arasında değiştiği tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, çocuklar ve yaşlılar gibi savunma sistemi baskılanmış bireyler, daha düşük dozlarda etkene maruz kalma sonucu enfekte olabilmektedir (33,34). Her yıl farklı ETEC suşlarının neden olduğu enfeksiyonların, 200 milyon vakayı büyük ölçüde aşan ve özellikle sağlık

koşullarının kötü olduğu tropik bölgelerdeki bebekler ve küçük çocuklar arasında yıllık yaklaşık 75.000 ölümlü vakaya neden olduğu bildirilmektedir (35).

3.1.1.4. Enteroinvasive *E. coli*

Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), ilk kez 1947'de Ewing ve Grawatti tarafından tanımlanmış olup, özellikle gelişmekte olan ülkelerde insan ve hayvanlarda dizanteri benzeri ishallerden sorumlu tutulmaktadır. Hastalık genellikle gelişmekte olan ülkelerde çocuk diyarelerinin önemli nedenleri arasında yer alırken, erişkinlerde ise gıda kaynaklı infeksiyonların nedenleri arasındadır. Bu patojen çoğunlukla kalın bağırsak mukozasına bağlanarak endositoz yoluyla hücrelere yayılır (17,36).

EIEC'nin en yaygın serogrupları arasında, O28ac:H, O29:H, O112ac:H, O121:H, O124:H, O124:H30, O135:H, O136:H, O143:H, O144:H, O152:H, O159:H, O164:H, O167:H ve O173:H yer almaktadır (37).

3.1.1.5. Diffüz adherent *E. coli*

Gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunu olan ishalin nedenleri arasında yer alır. Diffüz adherent *E. coli* (DAEC), epitel hasarlarına bağlı ishallere neden olan bakteriyel bir patojen olarak tanımlanır (38). DAEC suşları, kültürlenmiş HeLa ve HEp-2 epitel hücreleri üzerindeki yaygın yapışma modeli ile karakterize edilirler. DA modelinde, bakteriler hücre yüzeyini düzgün bir şekilde kaplar. Adhezinler Afa/Dr DAEC ve AIDA-I DAEC olmak üzere iki grup DAEC suşu tanımlanmıştır. Ayrıca, bu adhezin genleri DAEC'nin farklı bağlanma özellikleri ile fenotipik değişkenliğe neden olur (17,39).

DAEC suşlarının Afa/Dr genlerinin özellikle kalıcı ishali olan 6 aylık ve daha büyük çocuklarda akut ishal ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (40). Afa/Dr genlerini taşıyan DAEC suşları, fimbrial ve afimbrial adezinler, afimbrial adezinler Afa-I, Afa-II, Afa-III, Afa-V, Afa-VII, Afa-VIII ve Dr-2'nin yanı sıra Dr ve F1845 fimbrial adezinleri içerir. Bu adezinlerin birçoğu, yalnızca sığır dışkısından izole edilen *E. coli*'de bulunan Afa-VII dışında, insan idrar yolu infeksiyonlarından veya ishalden izole edilen *E. coli* suşlarında tanımlanmıştır (39).

3.1.1.6. Enterohemorajik (Shiga toksin üreten) *E. coli* (EHEC/STEC)

Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), özellikle insanlarda ishal ile ilişkili en önemli patojen olarak kabul edilmektedir. EHEC suşlarının VTEC tanımı, in vitro vero hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteye sahip Verositotoksinler (VT'ler) üretmesi ile Verositotoksin üreten *E. coli* (VTEC) ve Shigella dysenteriae tip 1 tarafından üretilen Shiga-toksinine(stx1-stx2) yapısal ve işlevsel olarak benzerliklerinden dolayı, Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC) olarak da adlandırılmaktadır (41,42).

EHEC kaynaklı vakalarının çoğu, kanlı olmayan ishalden, hemorajik kolitis, trombotik trombositopenik purpura ve hemolitik üremik sendroma kadar değişen derecelerde semptomlarla seyreder. Tedavi gerektiren vakaların çoğunda ishal, hastalığın ikinci veya üçüncü gününde kanlı hale gelir ve bir haftaya kadar devam edebilir. Vakaların bir kısmı bu aşamada düzelirken yaklaşık % 20'sinde hayatı tehdit eden komplikasyonlar gelişir ve bunların en tehlikelisi akut böbrek yetmezliği ile karakterize olan hemolitik üremik sendromdur. EHEC'in doğada ana rezervuarı sığırlar olarak bilinmektedir (43,44). Bu kapsamda başta hayvansal kaynaklı gıdalar olmak üzere yeşil yapraklı sebzeler de dahil olmak üzere birçok gıda bu patojen ile ilişkilendirilmektedir. EHEC ile ilişkili hastalık vakalarında minimal enfeksiyon dozun 10 kob gibi çok düşük sayılarda alınmasının yeterli olacağı bildirilmektedir (45,46).

3.2. Ekstraintestinal Patojenik *E. coli*

Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC), hem insanlarda hem de hayvanlarda idrar yolu infeksiyonları, menenjit ve septisemi olmak üzere çeşitli infeksiyonlara neden olan önemli bir patojenik *E. coli* grubudur. ExPEC; üropatojenik *E. coli* (UPEC), septisemik *E. coli* (SEPEC), yenidoğan meninjiti *E. coli* (NMEC), kanatlı patojenik *E. coli* (APEC), meme patojenik *E. coli* (MPEC), endometrial patojenik *E. coli* (EnPEC) olarak sınıflandırılmaktadır (47,48). ExPEC'in neden olduğu enfeksiyonlar dünya çapında önemli halk sağlığı sorunları arasındadır. Başta idrar yolu enfeksiyonları olmak üzere neonatal menenjit, ciddi karın içi infeksiyonları ile daha az sıklıkla pnömoni, damar içi infeksiyonlar, osteomiyelit, yumuşak doku infeksiyonları

veya bazen bakteriyemi ile sonuçlanan hastalık durumlarına neden olur. Dünyada her yıl 130 ile 175 milyon arasında meydana gelen idrar yolu enfeksiyonunun yaklaşık % 80'inden UPEC sorumludur (49,50). Benzer şekilde sığırlarda da idrar yolu infeksiyon nedenleri arasında yer alan ExPEC suşları, sığırlarda mastitisler ile ilişkilendirilmektedir.

ExPEC'i kommensal ve enterik *E. coli*'den (ExPEC sınıflandırmasında da) ayıran en önemli özellikler, başarılı bir şekilde kolonizasyonlarına izin veren virülans özellikleridir. Virülans faktörleri arasında, adezinler (örn. fimbrialar), demir alım sistemleri, kapsüller ve toksinler (örn. Hemolizin) ExPEC için ayırt edici özellikler olarak gösterilir (51). ExPEC genellikle ürosepsis, piyelonefrit, prostatit, sistit ve menenjit gibi sendromlarla karakterize idrar yoluna veya sinir dokusu enfeksiyonuna neden olan virülans faktörü taşır. ExPEC ile ilişkili 30'dan fazla virülans faktörü bildirilmiştir. Bunlar arasında *papA, papC, papEF, papG, papGII (±III), papGIII (±II), papGII + III, sfa, focDE, sfaS, focG, afa/draBC, iha, bmaE, gafD, fimH, hlyD, cnf1, cdtB, fyuA, iutA, iroN, ireA, kpsMII, K1 kpsM, K2 kpsM, kpsMTIII, rfc, cvaC, traT, iss, ibeA, ompT, H7 fliC, malX* ve *ibeA* yer alır.

3.2.1. Üropatojenik *E. coli* (UPEC)

İdrar yolu infeksiyonlarının (İYE) % 70 ila 95'ine *E. coli* suşları neden olmaktadır. Sıklıkla ExPEC olarak adlandırılan bu suşlar, ürogenital sistem gibi daha yaşanması zor ortamlarda kolonize olmalarına izin veren spesifik virülans özelliklerine sahiptir. İnsanlardan elde edilen bazı ExPEC izolatları, hayvanlardan elde edilen ExPEC izolatlarına benzer virülans faktörü profillerine sahiptir ve bu suşların insanlarda İYE'ye neden olma potansiyeli nedeniyle, bu infeksiyonlara gıda kaynaklı İYE olarak atıfta bulunulmaktadır (51,52). Üropatojenik *E. coli* (UPEC), toplum kökenli idrar yolu infeksiyonunun (İYE) önde gelen nedeni olup, İYE vakalarının % 85'inden fazlasını oluşturmakta ve hastane kaynaklı İYE'nin önemli bir nedenidir. İYE'lerden sorumlu suşların çoğunun filogenetik grup B2'ye ve daha az bir kısmı filogenetik D grubuna ait *E. coli* suşları olduğu bildirilmektedir (36,53).

3.2.2. Kanatlı patojenik *E. coli* (APEC)

Etkenin gıda kaynaklı enfeksiyonlara yol açması ve zoonotik potansiyele sahip olması halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. APEC kaynaklı hastalıklar dünyada kanatlı üretim endüstrisinde her yıl ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Kanatlı hayvanlarda başta kolibasilloz olmak üzere koliseptisemi, hemorajik septisemi, hava kesesi hastalığı, şişmiş kafa sendromu, peritonit, koligranüloma veya enterit gibi intestinal veya ekstraintestinal infeksiyonlara neden olur. Kolibasillozis en çok ticari tavuk, hindi ve ördek sürülerinde bildirilmesine rağmen, çoğu kuş türü bu patojene duyarlıdır (54,55).

APEC suşlarının antibiyotiğe dirençli formlarının, diğer patojenik *E. coli* suşlarında antibiyotik direnç genlerini aktive ettiği ve bu tür direnç genlerinin hayvanlar ve insanlar arasında kolayca bulaşıp yayılabileceği belirlenmiştir (56). Kanatlı ve insan ExPEC izolatlarında virulens genlerin ve bulundukları filogenetik grupların benzer olması, APEC'in insanlarda ExPEC kaynaklı hastalıklar için bir rezervuar olabileceği ve zoonotik bir risk olarak düşünülmesi gerektiği bildirilmektedir (5).

3.2.3. Yenidoğan meninjiti *E. coli* (NMEC)

Yenidoğan meninjiti *E. coli* (NMEC) insidansı % 0,004 olup, erken doğmuş bebekler arasında menenjit nedenleri arasındadır (47,57). Ciddi nörolojik lezyonlara neden olan menenjitle ilişkili *E. coli* (NMEC), enfekte olan yenidoğanların % 20-40'ının ölümüne neden olmaktadır. Enfeksiyon, doğum sırasında anneden veya bebeğin üst solunum veya bağırsak yolu olan göbek deliğindeki *E. coli* infeksiyonları yoluyla alınabilmektedir (50). Menenjite neden olan NMEC suşlarının yaklaşık % 80'i bir K1 kapsül antijeni taşır. NMEC suşları arasında en sık görülen serotip O18:K1 olup suşların çoğu filogenetik grup B2 içinde yer alır (58).

3.2.4. Meme patojenik *E. coli* (MPEC)

Klinik sığır mastitisine neden olan ExPEC izolatları, meme patojenik *E. coli* (MPEC) olarak adlandırılır ve dünya çapında ineklerde klinik mastite neden olan önemli çevresel kökenli meme içi infeksiyonların ana etiyolojik nedenleri arasında bulunur (59,60). Sığır klinik mastitisine neden olan meme patojenik *E. coli*'nin

(MPEC) virülans mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalar tam anlamıyla ortaya konulmamışsada, bazı yeni araştırmalar, patojenite ile ana rol oyuncuları olarak demir alım sistemleri ilişkilendirilmiştir. MPEC suşlarının çoğu, A veya B1 filogrupları içerisinde yer almaktadır (61).

3.2.5. Endometrial patojenik *E. coli* (EnPEC)

Endometriyal patojenik *E. coli* (EnPEC) köpeklerde/kedilerde pyometra, sığır ve atlarda metritise neden olurken, insanlarda endometriyal infeksiyonlara neden olur. Özellikle köpek pyometrasında en sık görülen patojendir ve vakaların % 57-100'ünü oluşturur. Hayvanlarda ve insanlarda endometriyal infeksiyonlarda rol oynayan endometrial patojenik *E. coli* (EnPEC), virülans profili ve patogenezi tam olarak bilinmemektedir (62,63).

3.3. ExPEC Rezervuarları

İnsanlarda bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olan ExPEC suşları için, dünyanın dört bir yanından ExPEC'in moleküler epidemiyolojik çalışmaları, insan bağırsak yolu, hayvanlar, hayvansal gıdalar, perakende et ürünleri, kanalizasyon ve diğer çevresel kaynaklar önemli potansiyel rezervuarlar olarak tanımlanmıştır (Şekil 2) **(**5,7,49, 64,65). Bununla birlikte, ExPEC'in ana rezervuarı insan bağırsakları olup, bağırsakta herhangi bir hastalığa neden olmadan, orada kolonileşirler ve enfeksiyona neden olma fırsatı bulana kadar kolonileşme devam etmektedir (66). ExPEC'in moleküler epidemiyolojisi üzerine yapılan araştırmalar, insan ExPEC'i için diğer çevresel kaynaklarla birlikte atık sularından ST69, ST131, evcil hayvanlardan ST69 ve vahşi hayvanlardan ST533 ve ST69 gibi insanlarda enfeksiyona neden olan çeşitli ExPEC türleri tespit edilmiştir (64,67).

Hayvansal gıdalar ile ilişkili ST131, ST69, ST394 ve ST95 gibi ExPEC türleri, insan ve hayvanlarda bağırsak dışı enfeksiyonlarda rol oynayan virülans faktörlerine sahiptirler. ExPEC'in hayvanlardan insanlara bulaşmasının, kontamine gıda, perakende et ve evcil hayvanlarla doğrudan temas gibi çeşitli yollarla gerçekleştiği kabul edilmektedir. Bazı gıda sağlayan hayvanlar ve insan ExPEC'i arasında benzerlik olup, bu suşlar insanlarda İYE'ye neden olabilmekte ve bu enfeksiyonlar son zamanlarda gıda kaynaklı İYE olarak tanımlanmaktadır (51,68). Bu nedenle halk

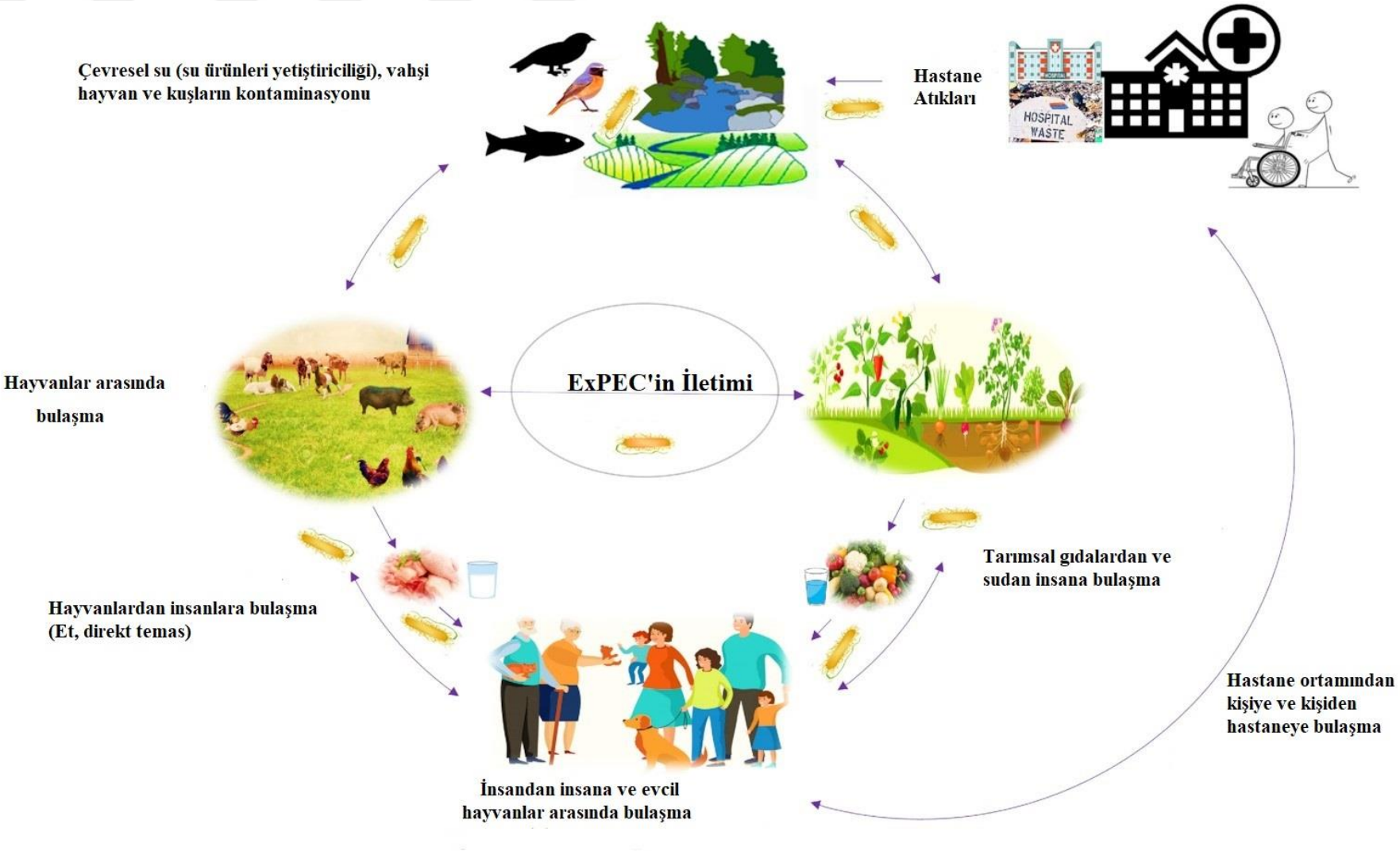
sağlığı ile gıda güvenliği için, gıdalar, gıda sağlayan hayvanlar ve çevresel rezervuarların incelenmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Her ne kadar potansiyel bulaş kaynağı ile bağlantılı gerçek risk seviyesi belirsizliğini koruyorsa da tanımlanmış birçok ExPEC kaynağı arasında, hayvan bakıcıları ve hayvansal kaynaklı gıdalar ile hayvanlara ait atıklar, insanlar için önemli enfeksiyon kaynağı olarak kabul edilmektedir (69).

3.3.1. İnsan rezervuarları

Genç kadınlarda akut ve tekrarlayan idrar yolu infeksiyonları (İYE) için, bağırsak sistemi ExPEC rezervuarı olarak kabul edilmiştir (70). Ayrıca bağırsak sistemimiz antimikrobiyal dirençli ExPEC barındırdığı ve ExPEC'in doğrudan kişiden kişiye bulaştığı da gösterilmiştir. Madigan ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada ESBL üreten bir ST131 suşunun İYE ve asemptomatik taşıyıcılıkla sonuçlanan birden fazla kişi arasında yayılımını ortaya koymuşlardır (71,72). İnsandan insana ve diğer bulaşma yollarının kombinasyonunun, ExPEC'in küresel yaygınlığında etkili olduğu düşünülmektedir. Ülkeler arası ticaret ve seyahatlerin antimikrobiyal dirençli ExPEC'in bulaşması ve uzak noktalara taşınması etkili olduğunu bildirmektedir (73).

3.3.2. Evcil hayvan rezervuarları

Evcil hayvanlar, farklı *E. coli* patotiplerini barındırmakta ve bu kapsamda evcil hayvanlar ile insanlar arasında bu patotiplerin geçişi olabilmektedir (49). Köpekler, kediler ve atlar dahil evcil hayvanlar da benzer bağırsak dışı enfeksiyonlar görülmekte olup ve insan ExPEC kaynağı olarak tanımlanmıştır. Bir çalışmada köpeklerden alınan dışkı sürüntüleri ile klinik olarak ilgili insan ExPEC türleri arasında yer alan ST127, ST69, ST95, ST10, ST38, ST648, ST405 ve ST131'in taşıyıcılığı bakımından bir ilişkinin olduğunu ortaya koymuştur (72). Benzer şekilde yapılan bir araştırmada ise, köpek gibi evcil hayvanlarla temasın, antibiyotik dirençli ExPEC'in neden olduğu İYE'lerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (73).



Şekil 2. ExPEC'in gıda, hayvanlar ve insanlar arasındaki döngüsü (65)

3.3.3. Çevresel rezervuarları

Çevresel rezervuarların birden çok kaynaktan gelen ExPEC'i içerebilmesinden dolayı bu durum ExPEC'in çevresel örneklerde yayılımının takibini zorlaştırmaktadır (72). Kanalizasyon suyu gibi atık sularda tespit edilen *E. coli* izolatlarının önemli bir kısmının, ExPEC ile ilişkili B2 ve D filogruplarında yer aldığı ve ExPEC ile ilişkili virülans faktörlerini ve antimikrobiyal direnç genlerini bulundurabileceği ile ilgili bilgiler literatürde bildirilmiştir. Benzer şekilde ExPEC türleri nehir ve kıyı suları gibi doğal su kaynaklarında bulunabilmektedir (72,74).

Deniz canlıları arasında yapılan araştırmalara kabuklu deniz hayvanlarının, ExPEC'i biriktirme ve daha sonra tüketildiğinde bu patojeni bulaştırma yetenekleri sayesinde gıda kaynaklı salgınlara neden olabileceği değerlendirilmiştir (74). Kabuklu deniz hayvanlarına ek olarak yabani kuşların da klinik olarak ilgili ST10, ST69, ST131, ST405'i ve ST648 ExPEC türlerini tespit edilmiştir (75).

3.3.4. Gıda rezervuarları

ExPEC'in hayvanlardan insanlara gıda yoluyla olası bulaşmasını değerlendiren birçok çalışma, hayvan ve insan izolatları arasındaki benzerlikler virülans faktörler ile antimikrobiyal direnç profillerine göre yapılmaktadır (51). Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan ExPEC'in et ve et ürünleri, kanatlı eti, domuz eti, çiğ süt ve süt ürünleri, yumurta, sebzeler ve deniz ürünleri ile kabuklu deniz ürünlerinin tüketimiyle ilişkilendirilmektedir (3,76-79). Bu gıdalar patojenleri taşıması nedeniyle, yüksek riskli olarak kabul edilmekte ve ExPEC'in bu yüksek riskli gıdalarla bulaşabileceği ve bağırsakta kolonize olabileceği önceki yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (72). Epidemiyolojik ve genomik çalışmalarda, ExPEC'in kümes hayvanı tüketimiyle bağlantılı olabileceğini ve kanatlı etinin antimikrobiyal direnç fenotiplerine sahip ST10, ST38, ST69 ve ST131 gibi önemli ExPEC türleri saptanmıştır (2,80). Ayrıca kuşlarda bağırsak dışı infeksiyonlara neden olan APEC ile insan ExPEC'inin genomik benzerlik gösterdiği bilinmekle ve bilinen birkaç ExPEC virülans faktörüne sahip olduğu tespit edilmiştir. Domuz eti ve sığır eti de dahil olmak üzere diğer perakende etler de önemli rezervuarlardır (6,49,72).

3.4. ExPEC Virülans Faktörler

ExPEC ile ilişkili virülans faktörleri ve bunları kodlayan genler adezyon, invazyon, demir edinimi, toksinler ve koruyucular gibi farklı fonksiyonel kategorilere ayrılabilmektedir. ExPEC'in patojenitesi ile ilgili virülans faktörleri (VF) arasında, bakteri kolonizasyonu ile ilgili olanlardan adezinler, toksinler, demir alma faktörleri, lipopolisakkaritler, polisakkarit kapsüller ve invazinler bulunmaktadır. Virülans faktörler genellikle patojenite adalarında (PAI'ler), plazmitlerde ve diğer mobil genetik elementlerde kodlanırlar. Birçok virülans faktörü, *E. coli* K-12 gibi kommensal *E. coli*'de normalde bulunmayan virülans genlerinin blokları olan patojenite ile ilişkili adalarda (PAI'lerde) kodlanmaktadır (47,81).

ExPEC virülans faktörleri adezinler, invasinler, demir alım faktörleri, koruyucular ve toksinler olmak üzere beş kategoride sınıflandırılır (Tablo 1) (81).

3.4.1. Adezinler

Pek çok yüzey yapısı spesifik adezyon sürecinde önemli bir rol oynar. Fimbria, afimbrial adezinler (Afa) ve dış zar proteinleri (OMP'ler) olmak üzere üç ana tip adezin vardır. Gram-negatif bakterilerdeki bu adeziv ve virülansla ilişkili yüzey yapıları ailesi, yeni oluşan pilus alt birimlerinin bakteriyel periplazmadaki özel bir protein tarafından bağlanmasını ve ardından alt birimlerin hücre içine polimerizasyonunu içeren başlatıcı proteinler tarafından birleştirilir ve dış zardaki pilus lifi, öncü olarak adlandırılan entegre bir dış zar kanal proteini tarafından salgılanır (82,83).

Yüzey adezinlerinin ekspresyonu, bakterilerin konakçı hücre duvarı ile yakın temasını kolaylaştırarak patojenik *E. coli*'nin virülansını artırır. S-fimbrial adezinler (sfa), F1C (pseudotypeI) fimbriae (fok), kodlayan P-like pili, papC ve Iha, İYE hastalarından elde edilen izolatlar arasında en sık saptanan adezinlerdir. UPEC suşları için, P ve S fimbria reseptörleri, konakçı idrar yolunu kaplayan epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunur (84,85).

3.4.1.1. Biofilm

Biyofilmler, biyotik veya abiyotik yüzeylere yapışan dinamik mikroorganizma toplulukları olup, mikroorganizmalar arasındaki oldukça özelleşmiş etkileşimlerle

karakterize edilirler. ExPEC suşlarında, dış zar akış proteini (OEP) ailesine ait olan tolC geni dış zarın yapısı ve işlevi, biyofilm oluşumu için esastır (86).

3.4.2. İnvasinler

E. coli'nin konakçı hücrelerin zar reseptörlerine yapışması, İnsan Beyni Mikrovasküler Endotel Hücrelerinin (HBMEC) bakteriyel istilası için gerekli konakçı hücre aktin hücre iskeleti yeniden düzenlemeleriyle sonuçlanan bir konakçı hücre sinyal transdüksiyon yolları dizisini tetikler. Konak aktin hücre iskeletinin *E. coli* K1 tarafından yeniden düzenlenmesi, konakçı aktin bağlayıcı proteinler ve sinyal moleküllerinin yanı sıra spesifik mikrobiyal belirleyicileri içeren karmaşık bir çok faktörlü süreçtir. Bununla birlikte, HBMEC'nin bakteriyel istilasında altta yatan konak-mikrobik etkileşimler tam olarak anlaşılmamıştır (86,87). FAD bağımlı oksidoredüktazların Pfam12831 ailesine ait olan IbeA ve OmpA gibi diğer invazinler, Rac1 aktivasyonu yoluyla HBMEC istilasına katkıda bulunabilir (88).

ibeA'nın NMEC ve APEC dahil olmak üzere birçok ExPEC patotipinin patogenezinde yer aldığı ve ExPEC'in konak hücrelere invazyonuna katkıda bulunduğu söylenebilir. Ayrıca, IbeA reseptörü PSF, hem insan hem de sığır BMEC'si için tanımlanmıştır (89,90).

3.4.3. Demir alım faktörleri

Sideroforlar, bakteriyel büyüme ve gelişmeyi artırmak için demiri yakalayan ikincil metabolitlerdir. Demir eksikliği, hücresel kapsül yapısında ve sentezinde bozukluklar oluşturarak bakteriyel adaptif yetenekleri zayıflatır. ExPEC'de kan serumundaki demire erişim çok önemlidir. *E. coli*, çok düşük demir mevcudiyeti ile çeşitli organlarda sepsis ve infeksiyonlara neden olabileceğinden, bu patotip enfekte bölgelerden demir elde etmek için birçok strateji geliştirmiştir. ExPEC'ler, virülanslarını artıran enterobaktin ve salmochelin (katekolat yanroforlar), aerobaktin (karma tip bir yanrofor) ve yersiniabaktin (fenolat yanrofor) gibi sideroforlarla donatılmıştır (91,92).

Tablo 1. ExPEC patotipilerinde virülans genler ve fonksiyonları (81)

Virülans Faktörleri	Virülans Genleri	Fonksiyon	ExPEC Patotipi
		Adezinler	
Type 1 fimbriae	*fim*	Bağırsak dışı infeksiyonlarda kolonizasyon faktörü, biyofilm oluşumu	UPEC, NMEC, SEPEC, APEC
Afimbrial adhesin	*afa*	Fibröz olmayan adezin, hücre yüzeyi epitelindeki DAF reseptörünün yanı sıra tip IV kollajene ve CEACAM ailesinin üyelerine, hemaglütinasyon kapasitesine bağlanır.	UPEC
Dr fimbriae	*dra*	Yüzey epitel hücrelerindeki DAF reseptörünün yanı sıra tip IV kollajen ve CEACAM ailesinin üyelerine bağlanma, bakterilerin konakçı hücrelere içselleştirilmesine aracılık etme.	UPEC
P fimbriae	*pap*	Ekstraintestinal infeksiyonlarda kolonizasyon faktörü olan T lenfositler tarafından sitokin üretimini uyarır.	UPEC, SEPEC, APEC
S fimbriae	*sfa*	Bağırsak epitel hücrelerine, böbreklere, alt idrar yollarına yapışan hücreler; bakterilerin dokulara penetrasyonunu kolaylaştırır.	UPEC, NMEC
F1C fimbriae	*foc*	Renal epitel hücrelerine ve mesanenin endotel hücrelerine adezyon ve böbrekler.	UPEC
Iha	*iha*	Demirle düzenlenmiş gen-homolog adezyonu	UPEC
Mat	*mat*	Menenjit ile ilişkili ve sıcaklık ayarlı fimbrialar.	NMEC
Curli fiber gene	*crl, csg*	Biyofilm oluşumunu etkinleştirme ve patojeniteyi teşvik etme.	UPEC, SEPEC, APEC
Antigen43	*agn43(flu)*	Ototransporter ailesinin proteini, adezyon ve biyofilm geliştirme.	UPEC
		İnvazinler	
Ibe ABC	*ibeA,B,C*	Konak dokulara hücre istilası.	NMEC, SEPEC, APEC
		Demir Alım Faktörleri	
Aerobactin	*iuc, aer*	Siderophore, konak sistemde Fe2+ / 3+ kazanımı.	UPEC, APEC
Iron repressible protein	*irp*	Yersiniabaktin sentezi	NMEC
Salmochelin	*iroN*	Siderofor reseptörü, konakçı vücuttan elde edilen Fe iyonlarının kullanılmasıdır.	UPEC, NMEC, SEPEC, APEC
ChuA, Hma	*chu, hma*	Konak sisteminde hemoglobinden Fe kullanımını etkinleştirin.	UPEC, SEPEC
SitABC	*sitA,B,C*	Fe, Mn'nin Taşınması	UPEC, APEC

Üropatojenik *E. coli* (UPEC), septisemik *E. coli* (SEPEC), yenidoğan meninjiti *E. coli* (NMEC), kanatlı patojenik *E. coli* (APEC), meme patojenik *E. coli* (MPEC), endometrial patojenik *E. coli* (EnPEC).

Tablo 1. ExPEC patotiplerinde virülans genler ve fonksiyonları (81) (Devamı)

Virülans Faktörleri	Virülans Genleri	Fonksiyon	ExPEC Patotipi
		Koruyucular/Serum direnci	
Transfer protein	*traT*	Tamamlayıcı aktivitenin klasik yolunun inhibisyonu.	NMEC, SEPEC APEC
Capsular antigens	*KpsMI-neuA, KpsMII*	Fagositoza karşı koruma faktörü ve yayılma faktörü.	NMEC, SEPEC
Outer membrane protein	*ompA*	Hücre içi hayatta kalmayı, vücudun savunmasından kaçınmayı etkinleştirir.	UPEC, NMEC
Increased serum survival	*iss*	Fagositoza karşı koruma faktörü.	NMEC, SEPEC, APEC
ColV, CvaC	*colV, cvaC*	Kolonizasyonu kolaylaştıran faktör.	NMEC, SEPEC, APEC
		Toksinler	
Serin protease autotransporter	*pic*	Müsinleri bozar, kolonizasyon epitelini kolaylaştırır,hücre zarı.	UPEC
Secreted autotransporter toxin	*sat*	Proteolitik toksin, etki sitotoksik hücre vakuolizasyonu üzerinde etkiler.	UPEC
Vacuolating autotransporter toxin	*vat*	Proteolitik toksin, konakçı hücre vakuolizasyonunu indükler.	UPEC, APEC
Hemolysin A	*hlyA*	Konak hücrelerin zarlarında porların oluşturulması (hücre lizisi).	UPEC
Cytotoxic necrotizing factor	*cnf*	Hücre nekrozu neden olmak.	UPEC, SEPEC
Cytolethal distending toxin	*cdt*	Sitoletal distansiyon faktörü.	SEPEC

Üropatojenik *E. coli* (UPEC), septisemik *E. coli* (SEPEC), yenidoğan meninjiti *E. coli* (NMEC), kanatlı patojenik *E. coli* (APEC), meme patojenik *E. coli* (MPEC), endometrial patojenik *E. coli* (EnPEC).

3.4.3.1. Enterobaktin

Enterobaktin, neredeyse tüm *E. coli* suşları tarafından üretilir. Enterobaktin hem patojenik hem de patojenik olmayan *E. coli*'de bulunmakta ve ExPEC virülansında rol almaktadır. Enterobaktin biyosentezi ve taşınmasından sorumlu genler, tek bir bitişik gen kümesi olan entEBG(AC)'de gruplandırılmıştır (93). Enterobaktin glikozilasyonu, belirli patojenik suşların konakçının bağışıklık savunmasından kaçıp demir elde edebildiği önemli bir virülans mekanizmasıdır (94).

3.4.3.2. Salmochelin

Salmochelin ExPEC suşlarında bulunur ve karakteristik bir virülans faktörü olarak kabul edilir. ColV veya ColBM virülans plazmitlerinde bulunan veya patojenite ile ilişkili adalarda (PAI) tanımlanan iroBCDEN gen kümesi tarafından kodlanır (95). İroB'nin salmochelin üretimi için gerekli glikosiltransferaz aktivitesine sahip tek gen olduğu ve bunun da enterobaktinin glikosilasyonuna yol açarak, güçlü hidrofobikten hidrofilik özelliklere kadar onun yapısını değiştirdiği bildirilmiştir (96).

3.4.3.3. Aerobaktin

Aerobaktin, ExPEC'lerde yaygın olarak barındırılan başka bir siderofordur. Salmochelin'e benzer şekilde, siderofor da ColV ve ColBM plazmitleri tarafından kodlanır ve biyosentezi, iucABCD (demir alım şelat) genleri tarafından kodlanan enzimler tarafından yürütülür. L-lisinden, IucD monooksigenaz N6-hidroksi-L-lizini oluşturur (95). Daha sonra IucB asetiltransferaz, N6-hidroksi-L-lizin ve asetilCoA'dan N6-asetil-N6-hidroksi-Lizin sentezler. Sırasıyla IucA ve IucC, aerobaktin üretmek için N6-asetil-N6-hidroksi-Lizin'in asilasyonuna ve yoğunlaştırılmasına katılır (97).

Kommensal suşlarla karşılaştırıldığında, aerobaktin biyosentetik genleri, gıda üreten hayvanlardan izole edilen patojenik *E. coli* suşlarında daha sık saptanır. Enterobaktin ile karşılaştırıldığında, çok düşük aerobaktin konsantrasyonları bakteri üremesini uyarmak için yeterlidir (98).

3.4.3.4. Yersiniabaktin

ExPEC'ler yersiniabactin'i esas olarak idrar yollarının kolonizasyonu sırasında üretebilirler. Yersiniabaktin, özellikle üriner sistemin kolonizasyonu sırasında

üropatojenik *E. coli*'nin (UPEC) patojenitesine katkıda bulunur ve bakteri hücrelerini konağın immün yanıtına karşı koruyabilir (99).Yersiniabaktin, in vivo demir alımında önemli bir rol oynadığından ve mesane düzeyinde insan idrarında biyofilm oluşumunu desteklediğinden İYE oluşumunda yer alır. Bu nedenle yersiniabaktin, konak yanıtını ve doğuştan gelen bağışıklık sistemini aktive ederek virülansta önemli bir rol oynayabilmektedir (98).

3.4.4. Koruyucular/Serum direnci

Koruyucular bakterilerin karakteristik serum direncinden sorumlu ExPEC virülans faktörlerinin bir kategorisidir. Bilinen tüm koruyucular arasında TraT, OmpA ve kapsüler antijen K yer almaktadır (81).

3.4.4.1. TraT

TraT, *E. coli*'nin konjugatif plazmidi (F plazmiti) olan R faktörünün transferinde yer alan genetik bir birim olan traT operondaki genlerden biridir. traT gen ürünü, birkaç peptidoglikanla ilişkili lipoproteine benzer şekilde davranan peptidoglikanla kovalent olmayan bir şekilde ilişkili 23 kDa'lık bir dış zar proteinidir. traT, bakterilere komplementin litik etkisinden koruma sağlar ve diğer ana dış zar proteinleri, özellikle porinler ile birçok ortak özelliğe sahiptir (100).TraT'nin serum direncindeki rolü, tamamlayıcının zar atak kompleksinin doğru birleşmesini veya zara yerleştirilmesini engellemektir. TraT proteininin ayrıca *E. coli* hücrelerinin makrofajlar tarafından fagositoza duyarlılığını azalttığı da rapor edilmiştir (81).

3.4.4.2. OmpA

Dış zar proteinleri (OMP'ler) ve lipoproteinler, zar yapısı, sinyal iletimi, aktif ve pasif iyon ve çözünen madde taşıma, savunma ve kataliz gibi birçok işleve sahiptir (101). OmpA'nın hem yapısal hem de iyon geçirgen porin rolleri vardır ve iyonik gözenekleri, ozmotik stres sırasında bakterilerin hayatta kalmasına izin veren tuzdan etkilenen bir elektrostatik geçitleme mekanizması tarafından kontrol edilir (102).

OmpA, *E. coli*'nin menenjitik suşlarında bir virülans faktörüdür ve merkezi sinir sistemi, kılcal damar endoteli ve astrositlere yapışma ve bunları istila etme işlevine sahiptir. OmpA ve homologları ayrıca mukozal yüzeylerdeki epitel hücrelerine yapışmada rol oynar. Ayrıca OmpA, *E. coli*'nin patojenik suşlarında lökositlere ve

makrofajlara yapışmaya aracılık eder (103). OmpA-pozitif *E. coli* K1, sitokrom C salınımını bloke eden ve makrofaj apoptozunu önleyen antiapoptotik faktör Bclxl'i indükler, böylece hem makrofaj hem de hücre içi bakterilerin hayatta kalmasını sağlar (104,105).

3.4.4.3. Kapsüler antijenler

Bakteriyel kapsül, hücreyi çevreleyen geniş bir tabaka olarak görebildiği hücre dışı bir yapıdır. Kapsül, konakçı bağışıklık sistemini önlemek için gereklidir ve kapsülsüz suşlar genellikle patojenik değildir. Bir kapsülün varlığının, Gram-negatif bakteriler tarafından fagositozdan kaçmak için kullanılan anahtar bir mekanizma olduğu gösterilmiştir (106). Çoğu ExPEC suşunun kapsülleri, grup II polisakkaritleri tanımlayan ince, asidik, ısıya dayanıklı ve yüksek derecede anyonik özelliklerdir. Tanımlanmış 80'den fazla farklı kapsüler (K) antijen arasında K1 ve K2, ExPEC serum direncinin ana belirleyicileri olarak kabul edilir. K+ suşlarının serum direnci derecesinin mevcut kapsüler materyal miktarı ile orantılı olduğu ve K tipine göre değiştiği bildirilmiştir. Kapsüler antijeni eksprese eden *E. coli* suşları neonatal sepsis gelişimi ile ilişkilidir (107,108).

3.4.5. Toksinler

ExPEC'lerde toksinleri kodlayan en sık tespit edilen genler hlyA, hlyD, hlyF(α hemolizin), cnf1 (sitotoksik nekrotize edici faktör 1), sat (salgılanan ototransporter toksin), pic (kolonizasyonda yer alan proteaz) ve vat (vakumlanan ototransporter) proteinidir (109,110).

3.4.5.1. α-Hemolysin

Hemolizin, hlyCABD operonu tarafından ifade edilen bir toksindir. Bu proteinler, TolC bağlantısız gen ürünü ile birlikte bir tip I salgılama kompleksi oluşturur. *E. coli* hemolizinin salgı yolu, genellikle Gram-negatif bakteriler arasında prototipik tip I salgı proteini olarak kabul edilir. *E. coli* hemolizinin birçok farklı konakçı hücre tipine bağlı olarak, hem hayvanlar hem de insanlar olmak üzere birçok konakçıya karşı sitotoksik olduğu görülmektedir (111,112).

3.4.5.2. Sitotoksik nekrotizan faktör 1 (CNF1)

CNF1, başlangıçta CNF üreten *E. coli* suşları tavşanlara intradermal olarak enjekte edildiğinde dermonekroza neden olan bir toksin olarak tanımlanmıştır. Tarihsel olarak, ilk açıklanan sitotoksik aktivitesi, kültürde çok çekirdekli hücrelerin oluşumu olmuştur. CNF1 polipeptitinin enzimatik C-terminal yarısı, geç endozomlardan ayrılıp salındıktan sonra konakçı sitozolde bulunur (113).

Epidemiyolojik olarak, CNF1 üretimi daha çok daha şiddetli İYE'lerden sorumlu UPEC suşları ile ilişkili olduğu ve yapılan bir çalışmada piyelonefrit izolatlarının % 48'inin CNF1 pozitif olduğunu göstermiştir. Hemolizin durumunda olduğu gibi, nötrofil fonksiyon bozukluğunu indüklediğine ve epitel hücre invazyonunu artırdığına dair kanıtlara rağmen, CNF1'in üropatogenezdeki rolü tam olarak bilinmemektedir (114).

3.4.5.3. Tip V salgı ailesi

En çok dikkat çeken UPEC-toksin SPATE-ailesi üyesi, salgılanan oto-taşıyıcı toksindir (Sat). Sat geni, hemolizin ve pap pili determinantları ile birlikte, UPEC suşu olan CFT073'ün büyük pheV ile ilişkili patojenite adasında bulunur. Sat geni, SPATE proteinlerinin üç karakteristik alanına sahip olan 142 kDa'lık bir proteini kodlar. Hücreler üzerinde güçlü sitopatik etkiler, böbrekteki histopatolojik lezyonlar bu proteine atfedilmekte ve İYE ürotelyal hücrelerin dökülmesine neden olmaktadır (114).

Diğer iki SPATE ailesi üyesi, Pic ve Vat, UPEC'de yaygın olarak bulunur ve sırasıyla Shigella flexneri ve APEC'de tanımlanmıştır. Vat, sistit ve piyelonefrite neden olan *E. coli* izolatlarının yarısından fazlasında ortaya çıkan, vaküle edici bir AT toksinidir. Bununla birlikte, APEC'de önemli bir virülans faktörü olduğu gösterilmiştir (115).

3.5. *E. coli* suşlarının filogenetik grupları

E. coli türü içinde kapsamlı bir genetik altyapı mevcut olup, filogenetik gruplama, multilokus enzim elektroforezi veya ribotipleme ile yapılabilmektedir. Bu referans tekniklerin her ikisi de karmaşık ve zaman alıcı olmakla birlikte, yazılan suşların bir koleksiyonunu da gerektirir. *E. coli* suşları temel olarak dört filogenetik gruba (A, B1,

B2 ve D) ayrılır. Clermont ve arkadaşları tarafından 2000 yılında *chuA, yjaA* genlerini ve TspE4.C2 klonunu saptamak için, bir *E. coli* izolatının A, B1, B2 veya D filo gruplarından birine atanmasını sağlayan basit bir tripleks PCR yöntemi geliştirildi. Bu çalışmalar aynı zamanda patojenik suşların virülans genlerini nasıl edindiklerini daha iyi anlamamızı sağlamıştır (116,52).

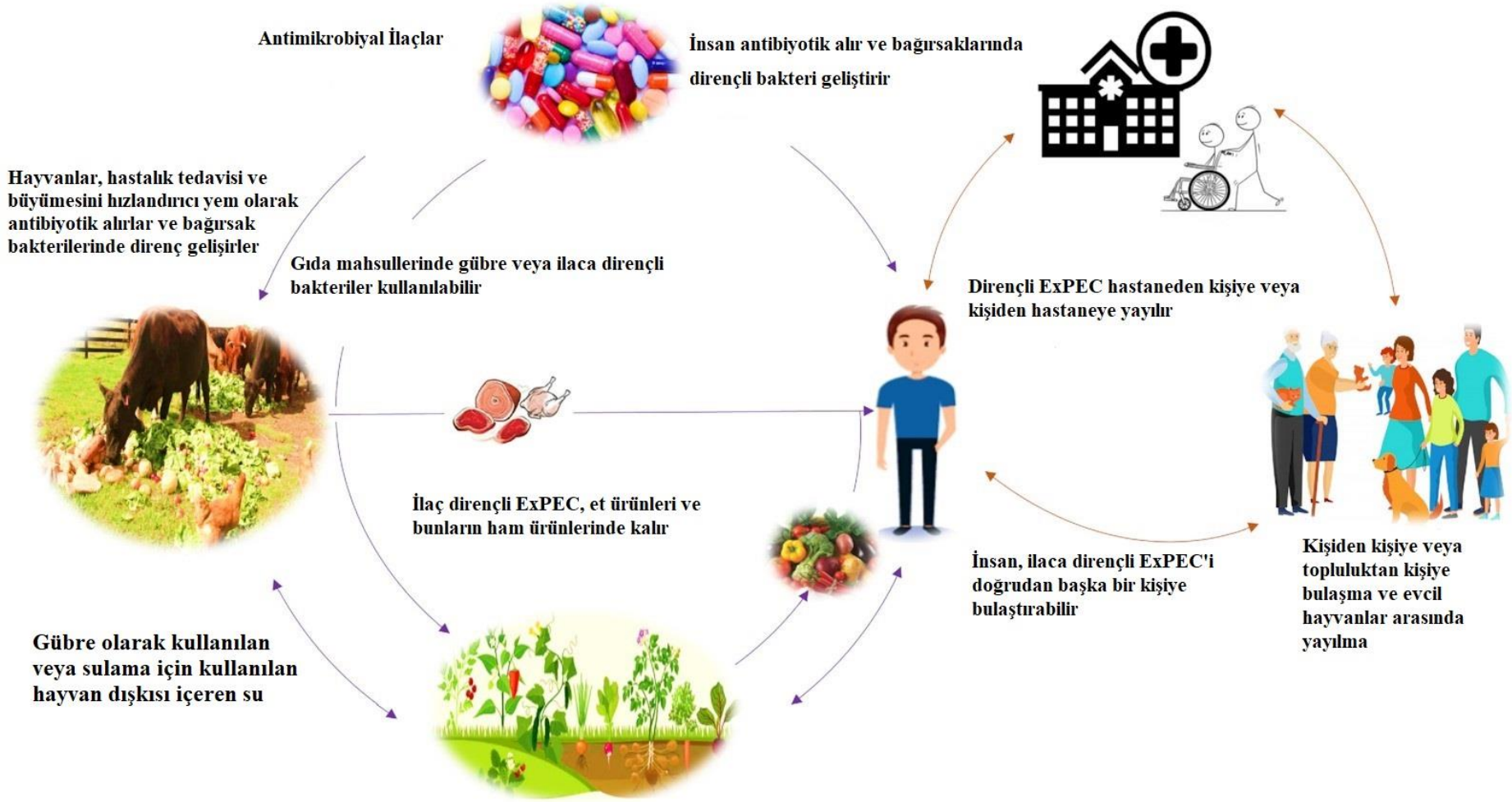
Clermont ve ark. (2013) bu üç aday işaretleyiciye ek bir gen hedefi olan *arpA*'yı eklediler ve bir *E. coli* izolatını A, B1, B2, C, D, E, F ve Klade I filogruplarından birine sınıflandırmak için dörtlü bir PCR yaptılar. Dünya çapında filogenetik analizler, virülan ekstraintestinal *E. coli* suşlarının esas olarak B2 grubuna ve daha az ölçüde D grubuna ait olduğunu göstermiştir. Buna karşın, kommensal suşların çoğu grup A veya grup B1 ile ilişkilidir (117).

3.6. ExPEC türlerinde antimikrobiyal direnç

Küresel antimikrobiyal direnç (AMR) insan ile hayvan sağlığını, gıda güvenliğini ve genel olarak çevreyi etkileyen, en hızlı büyüyen küresel tehditlerden biridir (118). Son yıllarda giderek artan sayıda bulgu, insan ve hayvan sağlığı alanlarında antibiyotiklerin kontrolsüz ve uygun olmayan şekillerde kullanımının, hem insan hem de hayvan sağlığı için önemli patojen mikroorganizmalarda antimikrobiyal direnç hızının artmasına neden olduğunu göstermektedir (65). Bu da insanlarda daha fazla ölümlerle sonuçlanan morbiditesi yüksek uzun süreli enfeksiyonların görülmesi ile sonuçlanmaktadır **(**119**)**. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre, antibiyotik direnci son on yıllardır küresel bir sağlık sorunu olarak kabul edilmekte ve 21. yüzyılın en önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır (https://apps.who.int/iris/handle/10665/340814 Erişim tarihi: 30 Mayıs 2023). Halk sağlığı açısından, antimikrobiyallerin gıda sağlayan hayvanlarda büyümeyi hızlandırıcı olarak kullanımı, Avrupa ülkelerinde yasaklanmış olsa da bazı ülkelerde hala kullanılmaya devam etmektedir (120).

ABD'de yapılan bir araştırmaya göre, hayvanlarda ve tarımsal alanlarda küresel antibiyotik tüketimi artarken, antibiyotiklerin % 80'inin hayvancılıkta kullanıldığı ve bu oranın insanlara kıyasla oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (121). Dirençli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar ile ilişkili yıllık ölüm sayısının 700 000 olduğu, kontrol edilmemesi durumunda ölüm oranının 2050'ye kadar 10 milyona

çıkacağı ve küresel üretim kaybı açısından 100 trilyon ABD Doları tutarında bir maliyete yol açacağı tahmin edilmektedir (122,123**)**. Özellikle antibiyotik dirençli bakterileri yapısında bulundurabilen hayvanların ve hayvansal gıdaların insan üzerindeki olası rolünü daha iyi anlamak için bu alanda daha fazla sistematik çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Özellikle Tek Sağlık bakış açısıyla insan, hayvan ve çevre arasındaki ilişki kapsamında antibiyotik dirençli ExPEC'ler değerlendirildiğinde halk sağlığı açısından gittikçe önem kazandıkları dikkati çekmektedir. Son yıllarda hayvansal orijinli ExPEC izolatlarında antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalar ExPEC'lerin sefalosporinler, kinolonlar ve sülfametoksazol gibi önemli antibiyotik gruplarına karşı direnç gelişterebileceğini göstermektedir (4,80**,**124). Gıda sağlayan hayvanlarda antibiyotik dirençli ExPEC prevalansı ülkeden ülkeye önemli ölçüde farklılık gösterebilmektedir (65,125,126). Ülkemizde hayvansal orijinli gıdalar üzerine yapılan araştırmaların önemli bir kısmının *E. coli* O157 ve H7 serotipi gibi shigatoksijenik *E. coli*'ler üzerine yoğunlaştığı dikkatleri çekmektedir (127,128). Ancak bu durumun aksine ülkemizde insan klinik materyallerinde ExPEC varlığı ve antibiyotik direnç durumu ile ilişkili çok sayıda veri birçok çalışmada bildirilmiştir (129,130).



Şekil 3. Antibiyotik dirençli ExPEC'in insan, hayvan ve çevre yoluyla yayılması (65)

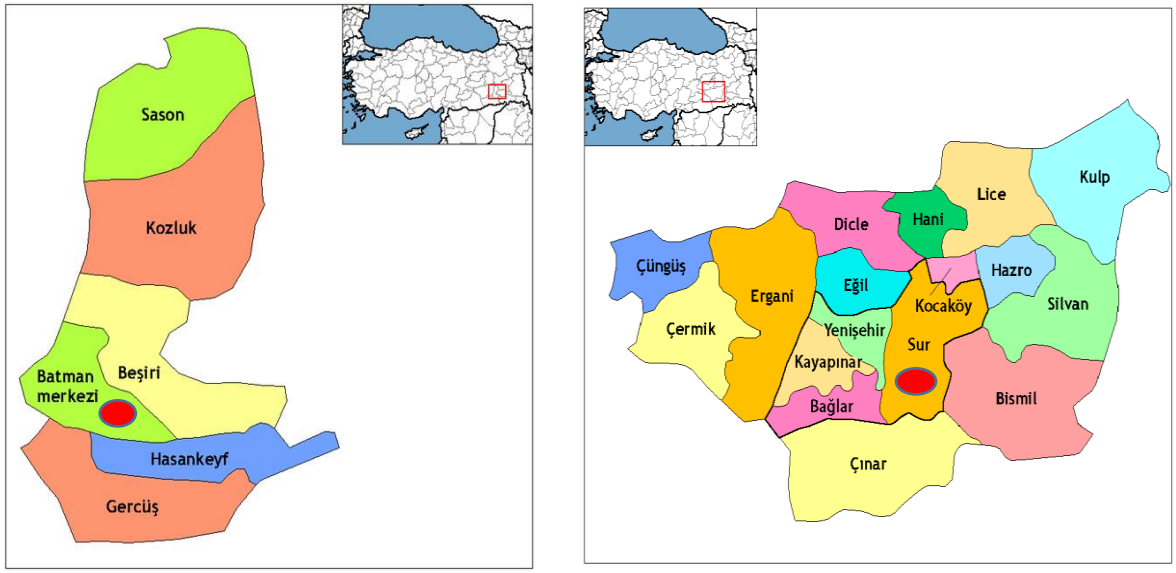
4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Gereç

4.1.1. Çalışma dizaynı ve örneklerin toplanması

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan örnekler Mart 2022-Eylül 2022 ayları arasında Güneydoğu Anadolu Bölgesinde bulunan Diyarbakır ve Batman illerinde (Şekil 4) faaliyet gösteren iki özel kesimhaneden toplandı. Her bir kesimhaneden örnekler üç farklı tarihte alınıp analiz edildi.

Her örnek alınımında hayvan sayısı resmi Veteriner Hekim tarafından kesime kabulü uygun bulunan 1,5 ile 2,5 yaş aralığında ve besi sığırı olduğu belirlenen hayvanlardan arasından seçildi. Karkas, deri ve rektal örneklerinin aynı besi sığırına ait olmasına dikkat edildi. Bu amaçla kesim öncesi hayvanlar numaralandırılarak işaretlendi. Diyarbakır (n:62) ve Batman (n:71) illerinde belirlenen iki özel kesimhaneden toplam 133 besi sığırına ait karkas, deri ve rektal svab örneği materyal olarak kullanıldı. Ayrıca her ziyaret sırasında bıçak, padok, su ve personel ellerinden örnekler alındı. Kesimhanelerden alınan örneklerin dağılımı Tablo 2'de verilmiştir.



Batman Diyarbakır

Şekil 4. Batman ve Diyarbakır İli Haritası

4.1.1.1. Karkas örneklerinin alınması: Örnekler kesim sonrasında soğutmadan hemen önce ISO 17604:2015, Beyi ve ark. (2017) ve Nouichi ve Hamdi (2009) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek her bir yarım karkasın but, kavram, döş ve boyun kısmı bölgesinden (Şekil 5) her birinden en az 400 cm^2'lik yüzeyden sünger svab (World Bioproducts, ABD) (Şekil 6) ile alındı (https://www.iso.org/standard/62769.html Erişim tarihi: 29 Mayıs 2023**,** 131,132).



Yarım karkas dış yüzey **Yarım karkas iç yüzey**

Şekil 5. Karkas örneklem bölgeleri; **A:** Boyun **B:** Döş **C:** Kavram **D-E:** But

4.1.1.2. Rektal örneklerinin alınması: Sığırlar kesildikten sonra, deri yüzme aşamasına geçilmeden önce rektumdan eküvyon çubuğu (Şekil 7) ile örnekler alındı (133).

4.1.1.3. Deri örneklerinin alınması: Hayvanlardan kesimden önce karın altı ile göğüs bölgesinden sünger svab (World Bioproducts, ABD) ile yaklaşık 1.000 cm² alandan örnekler alındı (134).

4.1.1.4. Bıçaklardan örnek alınması: Kesimde farklı aşamalarda kullanılan bıçaklardan sünger svab (World Bioproducts, ABD) ile bıçağın her iki yüzeyinden alındı (135).

4.1.1.5. Personel ellerinden örnek alınması: Kesimde deri yüzme ile iç organ çıkarma aşamaları arasında görev alan personelin her iki elin tüm yüzeyinden sünger svab (World Bioproducts, ABD) ile örnekler alındı (135).

4.1.1.6. Padoklardan örnek alınması: Hayvanların kesim öncesi dinlendirildiği alanda, tüm zeminin alanını temsil edecek şekilde sünger svab (World Bioproducts, ABD) ile alındı (134).

4.1.1.7. Su örneğinin alınması: Kesimhanede alet, ekipman ve yüzey temizliğinde kullanılan şebeke suyu (musluktan) 250 ml su örneği, Sağlık Bakanlığı İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmeliğinde belirtildiği şekilde alındı. (https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2005/02/20050217-3.htm Erişim tarihi: 13 Mart 2023).

Tablo 2. İllere göre toplanan örneklerin sayısı ve dağılımı

Örnek	Batman	Diyarbakır	Örnek Sayısı
Karkas	71	62	133
Deri	71	62	133
Rektal	71	62	133
Bıçak	9	9	18
Personel Eli	6	6	12
Padok	6	6	12
Su	3	3	6
Toplam	**237**	**210**	**447**

4.2. Yöntem

Örnekler yukarıda detayları verildiği şekilde alındıktan sonra soğuk zincir altında Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarlarına getirilerek *E. coli* ve ExPEC varlığı yönünden değerlendirilmek üzere aynı gün analizlerine başlandı.

4.2.1. Klasik kültür tekniği ile *E. coli* izolasyonu

Karkas, deri, rektum, padok, bıçak ve personel eli örneklerinde *E. coli* izolasyonu Elsharawy ve ark. (2022) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı (136). Yukarıda belirtildiği şekilde toplanan her bir örneğe 40 ml çift kuvvetli MacConkey Broth (Neogen, İngiltere) ilave edilerek 37 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bu sıvıdan bir öze dolusu alınarak MacConkey agar (Neogen, İngiltere) besiyerine çizme yöntemi ile transfer edildi ve aerobik koşullarda 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. MacConkey agarda üreyen laktoz pozitif *E. coli* şüpheli pembe kolonilerden (Şekil 8) 2-3 tane seçildi ve Eosin Methylene-Blue (EMB) (Merck, Almanya) agar besiyerine pasajlandıktan sonra 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. EMB agarda üreyen metalik yeşil reflaktorik rengi veren koloniler *E. coli* şüpheli olarak değerlendirildi (Şekil 9) ve biyokimyasal testlerden indol testi uygulandı. Bu test için EMB agarda metalik yeşil reflaktorik rengi veren koloniler Tryptic Soy agar (TSA) (Merck, Almanya) besiyerine pasajlandı ve 37 °C'de 18-24 saat bekletildi. TSA besiyerinde üreyen bir koloni alınarak içinde 5 ml Tryptophan broth (Liofilchem, İtalya) besiyeri bulunan tüplere aktarıldı ve 37 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kovaks ayıracından 2 ml'ye 5 damla olacak şekilde ilave edildi ve kırmızı renkli halkanın oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 10) (137).

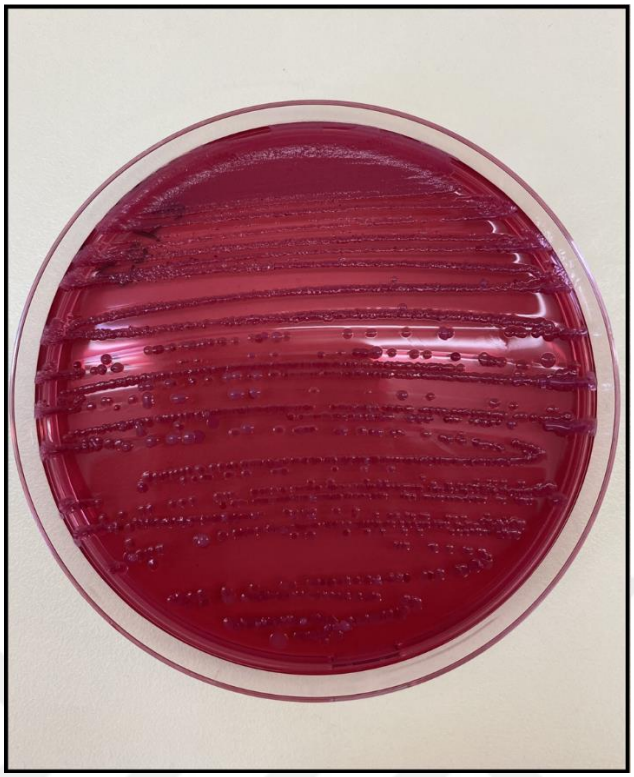
Her bir su örneğinden *E. coli* izolasyonu için 10 ml alındı ve 100 ml'lik steril bir şişeye aktarıldı ve sonra üzerine 40 ml çift kuvvetli MacConkey Broth ilave edilerek 37 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bu sıvıdan bir öze dolusu alınarak yukarıda detayları verilen analiz aşamaları takip edildi.



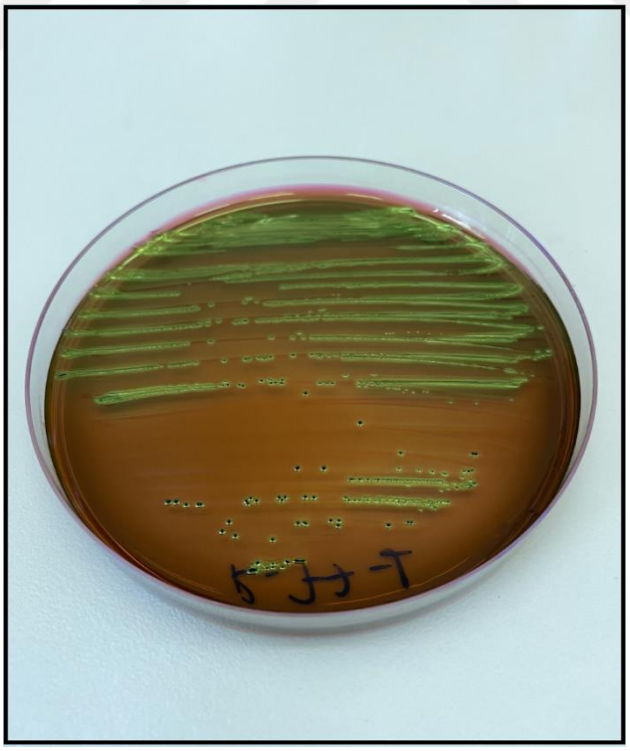
Şekil 6. Karkas, deri, padok, personel eli ve bıçak örnekleri için kullanılan sünger svab



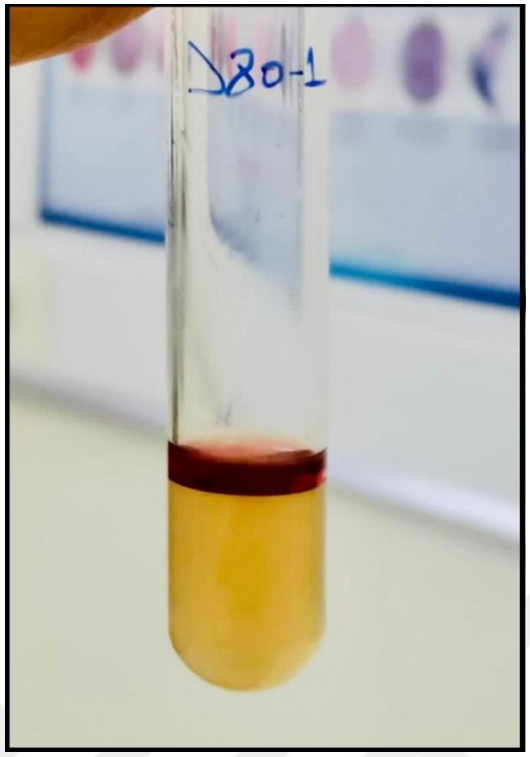
Şekil 7. Rektal örnekler için kullanılan eküvyon çubuğu



Şekil 8. MacConkey agar besiyerinde üreyen *E. coli* şüpheli kolonilerin görünümü



Şekil 9. EMB agar besiyerinde üreyen *E. coli* şüpheli kolonilerin görünümü



Şekil 10. İndol testi pozitif örnek

4.2.2. *E. coli* izolatlarının bakteriyel identifikasyon sisteminde tanımlanması

İndol testi pozitif olan *E. coli* şüpheli izolatlar BD Phoenix™ M50 (Becton, Dickinson and Company Sparks, ABD) bakteriyel identifikasyon sisteminde üretici firmanın direktiflerine göre tanımlanarak doğrulandı. *E. coli* olarak tanımlanan izolatlar moleküler analizlerde ve antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılıncaya kadar % 20 gliserol içeren Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Almanya) 'da -80 °C'de muhafaza edildi.

4.2.3. *E. coli* izolatlarının moleküler karakterizasyonu

4.2.3.1. Referans suşlar

E. coli izolatlarının moleküler karakterizasyonu için pozitif kontrol olarak *E. coli* ATCC 43894 ve 43895 suşu Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'ndan, *papA, papC, iutA, kpsMTII* ve *fimH* virülens genleri içeren suşlar ise İstanbul Üniversitesi-İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalın'dan temin edildi.

4.2.3.2. DNA ekstraksiyonu

İzolatlarda DNA ekstraksiyonu Queipo-Ortun ve ark. (2008), tarafından önerilen kaynatma metodu ile gerçekleştirildi (138). Kısaca her bir izolat TSA besiyerine transfer edilerek 37 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası TSA besiyerinde üreyen birkaç koloni seçilerek içinde 500 µl steril su bulunan 1,5 ml'lik DNase-RNase free ependorf tüplerine aktarıldı. Vorteks (Vortex-Genie 2, ABD) ile iyice karıştırıldıktan sonra süspansiyon kuru blok ısıtıcısında (Daihan Scientific, Kore) 95 °C'de 10 dakika bekletildi. Bu işlemi takiben eppendorf tüpleri kuru blok ısıtıcılarından alınarak 3-5 sn vortekslendikten hemen sonra 13 500 rpm'de 3 dakika santrifüje (WiseSpin, Güney Kore) edildi. Santrifüj sonrası elde edilen supernatant steril eppendorf tüplerine aktarıldı.

4.2.3.3. DNA saflık kontrolleri ve miktar tayinleri

İzolatlardan elde edilen DNA'ların saflık kontrolleri ve miktar tayinleri Nonadrop 2000c (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Cihaz ile DNA'ların 260 nm ve 280 nm'deki absorbansları hesaplanarak saflığı ve miktarları kontrol edildikten sonra moleküler analizlerde hedef DNA olarak kullanılıncaya kadar -20 °C'de bekletildi.

4.2.4. Moleküler analizler

Moleküler aşamaların gerçekleştirilmesinde farklı oran ve konsantrasyonlarda dNTPs (Vivantis, Malezya), 10x tampon buffer (Thermo Scientific, Litvanya), $MgCl_2$ (25mM) (Thermo Scientific, Litvanya) ve Taq polimeraz (5 U/µl) (Thermo Scientific, Litvanya) üretici firmaların önerileri doğrultusunda kullanıldı. Primerlerin tamamı (Tablo 3) Sentromer DNA Teknolojileri (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edildi. Her bir PCR protokolü gradient PCR yöntemi ile optimize edildikten sonra hedeflenen gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanıldı.

Tablo 3. Moleküler analizlerde kullanılan primerler

Gen	Oligonükleotid sekansı (5'–3')	Amplikon uzunluğu (bp)	PCR analizi (Metot)	Kaynak
***E. coli* 16S rRNA**	F: GACCTCGGTTTAGTTCACAGA R: CACACGCTGACGCTGACCA	585	*E. coli* konfirmasyonu (simpleks PCR)	Wang ve ark. 1996
papA	F: ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG R: CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	717	ExPEC virulens gen analizi (Multipleks PCR)	Zhu ve ark. (2017), Johnson ve ark. (2003)
papC	F: GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA R: ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	203		
iutA	F: ATCGGCTGGACATCATGGGAAC R: CGCATTTACCGTCGGGAACGG	314		
kpsMTII	F: GCGCATTTGCTGATACTGTTG R: CATCCAGAC GATAAGCATGAGCA	272		
fimH	F: TGCAGAACGGATAAGCCGTGG R: GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508		
chuA	F: GACGAACCA ACGGTCAGGAT R: TGCCGCCAGTACC AAAGACA	279	Filogenetik grup analizi (Tripleks PCR)	Clermont ve ark. (2000)
yjaA	F: TGAAGTGTCAGGAGACGCT G R: ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211		
TspE4.C2	F: GAGTAATGTCGGGGCATTCA R: CGCGCCAACAAAGTATTACG	152		
ERIC	ERIC1: ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC ERIC2: AAGTAAGTGACTGGGGTG AGCG	Değişken (variable)	Genotiplendirme (ERIC PCR)	Versalovic ve ark. (1991)

4.2.4.1. 16S rRNA bölgesinin PCR ile tespiti

Klasik kültür tekniği kullanılarak *E. coli* olarak tanımlanan izolatların PCR ile konfirmasyonu Wang ve ark. (1996) tarafından önerilen 16S rRNA gen bölgesini amplifiye eden yöntem kullanılarak gerçekleştirildi (139). Toplam 25 µl'lik hacimde olacak şekilde hazırlanan PCR reaksiyon içeriği; 2,5 µl 10 x PCR buffer, 2,5 µl $MgCl_2$, 2 µl dNTP miksi, 0,2 µl Taq DNA polymerase (5 U/µl), 0,9 µl her bir primerden (20 pmol) ile 11 µl steril su ve 5 µl template DNA kullanıldı. PCR amplifikasyonu;

95 °C'de 5 dakika ön denatürasyonu takiben, toplam 35 PCR siklusu 95 °C'de 1 dakika denaturasyon, 52 °C'de 1 dakika hibridizasyon, 72 °C'de 1 dakika uzama ve 1 siklus 72 °C'de 7 dakika son uzama olacak şekilde gerçekleştirildi.

4.2.4.2. ExPEC varlığının multipleks PCR ile belirlenmesi

PCR ile doğrulanan *E. coli* pozitif izolatları, *papA, papC, iutA, kpsMTII* ve *fimH* virülens genlerinin varlığına göre ExPEC yönünden değerlendirildi. Bu amaçla Johnson ve ark. (2003) ile Zhu ve ark. (2017) tarafından bildirilen primer büyüklüğü 203 ile 717 bp arasında değişen 5 farklı virülens gen bölgesini amplifiye eden multipleks PCR protokolü modifiye edilerek gerçekleştirildi (140,141). Toplam 50 µl'lik hacimde olacak şekilde hazırlanan PCR reaksiyon içeriği; 6 µl 10 x PCR buffer, 8 µl $MgCl_2$, 8 µl dNTP miksi, 0,6 µl Taq DNA polymerase (5 U/µl), her bir 40 pmol'lük primerden (Tablo 3) 1 µl ile 12 µl steril su ve 5,4 µl template DNA kullanıldı (Tablo 4). PCR amplifikasyonu; 95 °C 'de 5 dakika ön denatürasyonu takiben, toplam 35 PCR siklusu 95 °C'de 1 dakika denaturasyon, 52 °C'de 1 dakika hibridizasyon, 72 °C'de 1 dakika uzama ve 1 siklus 72 °C'de 7 dakika son uzama olacak şekilde gerçekleştirildi (Tablo 5).

Tablo 4. Multipleks PCR reaksiyon içeriği

Reaksiyon içeriği	**Kullanılan miktar**
Steril distile su	12 µl
PCR buffer (10x konsantrasyonda)	6 µl
$MgCl_2$ (25mM)	8 µl
dNTPs (10 mM)	8 µl
Her bir gen bölgesi için aynı miktar ve konsantrasyon da;	
Primer F (40 pmol/ µl)	1 µl (x5)
Primer R (40 pmol/ µl)	1 µl (x5)
Taq polimeraz enzimi (1.0 U)	0,6 µl
Örnek DNA	5,4 µl
Toplam hacim	**50 µl**

Tablo 5. Multipleks PCR siklus protokolü

Amplifikasyon	Sıcaklık	Zaman	Siklus
Ön Denatürasyon	95 °C	5 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	1 dakika	35
Primerlerin Bağlanması	60 °C	1 dakika	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son Uzama	72 °C	5 dakika	1

4.2.4.3. Filogenetik Grupların Belirlenmesi

ExPEC olarak tanımlanan izolatlarda filogenetik gruplar, Clermont ve ark. (2000) tarafından bildirilen TspE4.C2 klonu ve *chuA*, *yjaA* gen bölgelerini amplifiye eden primerler kullanılarak tripleks PCR yöntemi ile gerçekleştirildi (116). Tripleks PCR reaksiyon ve siklus protokolü Tablo 5 ve Tablo 6'da verilmiştir.

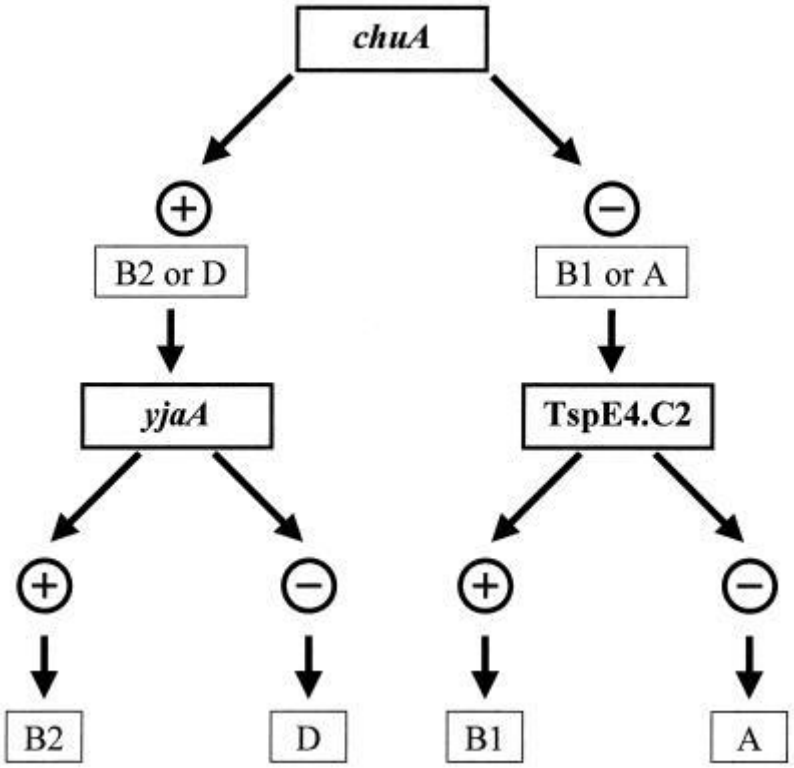
Tablo 6. Tripleks PCR reaksiyon içeriği

Reaksiyon içeriği	Kullanılan miktar
Steril distile su	16,5 µl
PCR buffer (10x konsantrasyonda)	6 µl
$MgCl_2$ (25mM)	8 µl
dNTPs (10 mM)	8 µl
Her bir gen bölgesi için aynı miktar ve konsantrasyon da;	
Primer F (40 pmol/ µl)	1 µl (x3)
Primer R (40 pmol/ µl)	1 µl (x3)
Taq polimeraz enzimi (1.0 U)	0,5 µl
Örnek DNA	5 µl
Toplam hacim	**50 µl**

Tablo 7. Tripleks PCR siklus protokolü

Amplifikasyon	Sıcaklık	Zaman	Siklus
Ön Denatürasyon	94 °C	5 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	35
Primerlerin Bağlanması	55 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	30 saniye	
Son Uzama	72 °C	7 dakika	1

Elde edilen sonuçlar Clermont ve ark. (2000) tarafından önerilen ikili karar ağacına göre değerlendirilecektir (Şekil 11) (116).



Şekil 11. Filogenetik karar ağacı (116)

4.2.4.4. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ve görüntülenmesi

PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünleri SafeView (ABM, Kanada) DNA boyası içeren % 1,5'lik agaroz (Biomax, EEC) jelde 100 voltluk akımda elektroforezde (Thermo Scientific, Çin) yürütüldü. Yürütme sonrası oluşan bantlar 100 bp'lik DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile 312 nm'lik dalga boyunda UV transilümünatörde (Spectroline, Model TC-312 E/F, ABD) görüntülenerek değerlendirildi.

4.3. Antibiyotik Duyarlılık Testi

ExPEC izolatlarının antibiyotiklere karşı duyarlılık durumu BD Phoenix™ M50 (BD Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD, ABD) cihazında üretici firmanın talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi. Bu amaçla amikasin, amoksisilin-klavulat(f), ampisilin, ampisilin-sulbaktam(f), sefazolin, sefepim, seftazidime,

seftolozan-tazobaktam, seftriakson, sefuroksim, siprofloksasin, ertapenem, gentamisin, imipenem, levofloksasin, meropenem, piperasilin-tazobaktam, tigesiklin ve trimetoprim-sülfametksazol antibiyotiklerinin bulunduğu BD Phoenix™ NMIC/ID-433 Panel kartları kullanıldı. Analiz sonrası MİK değerleri, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (https://www.eucast.org/clinical_breakpoints Erişim tarihi: 29 Mayıs 2023) önerilerine göre yorumlandı. En az iki ve daha fazla antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edilen izolatlar çoklu antibiyotiğe dirençli (MDR) olarak tanımlandı (142).

4.4. ExPEC İzolatları Arasında Klonal İlişkinin Belirlenmesi

ExPEC izolatlarında klonal yakınlık Versalovic ve ark. (1991) tarafından bildirilen ERIC-PCR yöntemi ile gerçekleştirildi (143). Bu amaçla kullanılan primerler Tablo 3'te verilmiştir. PCR reaksiyon miksi, DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Fisher, ABD) ve primerlerden oluşacak şekilde hacimsel olarak ayarlandı. PCR amplifikasyonu için 1 siklus 94 °C'de (5 dakika) ilk denaturasyonu takiben 94 °C'de (1 dakika) denaturasyon, 25 °C'de (1 dakika) primer bağlanması ve 72 °C'de (2 dakika) primer uzamasından oluşan 40 siklusdan oluştu. PCR ürünleri % 2'lik agaroz (Biomax, EEC) jelde 100 voltluk akımda elektroforezde (Thermo Scientific, Çin) yürütüldü. Yürütme sonrası oluşan bantlar Image Lab Software v6.0 (Bio-Rad, USA) jel dökümantasyon sisteminde görüntülenerek analiz edildi.

4.5. İstatiksel Analizler

E. coli ve ExPEC varlığı ile örnek tipi (karkas, deri ve rektal örnekler) ve örneklerin toplandığı iller (Diyarbakır ve Batman) arasında istatiksel farklılığın önemli olup olmadığı pearson ki-kare ($\chi 2$) testi ile belirlendi. Tanımlayıcı istatistik olarak yüzde değerleri verildi. İstatiksel analizler için SPSS (version 24) paket programı kullanıldı. İstatiksel önemlilik $P < 0,05$ olarak kabul edildi.

ERIC-PCR sonucu agaroz jelde elde edilen bantlara ait bant modellerinin küme analizi için UPGMA algoritması kullanıldı (144). Filogenetik ağaç, iTOL sürüm 4 (145) kullanılarak oluşturuldu. Normalizasyondan sonra, tepe konumuna dayalı profil benzerlikleri Jaccard benzerlik katsayısı kullanılarak hesaplandı.

5. BULGULAR

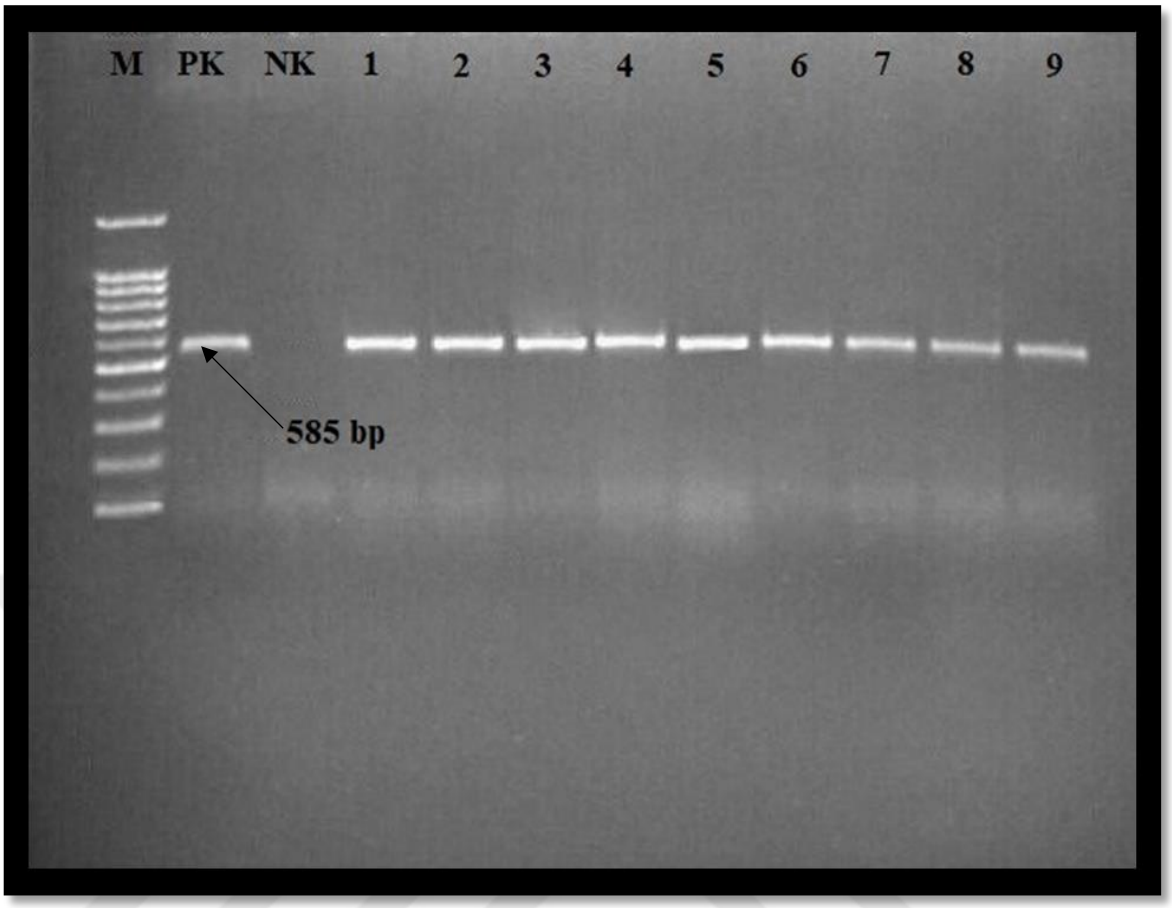
5.1. *E. coli*'nin Kültür Yöntemi ile Tanımlanması ve PCR'da doğrulanması

Bu çalışmada Diyarbakır ve Batman illerinde iki özel kesimhanede karkas (n: 133), deri (n: 133), rektal (n: 133), bıçak (n: 18), personel eli (n: 12), padok (n: 12) ve su (n: 6) olmak üzere toplam 447 örnekte *E. coli* varlığı yöntem kısmında belirtilen mikrobiyolojik (izolasyon ve identifikasyon) ve moleküler (PCR, doğrulama) analizler uygulanarak belirlendi. Bakteriyel identifikasyon sisteminde *E. coli* olarak tanımlanan izolatların moleküler doğrulaması amacıyla 16S rRNA gen bölgesinin amplifiye edildiği (585 bp) PCR yöntemi kullanıldı (Şekil 12). Analiz bulguları sonucunda 447 örneğin 409 (% 91,49)' unda *E. coli* tespit edildi. Karkas, deri, rektal, bıçak, personel eli, padok ve su örneklerindeki *E. coli* varlığı sırasıyla % 88,72, % 90,22, % 100, % 83,33, % 91,66, % 75 ve % 50 olduğu saptandı (Tablo 8). Besi sığırı örnekleri (karkas, deri, rektal) arasında en yüksek *E. coli* varlığı % 100 ile rektal örneklerde en düşük % 88,72 ile karkas örneklerinde belirlendi (P>0,05). Diyarbakır ilinden toplanan karkas, deri ve rektal örneklerde *E. coli* varlığı sırası ile % 96,77 (60/62), % 88,70 (55/62) ve % 100 (62/62), Batman ilinde ise sırası ile % 81,69 (58/71), % 91,54 (65/71) ve % 100 (71/71) oranında saptandı (P>0,05) (Tablo 8).

Tablo 8. *E. coli* varlığının dağılımı

Örnek	***E. coli* pozitif ve negatif örnek sayısı ve yüzdesi**						
	Pozitif		**Negatif**		**Pozitif %**		
	A (n:62)	**B (n:71)**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A+B (n:133)**
Karkas	60	58	2	13	96,77	81,69	88,72
Deri	55	65	7	6	88,70	91,54	90,22
Rektal	62	71	0	0	100	100	100
Bıçak	7	8	2	1	77,77	88,88	83,33
Personel eli	6	5	0	1	100	83,33	91,66
Padok	5	4	1	2	83,33	66,66	75
Su	0	3	3	0	0	100	50
Toplam	**409**		**38**				**91,49**

A: Diyarbakır **B:** Batman



Şekil 12. PCR ile *E. coli* olarak tespit edilen izolatların agaroz jel görüntüsü

M: DNA ladder (100 bp)

PK: Pozitif Kontrol

NK: Negatif Kontrol

1-9: *E. coli* pozitif izolatlar

5.2. ExPEC Varlığı

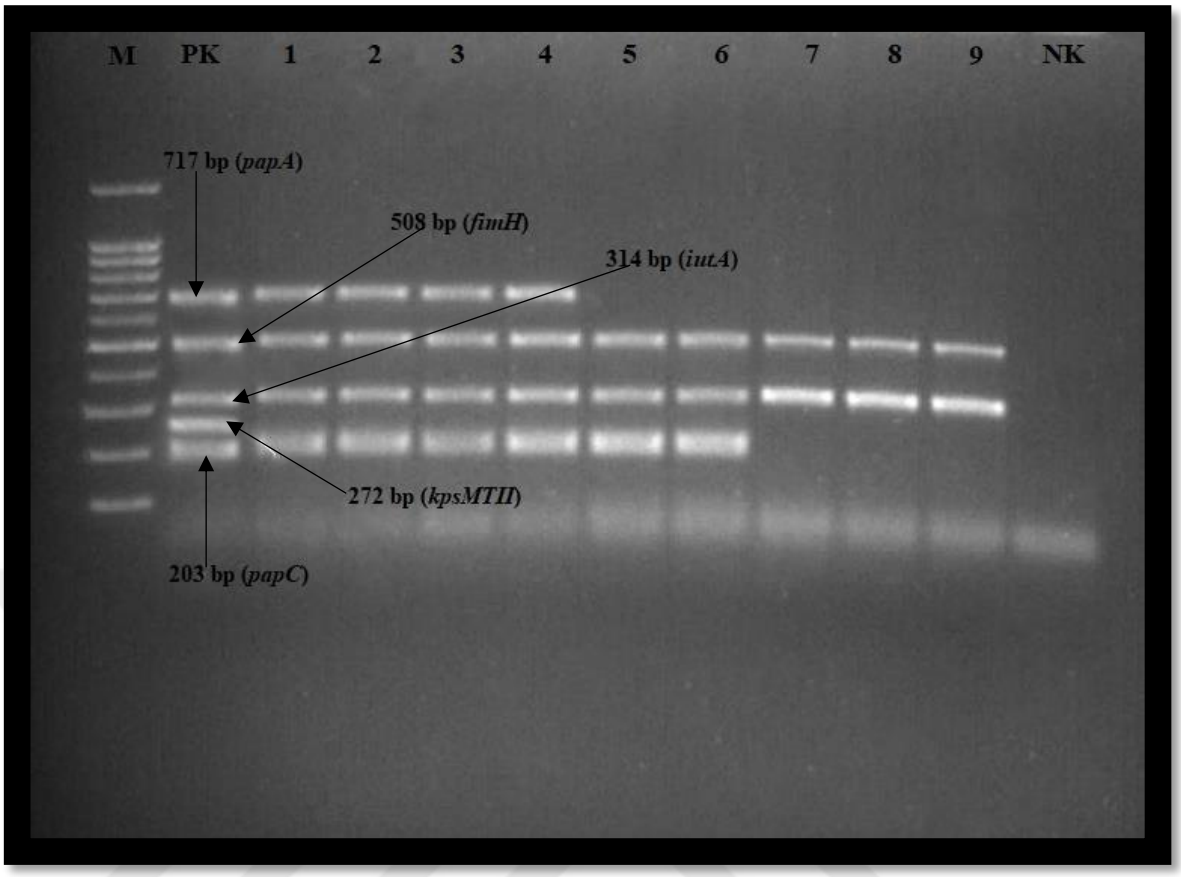
Çalışmada PCR ile doğrulanan toplam 409 *E. coli* izolatı *papA, papC, iutA, kpsMTII* ve *fimH* virulens genlerinin varlığına göre ExPEC açısından değerlendirildi. Multipleks PCR reaksiyonu sonrası yapılan agaroz jel elektroforezinde *papA* için 717 bp, *papC* için 203 bp, *iutA* için 314 bp, *kpsMTII* için 272 bp ve *fimH* için 508 bp büyüklüğünde bantların varlığına bakıldı. ExPEC yönünden analize alınan 409 izolatın % 82,88 (339/409)'inin *fimH*, %1,22 (5/409)'sinin *papA*, % 1,46 (6/409)'sının *papC*, % 8,55 (35/409)'inin *iutA* ve % 0 (0/409) *kpsMTII* genlerini içerdiği tespit edildi (Şekil 13).

Diğer örneklerin aksine su örneklerinden elde edilen izolatların sadece *fimH* geni taşıdığı diğer genleri taşımadığı belirlendi. Alınan 447 örnekten elde edilen 409 *E. coli* izolatın 36 (% 8,80)'sı ExPEC olarak tanımlandı. ExPEC'lerde bulunan en az iki virulens geni bulunduran ve ExPEC olarak tanımlanan izolatların % 38,88 (14/36)'inin karkas, % 22,22 (8/36)'sinin deri, % 25 (9/36)'inin rektal örneklere ait olduğu ve ExPEC dağılımının karkas, deri ve rektal örnekler arasında istatiksel açıdan önemli fark olmadığı saptandı (P>0,05). Toplam 133 hayvanın sadece birinde hem karkas ve hem de rektal örneğinde aynı anda ExPEC varlığı saptandı. Personel el, bıçak ve padok örneklerinde ise ExPEC varlığı sırasıyla % 8,33 (3/36), % 2,77 (1/36) ve % 2,77 (1/36) olarak belirlendi (Tablo 9). Diyarbakır ve Batman illerinden toplanan örneklerden elde edilen *E. coli* izolatlarında tespit edilen virulens genlerin dağılımı ve ExPEC varlığı Tablo 10'da verilmiştir. ExPEC varlığı ile iller arasında farklılık istatiksel açıdan önemsiz bulundu (P>0,05).

Tablo 9. Örneklere göre ExPEC'nin dağılımı

Örnek türü	**ExPEC tespit edilen örneklerin oranı (x/y)**	
	Diyarbakır	**Batman**
Karkas	62/9 (% 14,51)	71/5 (% 7,04
Deri	62/2 (% 3,22)	71/6 (% 8,45)
Rektal	62/4 (% 6,45)	71/5 (% 7,04)
Bıçak	9/0 (% 0)	9/1 (% 11,11)
Personel eli	6/2 (% 33,33)	6/1 (% 16,66)
Padok	6/0 (% 0)	6/1 (% 16,66)
Su	3/0 (% 0)	3/0 (% 0)
Toplam	210/17 (% 8,09)	218/19 (% 8,01)

x/y: Analiz edilen örnek sayısı/pozitif örneklerin sayısı



Şekil 13. ExPEC izolatlarında Multipleks PCR ile tespit edilen *papA, papC, fimH* ve *iutA* genlerinin agaroz jel görünümü

M: DNA ladder (100 bp)

PK: Pozitif kontrol **NK:** Negatif kontrol

1-4: *papA, papC, fimH* ve *iutA* geni pozitif ExPEC izolatlar

5-6: *papC, fimH* ve *iutA* geni pozitif ExPEC izolatlar

7-9: *fimH* ve *iutA* geni pozitif ExPEC izolatlar

Tablo 10. İl bazında ExPEC olarak tanımlanan izolatlarda virulens genlerin dağılımı

İzolat no	İl	İzolat kaynağı	*papA*	*papC*	*iutA*	*kpsMTII*	*fimH*
1	Diyarbakır	Karkas 75	+	-	+	-	+
2	Diyarbakır	Karkas 82	+	+	+	-	+
3	Diyarbakır	Karkas 83	+	+	+	-	+
4	Diyarbakır	Karkas 84	+	+	+	-	+
5	Diyarbakır	Karkas 88	+	-	+	-	+
6	Diyarbakır	Karkas 122	-	-	+	-	+
7	Diyarbakır	Karkas 125	-	-	+	-	+
8	Diyarbakır	Karkas 126	-	-	+	-	+
9	Diyarbakır	Karkas 133	-	-	+	-	+
10	Diyarbakır	Deri 85	-	-	+	-	+
11	Diyarbakır	Deri 121	-	-	+	-	+
12	Diyarbakır	Rektal 96	-	-	+	-	+
13	Diyarbakır	Rektal 97	-	-	+	-	+
14	Diyarbakır	Rektal 117	-	-	+	-	+
15	Diyarbakır	Rektal 133	-	-	+	-	+
16	Diyarbakır	Personel eli 7	-	+	+	-	+
17	Diyarbakır	Personel eli 12	-	-	+	-	+
18	Batman	Karkas 40	-	-	+	-	+
19	Batman	Karkas 43	-	-	+	-	+
20	Batman	Karkas 44	-	-	+	-	+
21	Batman	Karkas 46	-	-	+	-	+
22	Batman	Karkas 63	-	-	+	-	+
23	Batman	Deri 10	-	-	+	-	+
24	Batman	Deri 12	-	-	+	-	+
25	Batman	Deri 18	-	+	-	-	+
26	Batman	Deri 19	-	-	+	-	+
27	Batman	Deri 47	-	-	+	-	+
28	Batman	Deri 55	-	-	+	-	+
29	Batman	Rektal 8	-	-	+	-	+
30	Batman	Rektal 19	-	-	+	-	+
31	Batman	Rektal 34	-	+	+	-	+
32	Batman	Rektal 46	-	-	+	-	+
33	Batman	Rektal 58	-	-	+	-	+
34	Batman	Bıçak 1	-	-	+	-	+
35	Batman	Personel eli 4	-	-	+	-	+
36	Batman	Padok 2	-	-	+	-	+
Toplam			**5**	**6**	**35**	**0**	**36**

5.3. ExPEC İzolatlarında Filogenetik Grupların Dağılımı

ExPEC olarak tanımlanan 36 izolatın filogruplandırılması TspE4.C2 klonu ile *chuA* ve *yjaA* genlerinin amplifikasyonunu hedefleyen tripleks PCR yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu genlerin varlığına göre elde edilen sonuçlar Clermont ve ark. (2000), tarafından önerilen ikili karar ağacına göre değerlendirildi (Tablo 11).

Tablo 11. İkili karar ağacına göre filogenetik grupların yorumlanması (116)

Filogenetik Grup	*chuA*	*yjaA*	TspE4.C2
A	-	-	-
A	-	+	-
B1	-	-	+
B2	+	+	-
B2	+	+	+
D	+	-	-
D	+	-	+
Tanımlanmadı	-	+	+

Çalışmada ExPEC izolatlarının A, B1, B2 ve D filogenetik grup dağılımı sırası ile % 5,55 (2/36), % 25 (9/36) , % 25 (9/36) ve % 38,88 (14/36)'inde tespit edildi. İzolatların % 5,55 (2/36) ise herhangi bir grup içinde tanımlanamadı (Tablo 12). Buna göre izolatların % 38,88 ile en fazla D grubunda ve % 5,55 ile en az A grubunda olduğu saptandı. ExPEC izolatlarının örnek düzeyinde illere göre filogenetik grubu dağılımı Tablo 13'te verilmiştir.

Tablo 12. Örneklerden elde edilen ExPEC izolatlarının filogenetik gruplara göre dağılımı

Örnek	n	Filogenetik grup				
		A	B1	B2	D	Tanımlanamadı
Karkas	14	0	2	4	7	1
Deri	8	1	3	1	3	0
Rektal	9	0	4	4	1	0
Bıçak	1	0	0	0	1	0
Personel eli	3	0	0	0	2	1
Padok	1	1	0	0	0	0
Su	0	0	0	0	0	0
Toplam	**36**	**2**	**9**	**9**	**14**	**2**

n: ExPEC izolat sayısı **A, B1, B2, D:** Filogenetik gruplar

Tablo 13. ExPEC olarak tanımlanan izolatlarda filogenetik grupların dağılımı

İzolat no	İl	İzolat kaynağı	*chuA*	*yjaA*	TspE4.C2	Filogenetik Grup
1	Diyarbakır	Karkas 75	+	-	+	D
2	Diyarbakır	Karkas 82	+	-	+	D
3	Diyarbakır	Karkas 83	+	-	+	D
4	Diyarbakır	Karkas 84	+	-	+	D
5	Diyarbakır	Karkas 88	+	-	-	D
6	Diyarbakır	Karkas 122	+	+	+	B2
7	Diyarbakır	Karkas 125	+	+	-	B2
8	Diyarbakır	Karkas 126	+	-	-	D
9	Diyarbakır	Karkas 133	+	+	+	B2
10	Diyarbakır	Deri 85	-	-	+	B1
11	Diyarbakır	Deri 121	+	+	-	B2
12	Diyarbakır	Rektal 96	+	+	+	B2
13	Diyarbakır	Rektal 97	-	-	+	B1
14	Diyarbakır	Rektal 117	-	-	+	B1
15	Diyarbakır	Rektal 133	-	-	+	B1
16	Diyarbakır	Personel eli 7	+	-	+	D
17	Diyarbakır	Personel eli 12	+	-	-	D
18	Batman	Karkas 40	-	-	+	B1
19	Batman	Karkas 43	-	+	+	Tanımlanmadı
20	Batman	Karkas 44	-	-	+	B1
21	Batman	Karkas 46	+	-	-	D
22	Batman	Karkas 63	+	+	-	B2
23	Batman	Deri 10	+	-	+	D
24	Batman	Deri 12	-	-	-	A
25	Batman	Deri 18	+	-	+	D
26	Batman	Deri 19	+	-	+	D
27	Batman	Deri 47	-	-	+	B1
28	Batman	Deri 55	-	-	+	B1
29	Batman	Rektal 8	+	-	+	D
30	Batman	Rektal 19	-	-	+	B1
31	Batman	Rektal 34	+	+	+	B2
32	Batman	Rektal 46	+	+	+	B2
33	Batman	Rektal 58	+	+	-	B2
34	Batman	Bıçak 1	+	-	+	D
35	Batman	Personel eli 4	-	+	+	Tanımlanmadı
36	Batman	Padok 2	-	-	-	A

5.4. ExPEC İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığının Tespit Edilmesi

ExPEC izolatlarının antibiyotik direnç durumu BD Phoenix™ M50 (BD Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD, ABD) cihazında üretici firmanın talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi. Bu amaçla amikasin, amoksisilin-klavulat(f), ampisilin, ampisilin-sulbaktam(f), sefazolin, sefepim, seftazidime, seftolozan-tazobaktam, seftriakson, sefuroksim, siprofloksasin, ertapenem, gentamisin, imipenem, levofloksasin, meropenem, piperasilin-tazobaktam, tigesiklin ve trimetoprim-sülfametksazol antibiyotiklerinin bulunduğu BD Phoenix™ NMIC/ID-433 Panel kartları kullanıldı. Analiz sonrası MİK değerleri, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) önerilerine göre yorumlandı. Bu kapsamda 36 ExPEC izolatının; amoksisilin-klavulat(f), ampisilin, ampisilin-sulbaktam(f), sefazolin, sefepim, seftazidim, seftriakson, sefuroksim, siprofloksasin, gentamisin, levofloksasin, tigesiklin ve trimetoprim-sülfametksazol antibiyotiklerine karşı sırasıyla % 27,77 (10/36), % 61,11 (22/36), % 13,88 (5/36), % 16,66 (6/36), % 8,33 (3/36), % 8,33 (3/36), % 16,66 (6/36), % 16,66 (6/36), % 38,88 (14/36), % 22,22 (8/36), % 38,88 (14/36), % 30,55 (11/36) ve % 47,22 (17/36)'inin dirençli olduğu belirlendi. İzolatların tamamı (%100) amikasin, seftolozan-tazobaktam, ertapenem, imipenem, meropenem ve piperasillin-tazobaktam antibiyotiklerine karşı duyarlı tespit edildi (Tablo 14). İki ve daha fazla antibiyotiğe dirençli izolat sayısı % 61,11 (22/36) olarak tespit edildi. İl bazında ExPEC izolatları virülens gen ve antibiyotik dirençli fenotipleri Tablo 15'te verilmiştir.

Tablo 14. ExPEC izolatlarının antibiyotiklere karşı direnç ve duyarlılık düzeyleri

No	Antibiyotik Sınıfı	Antibiyotiğe Dirençli ExPEC İzolatları							
		*Antibiyotik	Karkas (n:14)	Deri (n:8)	Rektal (n:9)	Bıçak (n:1)	Personel (n:3)	Padok (n:1)	Toplam (n:36)
1	Beta-Laktamlar								
	Penisilinler	Amoksisilin-Klavulat(f)	5 (% 35,71)	0 (% 0)	3 (% 33,33)	0 (% 0)	2 (% 66,66)	0 (% 0)	10 (% 27,77)
		Ampisilin	10 (% 71,42)	3 (% 37,5)	5 (% 55,55)	1 (% 100)	3 (% 100)	0 (% 0)	22 (% 61,11)
		Ampisilin-sulbaktam(f)	3 (% 21,42)	0 (% 0)	1 (% 11,11)	0 (% 0)	1 (% 33,33)	0 (% 0)	5 (% 13,88)
	Sefalosporinler	Sefazolin	4 (% 28,57)	0 (% 0)	1 (% 11,11)	0 (% 0)	1 (% 33,33)	0 (% 0)	6 (% 16,66)
		Sefepim	3 (% 21,42)	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)	3 (% 8,33)
		Seftazidime	3 (% 21,42)	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)	3 (% 8,33)
		Seftriakson	4 (% 28,57)	0 (% 0)	1 (%11,11)	0 (% 0)	1 (% 33,33)	0 (% 0)	6 (% 16,66)
		Sefuroksim	4 (% 28,57)	0 (% 0)	1 (%11,11)	0 (% 0)	1 (% 33,33)	0 (% 0)	6 (% 16,66)
2	Florokinolonlar	Siprofloksasin	8 (% 57,14)	2 (% 25)	2 (% 22,22)	0 (% 0)	2 (% 66,66)	0 (% 0)	14 (% 38,88)
		Levofloksasin	8 (% 57,14)	2 (% 25)	2 (%22,22)	0 (% 0)	2 (% 66,66)	0 (% 0)	14 (% 38,88)
3	Aminoglikozidler	Gentamisin	4 (% 28,57)	0 (% 0)	3 (% 33,33)	0 (% 0)	1 (% 33,33)	0 (% 0)	8 (% 22,22)
4	Tetrasiklin	Tigesiklin	7 (% 50)	0 (% 0)	2 (% 22,22)	1 (% 100)	1 (% 33,33)	0 (% 0)	11 (% 30,55)
5	Sülfonamidler	Trimetoprim-Sülfametksazol	10 (% 71,42)	3 (% 37,5)	0 (% 0)	1 (% 100)	3 (% 100)	0 (% 0)	17 (% 47,22)

*İzolatların tamamı Amikasin(AMK), Ceftolozane-Tazobactam(C/T), Ertapenem(ETP), İmipenem(IMP), Meropenem(MEM) ve Piperacillin-Tazobactam(TZP) antibiyotiklerine duyarlı olduğu tespit edilmiştir

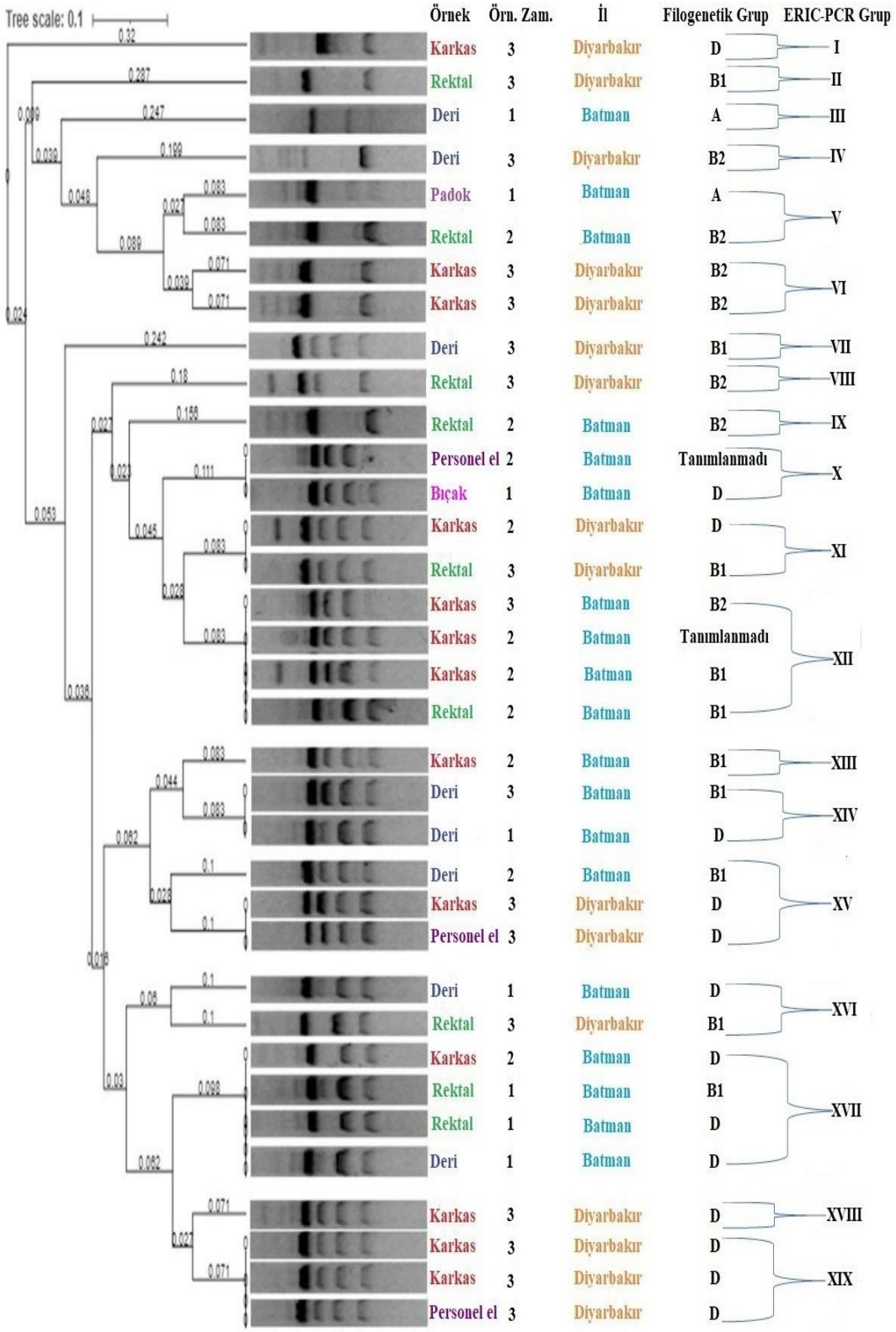
Tablo 15. ExPEC izolatlarında virülens genlerin, antibiyotik direnç fenotiplerinin ve filogenetik grupların dağılımı

No	İzolat	Şehir	ExPEC Virülens Genleri	Filogenetik Grup	*Fenotipik Antibiyotik Direnç Profili	Çoklu İlaç Direnci
1	Karkas 75	Diyarbakır	*papA,iutA, fimH*	D	-	-
2	Karkas 82	Diyarbakır	*papA,papC,iutA,fimH*	D	AM,CIP,LEV,TGC,TMP-SMX	+
3	Karkas 83	Diyarbakır	*papA,papC,iutA,fimH*	D	AM,CIP,LEV,TGC,TMP-SMX	+
4	Karkas 84	Diyarbakır	*papA,papC,iutA,fimH*	D	AM,CIP,LEV,TGC,TMP-SMX	+
5	Karkas 88	Diyarbakır	*papA,iutA,fimH*	D	AMC,AM,CIP,GEN,LEV,TGC,TMP-SMX	+
6	Karkas 122	Diyarbakır	*iutA,fimH*	B2	AM,CFZ,FEP,CAZ,CRO,CXM,CIP,GEN,LEV,TMP-SMX	+
7	Karkas 125	Diyarbakır	*iutA,fimH*	B2	-	-
8	Karkas 126	Diyarbakır	*iutA,fimH*	D	AMC,AM,SAM,CFZ,CRO,CXM,CIP,GEN,LEV,TGC,TMP-SMX	+
9	Karkas 133	Diyarbakır	*iutA,fimH*	B2	AM,CFZ,FEP,CAZ,CRO,CXM,CIP,GEN,LEV,TMP-SMX	+
10	Deri 85	Diyarbakır	*iutA,fimH*	B1	AM,CIP,LEV,TMP-SMX	+
11	Deri 121	Diyarbakır	*iutA,fimH*	B2	-	-
12	Rektal 96	Diyarbakır	*iutA,fimH*	B2	AM,CIP,GEN,LEV,TMP-SMX	+
13	Rektal 97	Diyarbakır	*iutA,fimH*	B1	-	-
14	Rektal 117	Diyarbakır	*iutA,fimH*	B1	AMC,AM,GEN	+
15	Rektal 133	Diyarbakır	*iutA,fimH*	B1	AMC,AM,SAM,CFZ,CRO,CXM,CIP,GEN,LEV,TGC	+
16	Personel Eli 7	Diyarbakır	*papC,iutA,fimH*	D	AM,CIP,LEV,TGC,TMP-SMX	+
17	Personel Eli 12	Diyarbakır	*iutA,fimH*	D	AMC,AM,SAM,CFZ,CRO,CXM,CIP,GEN,LEV,TMP-SMX	+
18	Karkas 40	Batman	*iutA, fimH*	B1	AMC,AM,SAM,CFZ,FEP,CAZ,CRO,CXM,CIP,LEV,TMP-SMX	+
19	Karkas 43	Batman	*iutA, fimH*	Tanımlanmadı	-	-
20	Karkas 44	Batman	*iutA, fimH*	B1	AMC,AM,SAM,TGC,TMP-SMX	+
21	Karkas 46	Batman	*iutA, fimH*	D	TGC	-
22	Karkas 63	Batman	*iutA, fimH*	B2	AMC,AM,TMP-SMX	+
23	Deri 10	Batman	*iutA,fimH*	D	-	-
24	Deri 12	Batman	*iutA,fimH*	A	-	-
25	Deri 18	Batman	*papC,fimH*	D	-	-
26	Deri 19	Batman	*iutA,fimH*	D	-	-
27	Deri 47	Batman	*iutA,fimH*	B1	AM,TMP-SMX	+
28	Deri 55	Batman	*iutA,fimH*	B1	AM,CIP,LEV,TMP-SMX	+
29	Rektal 8	Batman	*iutA,fimH*	D	-	-
30	Rektal 19	Batman	*iutA,fimH*	B1	-	-
31	Rektal 34	Batman	*papC,iutA,fimH*	B2	-	-
32	Rektal 46	Batman	*iutA,fimH*	B2	AM,TMP-SMX	+
33	Rektal 58	Batman	*iutA,fimH*	B2	AMC,AM,TGC	+
34	Bıçak 1	Batman	*iutA,fimH*	D	AM,TGC,TMP-SMX	+
35	Personel Eli 4	Batman	*iutA,fimH*	Tanımlanmadı	AMC,AM,TMP-SMX	+
36	Padok 2	Batman	*iutA,fimH*	A	-	-

*Amoxicillin-Clavulate(f) (AMC), Ampicillin (AM), Ampicilin-Sulbactam(f) (SAM), Cefazolin (CFZ), Cefepime(FEP), Ceftazidime (CAZ), Ceftriaxone(CRO), Cefuroxime (CXM), Ciprofloxacin(CIP), Gentamicin(GEN), Levofloxacin(LEV), Tigecycline (TGC), Trimethoprim-Sulfametxazole (TMP-SMX)

5.5. ExPEC İzolatlarının ERIC-PCR Profilleri

Bu çalışmada ExPEC olarak tanımlanan 36 izolatta ERIC-PCR analizleri yapılarak klonal yakınlık incelendi. İzolatlarda benzerlik derecesi için UPGMA yöntemi kullanıldı ve benzerlik oranı Jakard Katsayısı ile >%85 olarak belirlendi. Yapılan analizler sonucunda izolatlardaki bant sayılarının 1-5 arasında değiştiği ve oluşan bantların 100-1500 bp aralığında olduğu saptandı. Ancak izolatların birinde bant oluşumu gözlenmedi. Bu kapsamda toplam 35 ExPEC izolatının 26'sı 9 küme içinde geriye kalan 10 izolat ise 10 küme içinde olmak üzere 19 farklı küme içinde tanımlandı (Şekil 14). En büyük küme 4 izolattan oluşan XII ve XVII numaralı kümeler olduğu bunu 3 izolat ile XV ve XIX numaralı kümeler, 2 izolat ile V, VI, X, XI, XIV ve XVI numaralı kümelerin takip ettiği saptandı. Klonal açıdan küme analizi gerçekleştirilen ExPEC izolatlarının elde edildiği örneğin tipi, hangi ilden alındığı, hangi kesimhaneden elde edildiği bilgileri ile izolatlar arasında genetik ilişkiyi gösteren dendogram Şekil 14'te verildi.



Şekil 14. ERIC-PCR ile ExPEC izolatlarından elde edilen bantların dendrogram analizi

6. TARTIŞMA

Son yıllarda potansiyel zoonoz olarak kabul edilen ExPEC patotipleri insan ve hayvan sağlığı bakımından önemli halk sağlığı problemleri arasında gösterilmektedir (146,147). Hayvansal kaynaklı gıdaların ExPEC ile kontaminasyonu, çiftlikten sofraya her aşamada oluşabilmektedir (2,148,149). Farklı ülkelerde yapılan bilimsel çalışmalar kanatlı eti, domuz eti, sığır eti ve süt gibi hayvansal gıdaların ExPEC patotipleri için rezervuar olduğunu göstermektedir (5,6,78). Bu çalışmada 133 hayvana ait karkas, deri ve rektal örneği ile kesimhane ortamından alınan padok, bıçak, personel eli ve su olmak üzere toplam 447 örnek *E. coli* ve ExPEC varlığı yönünden incelendi. Analiz edilen 447 örneğin 409 (% 91,49)'un da *E. coli* tespit edilirken, örnek tipine göre tespit edilen *E. coli* oranları karkas, deri, rektal, bıçak, personel eli, padok ve su örneklerinde sırasıyla % 88,72 (118/133), % 90,22 (120/133), % 100 (133/133),% 83,33 (15/18), % 91,66 (11/12), % 75,0 (9/12) ve % 50,0 (3/6) düzeyinde saptandı. En yüksek *E. coli* varlığı % 100 ile rektal en düşük % 88,72 ile karkas örneklerinde tespit edidi. Schmidt ve ark. (2015) karkas, deri ve dışkı örneklerinde sırası ile % 91,9 (169/184), %100 (184/184) % 100 (184/184), Vázquez-Villanueva ve ark. (2023) karkas ve dışkı örneklerinde sırasıyla % 97,5 (117/120) ve % 98,3 (118/120) oranında *E. coli* tespit ettiklerini bildirmiştir (150,151). Parvej ve ark. (2018) inceledikleri 50 sığır rektal örneğinin % 42 (21/50)'sinde, Hassan ve ark. (2014) sığır rektal örneklerinin % 75 (96/128)'inde, Ogunleye ve ark. (2013) sığır rektal örneğinin % 80 (240/300)'ininde, Fikadu ve ark. (2023) karkas ve rektal örneklerinin sırası ile % 11,3 (17/150)'ünde ve % 15,3 (23/150)'ünde, Alvseike ve ark. (2019) sığır karkaslarının % 58 (145/250)'inde, Taha ve Yasin (2019) karkas örneklerinin % 41,6 (50/120)'sında *E. coli* saptadıklarını bildirmiştir (148, 152-156). *E. coli* gibi enterik kökenli mikroorganizmalar kesim prosesi gereği değişen oranlarda çapraz kontaminasyon ile karkasları kontamine edebilmektedir. Ancak kontaminasyon oranları kesim prosesi, örneklem tekniği, kesimhanede çalışan personelden kaynaklı çapraz kontaminasyonlar, örnek alınan hayvanların yaşı, ırkı, coğrafik ve iklimsel farklılıklara bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (150,151,154). Özellikle kesim sırasında kullanılan alet-ekipman ile su ve personelin el hijyeni karkasın kesim

sırasında ve sonrasında mikrobiyal kontaminasyonu açısından kritik bir öneme sahiptir (157,158). Bu çalışmada analiz edilen bıçak, personel eli, padok ve su örneklerinde sırasıyla % 83,33 (15/18), % 91,66 (11/12), % 75 (9/12) ve % 50 (3/6) gibi yüksek oranlarda *E. coli* saptanmıştır. Abayneh ve ark. (2019) kesim sırasında kullanılan bıçak ve personel eli örneklerinde *E. coli* oranını sırası ile % 15 (3/20) ve % 20 (4/20), Fikadu ve ark. (2023) bıçak, personel eli ve su örneklerinde sırası ile % 4,3 (4/93), % 7,5 (7/93) ve % 3,3 (1/30), Vázquez-Villanueva ve ark. (2023) kesimhanede aldıkları su örneklerinde % 50 (30/60) tespit etmiştir (150,151,159).

Son yıllarda yeni veya yeniden önem kazanan zoonotik potansiyeli olan patojenler küresel sağlığı tehdit eden önemli halk sağlığı problemleri arasında gösterilmektedir (160,161). Bu patojenler arasında yer alan ExPEC'in tespitine yönelik gerçekleştirilen bu çalışmada 447 örnekten elde edilen 409 *E. coli* izolatının 36 (% 8,80)'sında ExPEC tespit edildi. Saptanan ExPEC izolatların % 38,88 (14/36) ile karkas, % 22,22 (8/36) ile deri ve % 25 (9/36) ile rektal örneklerine ait olduğu tespit edilirken, personel eli, bıçak ve padok örneklerinde ise ExPEC varlığı sırasıyla % 8,33 (3/36), % 2,77 (1/36) ve % 2,77 (1/36) olarak belirlendi. İlgili araştırmalar incelendiğinde besi sığırları ile ilişkili deri, rektal, karkas gibi örnekler ile böyle hayvanların kesiminin gerçekleştirildiği kesimhane ortamından ExPEC varlığının belirlenmesine yönelik araştırmaların sınırlı sayıda olduğu ve bu alanda yapılan araştırmaların çoğunlukla tüketici düzeyinde satışa sunulan farklı hayvan türlerine ait et örneklerine ait olduğunu göstermektedir (3,76,78,162). Sınırlı sayıdaki bu araştırmaların birinde Schmidt ve ark. (2015) 184 sığıra ait deri, karkas ve rektal svab örneklerinden elde edilen 542 *E. coli* izolatının % 0,36 (2/542)'sının ExPEC olduğunu ve bu 2 ExPEC izolatının da deri örneklerinden elde edildiğini ve dana eti ve ürünlerinin ExPEC açısından önemli bir rezervuar olmadığını bildirmiştir (150). Ancak bu çalışmanın aksine çalışma bulgularımız, sığır karkaslarının insanlarda İYE'lere neden olan üropatojenik *E. coli*'lerin de yer aldığı ExPEC ile kontamine olabileceğini göstermektedir. Çalışma bulgularımıza benzer şekilde et ve et ürünlerinin (dana kıyma dahil) insanlarda İYE'ye neden olan bir ExPEC kaynağı olduğunu ifade eden çalışmalarda mevcuttur (68). Santo ve ark. (2007) sığır kıyma, kıyma makinesi ve personel eli svab örneklerinden elde edilen 287 *E. coli* izolatından, sığır kıymasında 3 örnekte, kıyma makinesinden ise 2 örnekte ExPEC tespit etmişlerdir (163). Farklı hayvan türlerine ait hayvansal

orijinli gıdaların incelendiği araştırmalarda tüketicilere satışa sunulan etlerde % 5,1-25 arasında ExPEC varlığını tespit etmişler (76,78,164,165). Xia ve ark. (2011) domuz pirzola, hindi kıyma, sığır kıyma ve tavuk göğüs örneklerinden elde edilen 1275 *E. coli* izolatın % 15,7 (200/1275)'sinde ExPEC tespit ettiğini ve bunların % 3,4 'ünün sığır kıyma örneklerine ait olduğunu saptamıştır (4). Ghodousi ve ark. (2016) tavuk eti örneklerinde tespit edilen 237 *E. coli* izolatında % 5,12 (12/237) oranında ExPEC olarak tespit ederken, Sukkua ve ark. (2017) tavuk eti örneklerinde % 25 oranında ExPEC tespit ettiklerini bildirmişlerdir (165,76).

ExPEC, virülens faktörleri bakımından hem kommensal *E. coli*'den hem de Shiga-toksijenik *E. coli*'den farklılıklar göstermektedir (81,166,167). *E. coli* izolatlarının ExPEC olarak tanımlanmasında çoğunlukla *papA, papC, iutA* ve *kpsMTII* genleri ile kısmen *fimH* geni kullanılmaktadır (4,7,76,168). Bu çalışmada ExPEC olarak tanımlanan izolatların % 13,88 (5/36) *papA,* % 16,66 (6/36) *papC,* % 97,22 (35/36) *iutA* ve % 100 (36/36) *fimH* virülens genlerini taşıdığı belirlendi. Çalışma bulgularımıza benzer şekilde *fimH* ve *iutA* genlerinin ExPEC izolatlarında yaygın bir şekilde içerdiğini belirten çalışmalar mevcuttur (7,150,162,168,169). Xia ve ark. (2011) ExPEC izolatlarının % 98,5 (197/200)'inin *iutA,* % 49 (98/200)'unun *papC* ve %10 (20/200)'unun da *papA* genlerini taşıdığını saptamıştır (4). Bir başka çalışmada ise Sukkua ve ark. (2017) ExPEC izolatlarının *iutA, fimH, papC* ve *papA* genini sırasıyla % 100 (14/14), % 100 (14/14), % 42,85 (6/14) ve % 7,14 (1,/14) oranında taşıdığını bildirmişler (76).

Kommensal *E. coli* suşlarının çoğu A grubunda, ExPEC suşlarının ise çoğunlukla filogenetik grup B2 ve D'de yer almaktadır (52,116,149,170). Bu çalışmada ExPEC izolatlarının A, B1, B2 ve D filogenetik grup dağılımı sırası ile % 5,55 (2/36), % 25 (9/36), % 25 (9/36) ve % 38,88 (14/36) olarak tespit edildi. İzolatların % 5,55 (2/36)'i ise herhangi bir grup içinde tanımlanamadı. Çalışma bulgularımıza benzer şekilde Xia ve ark. (2011) sığır kıymasında elde ettikleri ExPEC izolatlarının A, B1, B2 ve D filogenetik grup dağılımını sırası ile % 10, % 0, % 20 ve % 70 oranında tespit etmişler (4). Ancak çalışma bulgularımızdan farklı olarak Boudjerda ve Lahouel (2022) sığır etinde tespit ettikleri ExPEC izolatlarında A, B1, B2 ve D filogenetik grup dağılımını sırası ile % 64,38 (47/73), % 25,9 (20/73), % 3,98 (3/73), % 3,89 (3/73) saptamıştır

(78). Micenková ve ark. (2016) insan klinik örneklerde tespit ettikleri 407 ExPEC izolatı arasında en yaygın filogenetik grubun % 52,6 (214/407) ile B2 olduğunu ve bunu sırası ile D % 18,4 (75/407), A % 18,4 (75/407) ve B1 % 10,6 (43/407) filogruplarının takip ettiğini saptamışlar (166). Chakraborty ve ark. (2015) insan idrar yolu enfeksiyonları ve sepsis vakalarından izole ettikleri 300 ExPEC izolatının % 36 (108/300)'sının D, % 35 (104/300)'inin B2, % 20 (61/300)'sinin A ve % 9 (27/300)'un B1 filogenetik grupta olduğunu tespit etmişlerdir (171). Tayh ve ark. (2023) insan klinik örneklerden elde ettikleri 42 ExPEC izolatının % 54,8 (23/42)'sinin B2 grubuna ve % 45,2 (19/42)'sinin D grubuna ait olduğunu saptamıştır (172). Bu kapsamda insan klinik örneklerden elde edilen ExPEC izolatları ile çalışma bulgularımız arasında filogenetik grup dağılımı bakımından benzerliklerin olduğu görülmektedir (170).

Dünyada enfeksiyonlara neden olan patojen bakteriler de çoklu antibiyotik direnç gelişiminde çarpıcı artışlar görülmektedir. Antibiyotik dirençli mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar çoğu tedavi protokolüne yanıt vermemekte ve son çare olarak kullanılan antibiyotiklerin etki gücünü kaybetmesine neden olmaktadır (173,174). Son yıllarda, *E. coli*'nin, özellikle ExPEC'in, siprofloksasin ve sefalosporinler gibi birinci basamak antibiyotiklere karşı dirençliliğin belirgin şekilde artış gösterdiği bildirilmektedir (81,175). Çalışmamızda ExPEC izolatlarında beta-laktam antibiyotik sınıfı içerisinde direnç oranı en yüksek ampisilin % 61,11 (22/36), bunu siprofloksasin % 38,88 (14/36), amoksisilin-klavulanat(f) % 27,77 (10/36), sefazolin % 16,66 (6/36), seftriakson % 16,66 (6/36), sefuroksim % 16,66 (6/36), ampisilin-sulbaktam(f) % 13,88 (5/36), sefepim % 8,33 (3/36) ve seftazidim % 8,33 (3/36) ile takip etti. Aminoglikozitlerden gentamisin'e % 22,22 (8/36), florokinolonlardan levofloksasin'e % 38,88 (14/36), tetrasiklinlerden tigesiklin'e % 30,55 (11/36) ve sülfonamidlerden trimetoprim-sülfametksazol'e % 47,22 (17/36) oranında antibiyotik direnci saptanmıştır. ExPEC izolatlarının % 61,11 (22/36)'inde çoklu ilaç direnci tespit edildi. Literatürde ExPEC izolatlarında antibiyotik direnç profilinin belirlenmesine yönelik yapılan araştırmaların çoğu tavuk eti, domuz eti, sığır kıymasında yapılmıştır.

Santo ve ark. (2007) sığır kıyması ve kıyma makinesinin svab örneklerinden elde ettikleri ExPEC izolatlarının tetrasiklin ve streptomisin antibiyotiklerine, Lyhs ve ark.

(2012) tavuk etinde tespit ettikleri ExPEC izolatlarının ampisilin % 100, trimetoprim-sülfametoksazol % 100, tetrasiklin % 95,5 dirençli iken siprofloksasin ve sefalosporinlere karşı duyarlı bulduklarını bildirmiştir (163,164).

Sukkua ve ark. (2017), ise tavuk ve domuz etinde saptadıkları ExPEC izolatlarının tetrasiklin ile siprofloksasine dirençli olduğu, imipenem'e ise duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir (76). Xia ve ark. (2011), sığır kıymasında tespit ettikleri ExPEC izolatlarının tetrasikline % 67, gentamisine % 31,5 ve ampisiline % 22,5 dirençli iken, amikasin ve siprofloksasine duyarlı olduğunu saptamışlar (4). Boudjerda ve Lahouel (2022) tavuk eti, sığır eti ve çiğ sütte tespit ettikleri ExPEC izolatlarında % 64,25 ile en yüksek tetrasiklin antibiyotiğine karşı direnç tespit ettiğini bunu sırasıyla , % 54,04 ile amoksisilin, % 53,61 ile ampisilin, % 43,82 ile sülfonamid, % 37,87 ile trimetoprim, % 37,44 ile trimetoprim-sülfametoksazol ve % 17,87 ile siprofloksasin antibiyotiğine karşı direncin takip ettiğini bildirmiştir (78). ExPEC izolatlarının antibiyotik direnç profilleri arasında farklılıklar örnek tipi (hayvan, gıda, klinik, çevre), örnek sayısı, coğrafik konum ve antibiyotiklerin enfeksiyonların tedavisinde kullanımı ile ilgili nedenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (78,164,168,176).

Bu çalışmada, ExPEC izolatları arasındaki klonal ilişki ERIC-PCR yöntemi ile belirlendi. ERIC-PCR, günümüzde özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan bakterilerin genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde basit, hızlı ve ucuz olması gibi avantajlarından dolayı sıklıkla tercih edilen moleküler teknikler arasında yer almaktadır (12). ERIC-PCR, ExPEC gibi *E. coli* türlerinin klinik, çevre, hayvan ve gıda materyallerinden elde edilen izolatların tiplendirilmesi ve ayırt edilmesinde kullanılmaktadır (18,177-179). Caruso ve ark. (2018) çalışma bulgularımıza benzer şekilde, tavuk, sığır ve domuz eti kaynaklı ExPEC suşlarının ERIC-PCR analizleri sonucunda farklı genotiplere ait olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada ExPEC izolatlarının 19 farklı grup içinde kümelendiğinin tespit edilmiş olması ExPEC izolatlarının farklı kaynaklardan (karkas, deri, rektal, padok, bıçak vb.), farklı tarihlerde ve farklı illerden alınan örnekler olması ile ilişkilendirilebilir. Sarowska ve ark. (2022) farklı materyallerden edilen ExPEC izolatlarının klonal ilişki açısından heterojen dağıldığını ve ExPEC izolatları ile ilişkilendirilmiştir (180). Çalışma

bulgularımız aynı küme içinde bulunanan ExPEC klonlarının benzerliklerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durum deri, rektal ve karkas örnekleri ile personel eli ve bıçak örnekleri arasında çapraz kontaminasyonların olabileceğini düşündürmektedir. Çalışma bulgularımıza benzer şekilde ExPEC'in muhtemel kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesinde ERIC-PCR yönteminin kullanılabileceğini gösteren araştırmalar literatürde bildirilmiştir (12).

7. SONUÇ

Bu çalışma sonuçları besi sığırlarına ait karkas, rektal ve deri örnekleri ile personel eli, bıçak ve padok örneklerinin ExPEC açısından potansiyel bir kontaminasyon kaynağı olabileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle bu örneklerden elde edilen ExPEC izolatlarının çoğunun insan klinik örneklerden tespit edilen ExPEC izolatları ile benzer filogenetik grupta saptanmış olması, besi sığırlarından ve kesimhane ortamından izole edilen ExPEC izolatları ile insan klinik örneklerinden elde edilen ExPEC izolatları arasında da önemli bir ilişkinin olabileceğini göstermektedir. Bu ilişkinin tam anlamı ile açıklanabilmesi için bu alanda daha fazla çalışmanın yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Bu çalışmada ExPEC izolatlarının önemli bir kısmında insanlarda ExPEC enfeksiyonları tedavisinde kullanılan beta-laktam ve florokinolon gibi bazı antibiyotik gruplarına karşı yüksek oranda direnç tespit edilmiş olması, bu antibiyotiklerin kontrolsüz bir şekilde kullanılmının önlenmesine önem verilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu kapsamda potansiyel zoonoz patojenler içinde kabul edilen ExPEC'in tek sağlık çerçevesinde ele alınarak klinik, çevre ve hayvansal materyallerde düzenli aralıklarla yakından takip edilmesi hem bu patojenin epidemiyolojisinin daha yakından tanınmasına imkan verecek hem de halk sağlığı açısından gerekli koruma-kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde önemli katkılar sağlayacaktır.

8. KAYNAKÇA

1. Wolk A. Potential health hazards of eating red meat. J Intern Med. 2017; 281(2): 106-122.

2. Bergeron CR, Prussing C, Boerlin P, Daignault D, Dutil L, Reid-Smith RJ. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. Emerg Infect Dis. 2012; 18(3): 415.

3. Yamaji R, Friedman CR, Rubin J, Suh J, Thys E, McDermott P, et al. A population-based surveillance study of shared genotypes of Escherichia coli isolates from retail meat and suspected cases of urinary tract infections. Msphere. 2018; 3(4): e00179-18.

4. Xia X, Meng J, Zhao S, Bodeis-Jones S, Gaines SA, Ayers SL. et al. Identification and antimicrobial resistance of extraintestinal pathogenic Escherichia coli from retail meats. J Food Prot. 2011; 74(1): 38-44.

5. Manges AR, Johnson, JR. Food-borne origins of Escherichia coli causing extraintestinal infections. Clin Infect Dis. 2012; 55(5): 712-719.

6. Stromberg ZR, Johnson JR, Fairbrother JM, Kilbourne J, Van Goor A, Curtiss 3rd R, et al. Evaluation of Escherichia coli isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. PloS one 2017; 12(7): e0180599.

7. Meena PR, Yadav P, Hemlata H, Tejavath KK, Singh AP. Poultry-origin extraintestinal Escherichia coli strains carrying the traits associated with urinary tract infection, sepsis, meningitis and avian colibacillosis in India. J Appl Microbiol. 2021; 130(6): 2087-2101.

8. Jørgensen SL, Stegger M, Kudirkiene E, Lilje B, Poulsen LL, Ronco T. et al. Diversity and population overlap between avian and human Escherichia coli belonging to sequence type 95. MSphere. 2019; 4(1): e00333-18.

9. Nakamura A, Takahashi H, Arai M, Tsuchiya T, Wada S, Fujimoto Y. et al. Molecular subtyping for source tracking of Escherichia coli using core genome multilocus sequence typing at a food manufacturing plant. Plos one. 2021; 16(12): e0261352.

10. Ramadan H, Jackson CR, Frye JG, Hiott LM, Samir M, Awad A. et al. Antimicrobial resistance, genetic diversity and multilocus sequence typing of Escherichia coli from humans, retail chicken and ground beef in Egypt. Pathogens. 2020; 9(5): 357.

11. Tulcan C, Sokolović M, Popescu S, Hutu I, Marc S, Boldura O M. et al. Assessment of molecular diversity of some potential pathogenic *E. coli* isolated by ERIC-PCR screening. XIII. Simpozij Peradarski Dani 2019. s međunarodnim sudjelovanjem Hrvatska, Poreč, 8.-11. svibnja 2019. Zbornik: 90-97.

12. Alsultan A, Elhadi N. Evaluation of ERIC-PCR method for determining genetic diversity among Escherichia coli isolated from human and retail imported frozen shrimp and beef. Int J Food Contam. 2022; 9(1): 12.

13. Telli AE, Biçer Y, Telli N, Güngör C, Turkal G, Onmaz NE. Pathogenic Escherichia coli and Salmonella spp. in Chicken Carcass Rinses: Isolation and Genotyping by ERIC-PCR. Pak Vet J. 2022; 42(4): 493-498.

14. Banerjee R, Johnson JR. A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of Escherichia coli sequence type 131. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(9): 4997-5004.

15. Erol İ. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti. Yayınları. Ankara. 2007, s: 78.

16. Basavaraju M, Gunashree BS. Escherichia coli: An Overview of Main Characteristics. Escherichia coli. 2022.

17. Gomes TA, Elias WP, Scaletsky IC, Guth BE, Rodrigues JF, Piazza RM. et al. Diarrheagenic escherichia coli. Braz J Microbiol. 2016; 47: 3-30.

18. Pakbin B, Brück WM, Rossen JW. Virulence factors of enteric pathogenic Escherichia coli: A review. Int J Mol Sci. 2021. 22(18): 9922.

19. Enciso-Martínez Y, González-Aguilar GA, Martínez-Téllez MA, González-Pérez CJ, Valencia-Rivera DE, Barrios-Villa E. et al. Relevance of tracking the diversity of Escherichia coli pathotypes to reinforce food safety. Int J Food Microbiol. 2022: 109736.

20. Ezzeroug Ezzraimi A, Hannachi N, Mariotti A, Rolain JM, Camoin-Jau L. Platelets and Escherichia coli: a complex interaction. Biomedicines. 2022; 10(7): 1636.

21. Neter E, Westphal O, Luderitz O, Gino RM, Gorzynski EA. Demonstration of antibodies against enteropathogenic Escherichia coli in sera of children of various ages. Pediatrics. 1995;16:801–807.

22. Cho YS, Koo MS, Jang HJ. Characterization of diarrheagenic Escherichia coli isolated from fresh beef, pork, and chicken meat in korean markets. Microbiology and Biotechnology Letters. 2020; 48(2): 121-128.

23. Mare AD, Ciurea CN, Man A, Tudor B, Moldovan V, Decean L. et al. Enteropathogenic Escherichia coli a summary of the literature. Gastroenterol Insights. 2021; 12(1): 28-40.

24. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic escherichia coli. Nat Rev Microbiol. 2004; 2(2): 123-140.

25. Adorján A, Makrai L, Mag T, Jánosi S, Könyves L, Tóth I. High frequency of multidrug-resistant (MDR) atypical enteropathogenic Escherichia coli (aEPEC) in broilers in Hungary. Front Vet Sci. 2020; 7: 511.

26. Chattaway MA, Jenkins C, Rajendram D, Cravioto A, Talukder KA, Dallman T. et al. Enteroaggregative Escherichia coli have evolved independently as distinct complexes within the *E. coli* population with varying ability to cause disease. PLoS One. 2014; *9*(11): e112967.

27. Hebbelstrup Jensen B, Olsen KE, Struve C, Krogfelt KA, Petersen AM. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative Escherichia coli. Clin Microbiol Rev. 2014; 27: 614–630.4

28. Vilchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Möllby R, Weintraub A. Prevalence of diarrhoeagenic Escherichia coli in children from Leon, Nicaragua. J Med Microbiol. 2009; 58(5): 630-637.

29. Nguyen TV, Le Van P, Le Huy C, Gia KN, Weintraub A. Detection and characterization of diarrheagenic Escherichia coli from young children in Hanoi, Vietnam. J Clin Microbiol. 2005; 43(2): 755-760.

30. Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic Escherichia coli infection. Microbes Infect. 2010; 12(2): 89-98.

31. Fleckenstein JM, Kuhlmann FM. Enterotoxigenic Escherichia coli infections. Curr Infect Dis Rep. 2019; 21: 1-9.

32. Zhang Y, Tan P, Zhao Y, Ma X. Enterotoxigenic Escherichia coli: Intestinal pathogenesis mechanisms and colonization resistance by gut microbiota. Gut Microbes. 2022; 14(1): 2055943.

33. Gupta SK, Keck J, Ram PK, Crump J A, Miller MA, Mintz ED. Part III. Analysis of data gaps pertaining to enterotoxigenic Escherichia coli infections in low and medium human development index countries, 1984–2005. J Epidemiol Infect. 2018; 136(6): 721-738.

34. Duan Q, Xia P, Nandre R, Zhang W, Zhu G. Review of newly identified functions associated with the heat-labile toxin of enterotoxigenic Escherichia coli. Front Cell Infect Microbiol. 2019; 9: 292.

35. Lamberti LM, Bourgeois AL, Fischer Walker CL, Black RE, Sack D. Estimating diarrheal illness and deaths attributable to Shigellae and enterotoxigenic Escherichia coli among older children, adolescents, and adults in South Asia and Africa. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(2): e2705.

36. Shah C, Baral R, Bartaula B, Shrestha LB. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. BMC Microbiol. 2019; 19: 1-6.

37. Michelacci V, Prosseda G, Maugliani A, Tozzoli R, Sanchez S, Herrera-León S. Characterization of an emergent clone of enteroinvasive Escherichia coli circulating in Europe. Clinical Microbiology and Infection. 2016; 22(3): 287-e11.

38. Meza-Segura M, Zaidi MB, Vera-Ponce de León A, Moran-Garcia N, Martinez-Romero E, Nataro JP. et al. New insights into DAEC and EAEC pathogenesis and phylogeny. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10, 572951.

39. Mansan-Almeida R, Pereira AL, Giugliano LG. Diffusely adherent Escherichia coli strains isolated from children and adults constitute two different populations. BMC Microbiol. 2013; 13: 1-14.

40. Lozer DM, Souza TB, Monfardini MV, Vicentini F, Kitagawa SS, Scaletsky IC. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic Escherichia coli strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. BMC Infect Dis. 2013; 13(1): 1-6.

41. Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic Escherichia coli in human medicine. International Journal of Medical Microbiology. 2005; 295(6-7): 405-418.

42. Karmali MA. Infection by Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview. Mol Biotechnol. 2004; 26: 117-122.

43. Rola JG, Osek J. Milk and milk products as a source of food-borne infections caused by Escherichia coli. Med Weter. 2015; 71(2): 84-87.

44. Lee KS, Jeong YJ, Lee MS. Escherichia coli Shiga toxins and gut microbiota interactions. Toxins. 2021; 13(6): 416.

45. Schwidder M, Heinisch L, Schmidt H. Genetics, toxicity, and distribution of enterohemorrhagic Escherichia coli hemolysin. Toxins. 2019; 11(9): 502.

46. Gelalcha BD, Brown SM, Crocker HE, Agga GE, Kerro Dego O. Regulation mechanisms of virulence genes in enterohemorrhagic Escherichia coli. Foodborne Pathog Dis. 2022; 19(9): 598-612.

47. Sarowska J, Futoma-Koloch B, Jama-Kmiecik A, Frej-Madrzak M, Ksiazczyk M, Bugla-Ploskonska G. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from different sources: recent reports. Gut Pathog. 2019; 11: 1-16.

48. Markland SM, LeStrange KJ, Sharma M, Kniel KE. Old Friends in New Places: Exploring the Role of Extraintestinal *E. coli* in Intestinal Disease and Foodborne Illness. Zoonoses Public Health. 2015; 62: 491-496.

49. Wasiński B. Extra-intestinal pathogenic Escherichia coli–threat connected with food-borne infections. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 2019; 26(4): 532-537.

50. Bélanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois CM. Escherichia coli from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2011 62(1): 1-10.

51. Singer RS. Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps. Front Microbiol. 2015; 6: 28.

52. Iranpour D, Hassanpour M, Ansari H, Tajbakhsh S, Khamisipour G, Najafi, A. Phylogenetic groups of Escherichia coli strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. Biomed Res Int. 2015.

53. Bidet P, Bonacorsi S, Clermont O, De Montille C, Brahimi N, Bingen E, et al. Multiple insertional events, restricted by the genetic background, have led to acquisition of pathogenicity island IIJ96-like domains among Escherichia coli strains of different clinical origins. Infect Immun. 2005; 73(7): 4081-4087.

54. Nolan LK, Barnes HJ, Vaillancourt JP, Abdul-Aziz T, Logue CM. Colibacillosis. Diseases of poultry. 2013: 751-805.

55. Kathayat D, Lokesh D, Ranjit S, Rajashekara G. Avian pathogenic Escherichia coli (APEC): an overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies. Pathogens. 2021; 10(4): 467.

56. Kabiswa W, Nanteza A, Tumwine G, Majalija S. Phylogenetic groups and antimicrobial susceptibility patterns of Escherichia coli from healthy chicken in Eastern and Central Uganda. J Vet Med. 2018.

57. Gaschignard J, Levy C, Romain O, Cohen R, Bingen E, Aujard Y, et al. Neonatal bacterial meningitis: 444 cases in 7 years. Pediatr Infect Dis J. 2011; 30(3): 212-217.

58. Mora A, López C, Dabhi G, Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, et al. Extraintestinal pathogenic Escherichia coliO1: K1: H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. BMC Microbiol. 2009; 9(1): 1-11.

59. Blum SE, Heller ED, Sela S, Elad D, Edery N, Leitner G et al. Genomic and phenomic study of mammary pathogenic Escherichia coli. PLoS One. 2015; 10(9): e0136387.

60. Campos FC, Castilho IG, Rossi BF, Bonsaglia ÉC, Dantas ST, Dias RC, et al. Genetic and Antimicrobial Resistance Profiles of Mammary Pathogenic *E. coli* (MPEC) Isolates from Bovine Clinical Mastitis. Pathogens. 2022; 11(12): 1435.

61. Zhang D, Zhang Z, Huang C, Gao X, Wang Z, Liu Y, et al. The phylogenetic group, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of Escherichia coli from clinical bovine mastitis. J Dairy Sci. 2018; 101(1): 572-580.

62. Xavier RGC, da Silva PHS, Trindade HD, Carvalho GM, Nicolino RR, Freitas PMC, et al. Characterization of Escherichia coli in Dogs with Pyometra and

the Influence of Diet on the Intestinal Colonization of Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC). Vet Sci. 2022; 9(5): 245.

63. Hagman R. Pyometra in small animals. Veterinary Clinics: Small Anim Pract. 2018; 48(4): 639-661.

64. Manges AR. Escherichia coli and urinary tract infections: the role of poultry-meat. Clinical Microbiology and Infection. 2016; 22(2): 122-129.

65. Meena PR, Priyanka P, Singh AP. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC) reservoirs, and antibiotics resistance trends: a one-health surveillance for risk analysis from “farm-to-fork”. Lett Appl Microbiol. 2022.

66. Manges AR, Johnson JR. Reservoirs of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management. 2017: 159-177.

67. Platell JL, Cobbold RN, Johnson JR, Heisig A, Heisig P, Clabots C, et al. Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal Escherichia coli isolates from humans and companion animals in Australia. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(8): 3782-3787.

68. Nordstrom L, Liu CM, Price LB. Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. Front Microbiol. 2013; 4: 29.

69. Kallonen T, Brodrick HJ, Harris SR, Corander J, Brown NM, Martin V, et al. Systematic longitudinal survey of invasive Escherichia coli in England demonstrates a stable population structure only transiently disturbed by the emergence of ST131. Genome Res. 2017;27(8):1437–49.

70. Katouli M. Population structure of gut Escherichia coli and its role in development of extra-intestinal infections. Iran J Microbiol. 2010; 2(2):59– 72.

71. Madigan T, Johnson JR, Clabots C, Johnston BD, Porter SB, Slater BS, et al. Extensive household outbreak of urinary tract infection and intestinal

colonization due to extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli sequence type 131. Clin Infect Dis. 2015; Jul 1;61(1): e5–12.

72. Manges AR, Johnson JR. Reservoirs of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management. 2015: 159-177.

73. Ukah UV, Glass M, Avery B, Daignault D, Mulvey MR, Reid-Smith RJ, et al. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant Escherichia coli and development of community-acquired urinary tract infections. Epidemiol Infect. 2018;146(1): 46–57.

74. Rincé A, Balière C, Hervio-Heath D, Cozien J, Lozach S, Parnaudeau S, et al. Occurrence of bacterial pathogens and human noroviruses in shellfishHarvesting areas and their catchments in France. Front Microbiol. 2018; 9(Oct): 2443.

75. Guenther S, Ewers C, Wieler LH. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? 88 Front Microbiol. 2011; 2(DEC): 246.

76. Sukkua K, Pomwised R, Rattanachuay P, Khianngam S, Sukhumungoon P. Characterization of extraintestinal pathogenic Escherichia coli from meat in Southern Thailand. Southeast Asian J Trop Med. Public Health. 2017; 48: 98-108.

77. Riley LW. Distinguishing pathovars from nonpathovars: Escherichia coli. Microbiol Spectr. 2020; *8*(4): 8-4.

78. Boudjerda D, Lahouel M. Virulence and antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from chicken meat, beef, and raw milk. Austral J Vet Sci. 2022; 54(3): 115-125.

79. Priyanka P, Meena PR, Raj D, Rana A, Dhanokar A, Duggirala KS, et al. Urinary tract infection and sepsis causing potential of multidrug-resistant

Extraintestinal pathogenic *E. coli* isolated from plant-origin foods. Int J Food Microbiol. 2023; 386: 110048.

80. Johnson JR, Porter SB, Johnston B, Thuras P, Clock S, Crupain M, et al. Extraintestinal pathogenic and antimicrobial-resistant Escherichia coli, including sequence type 131 (ST131), from retail chicken breasts in the United States in 2013. Appl. Environ. Microbiol. 2017; 83(6): e02956-16

81. Sora VM, Meroni G, Martino PA, Soggiu A, Bonizzi L, Zecconi A. Extraintestinal pathogenic escherichia coli: virulence factors and antibiotic resistance. Pathogens. 2021; 10(11): 1355.

82. Lindberg S, Xia Y, Sondén B, Göransson M, Hacker J, Uhlin BE. Regulatory Interactions among Adhesin Gene Systems of Uropathogenic Escherichia coli. Infect. Immun. 2008; 76: 771–780.

83. Werneburg GT, Thanassi DG. Pili Assembled by the Chaperone/Usher Pathway in Escherichia coli and Salmonella. EcoSal Plus. 2018; 8: 1.

84. Hagan EC, Mobley HLT, Uropathogenic Escherichia coli Outer Membrane Antigens Expressed during Urinary Tract Infection. Infect. Immun. 2007; 75: 3941–3949.

85. Mulvey MA. Adhesion and Entry of Uropathogenic Escherichia coli. Cell. Microbiol. 2002; 4: 257–271.

86. Hou B, Meng XR, Zhang LY, Tan C, Jin H, Zhou R, et al. TolC Promotes ExPEC Biofilm Formation and Curli Production in Response to Medium Osmolarity. BioMed Res. Int. 2014: e574274.

87. Kim KS. Mechanisms of Microbial Traversal of the Blood-Brain Barrier. Nat. Rev. Microbiol. 2008; 6: 625–634.

88. Maruvada R, Kim KS. Ibea and Ompa of Escherichia coli K1 Exploit Rac1 Activation for Invasion of Human Brain Microvascular Endothelial Cells. Infect. Immun. 2012; 80: 2035–2041.

89. Germon P, Chen YH, He L, Blanco JE, Brée A, Schouler C, et al. IbeA, a Virulence Factor of Avian Pathogenic Escherichia coli. Microbiol. Read. Engl. 2005; 151: 1179–1186.

90. Hui C, Guo Y, Li J, Hao X, Cao H, Huang S. Purification of *E. coli* invasin IbeA-binding protein in intestinal epithelial cells. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2009; 29: 2375–2378

91. Su Q, Guan T, Lv H. Siderophore Biosynthesis Coordinately Modulated the Virulence-Associated Interactive Metabolome of Uropathogenic Escherichia coli and Human Urine. Sci. Rep. 2016; 6: 24099.

92. Gao Q, Wang X, Xu H, Xu Y, Ling J, Zhang D, et al. Roles of Iron Acquisition Systems in Virulence of Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli: Salmochelin and Aerobactin Contribute More to Virulence than Heme in a Chicken Infection Model. BMC Microbiol. 2012; 12: 143.

93. Crosa JH, Walsh CT. Genetics and Assembly Line Enzymology of Siderophore Biosynthesis in Bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2002; 66: 223–249.

94. Garénaux A, Caza M, Dozois CM. The Ins and Outs of Siderophore Mediated Iron Uptake by Extra-Intestinal Pathogenic Escherichia coli. Vet. Microbiol. 2011; 153: 89–98.

95. Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK. DNA Sequence of a ColV Plasmid and Prevalence of Selected Plasmid-Encoded Virulence Genes among Avian Escherichia coli Strains. J. Bacteriol. 2006; 188: 745–758.

96. Hantke K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelmann G. Salmochelins, Siderophores of Salmonella Enterica and Uropathogenic Escherichia coli Strains, Are Recognized by the Outer Membrane Receptor IroN. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003; 100: 3677–3682.

97. Dozois CM, Fairbrother JM, Harel J, Bossé M. Pap-and Pil-Related DNA Sequences and Other Virulence Determinants Associated with Escherichia coli

Isolated from Septicemic Chickens and Turkeys. Infect. Immun. 1992; 60: 2648–2656.

98. Garcia EC, Brumbaugh AR, Mobley HLT. Redundancy and Specificity of Escherichia coli Iron Acquisition Systems during Urinary Tract Infection. Infect. Immun. 2011; 79: 1225–1235.

99. Caza M, Lépine F, Dozois CM. Secretion, but Not Overall Synthesis, of Catecholate Siderophores Contributes to Virulence of Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli. Mol. Microbiol. 2011; 80: 266–282.

100. Sukupolvi S, O'Connor CD. TraT Lipoprotein, a Plasmid-Specified Mediator of Interactions between Gram-Negative Bacteria and Their Environment. Microbiol. Rev. 1990; 54: 331–341.

101. Khalid S, Bond PJ, Carpenter T, Sansom MSP. OmpA: Gating and Dynamics via Molecular Dynamics Simulations. Biochim. Biophys. Acta. 2008; 1778: 1871–1880.

102. Teng CH, Xie Y, Shin S, Di Cello F, Paul-Satyaseela M, Cai M, et al. Effects of OmpA Deletion on Expression of Type 1 Fimbriae in Escherichia coli K1 Strain RS218 and on the Association of *E. coli* with Human Brain Microvascular Endothelial Cells. Infect. Immun. 2006; 74: 5609–5616.

103. Krishnan S, Prasadarao NV. Outer Membrane Protein A and OprF: Versatile Roles in Gram-Negative Bacterial Infections. FEBS J. 2012; 279: 919–931.

104. Sukumaran SK, Selvaraj SK, Prasadarao NV. Inhibition of Apoptosis by Escherichia coli K1 Is Accompanied by Increased Expression of BclXL and Blockade of Mitochondrial Cytochrome c Release in Macrophages. Infect. Immun. 2004; 72: 6012–6022.

105. Prasadarao NV, Srivastava PK, Rudrabhatla RS, Kim KS, Huang S, Sukumaran SK. Cloning and Expression of the Escherichia coli K1 Outer Membrane Protein A Receptor, a Gp96 Homologue. Infect. Immun. 2003; 71: 1680–1688.

106. Willis LM, Whitfield C. Structure, Biosynthesis, and Function of Bacterial Capsular Polysaccharides Synthesized by ABC Transporter-Dependent Pathways. Carbohydr. Res. 2013; 378: 35–44.

107. Bushell SR, Mainprize IL, Wear MA, Lou H, Whitfield C, Naismith JH. Wzi Is an Outer Membrane Lectin That Underpins Group 1 Capsule Assembly in Escherichia coli Structure. 2013; 21: 844–853.

108. Sáez-López E, Bosch J, Salvia MD, Fernández-Orth D, Cepas V, Ferrer-Navarro M, et al. Outbreak Caused by Escherichia coli O18: K1: H7 Sequence Type 95 in a Neonatal Intensive Care Unit in Barcelona, Spain. Pediatr. Infect. Dis. J. 2017; 36: 1079–1086.

109. Baldy-Chudzik K, Bok E, Mazurek J. Well-known and new variants of pathogenic Escherichia coli as a consequence of the plastic genome. Postepy Hig. Med. Dosw. 2015; 69: 345–361.

110. Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, et al. Escherichia coli: An Old Friend with New Tidings. FEMS Microbiol. Rev. 2016; 40: 437–463.

111. Shanthalingam S, Srikumaran S. Intact Signal Peptide of CD18, the Beta-Subunit of Beta2-Integrins, Renders Ruminants Susceptible to Mannheimia Haemolytica Leukotoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009; 106: 15448–15453.

112. Morova J, Osicka R, Masin J, Sebo P. RTX Cytotoxins Recognize Beta2 Integrin Receptors through N-Linked Oligosaccharides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008; 105: 5355–5360.

113. Knust Z, Blumenthal B, Aktories K, Schmidt G. Cleavage of Escherichia coli Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Is Required for Full Biologic Activity. Infect. Immun. 2009; 77: 1835–1841.

114. Welch RA. Uropathogenic Escherichia coli Associated Exotoxins. Microbiol. Spectr. 2016: 1-10.

115. Parham NJ, Pollard SJ, Desvaux M, Scott-Tucker A, Liu C, Fivian A, et al. Distribution of the Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae among Extraintestinal Clinical Isolates of Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 4076–4082.

116. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(10): 4555-4558.

117. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The C lermont E scherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep. 2013; 5(1): 58-65.

118. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance the need for global solutions. Lancet Infect Dis. 2013; 13(12): 1057-1098.

119. Cecchini M, Langer J, Slawomirski L. Resistance In G7 Countries And Beyond: Economic Issues , Policies. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2015.

120. Grave K, Torren-Edo J, Mackay D. Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(9): 2037-2040.

121. Tiseo K, Huber L, Gilbert M, Robinson TP, Van Boeckel TP. Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2030. Antibiotics. 2020; 9(12): 918.

122. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.

123. Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, Grace D, et al. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2016; 110(7): 377-380.

124. Caruso G, Giammanco A, Cardamone C, Oliveri G, Mascarella C, Capra G, et al. Extra-intestinal fluoroquinolone-resistant escherichia coli strains isolated from meat. Biomed Res Int. 2018.

125. Pitout JD. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: a combination of virulence with antibiotic resistance. Front Microbiol. 2012; 3: 9.

126. Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic Escherichia coli: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. Foodborne Pathog Dis. 2013; 10(11): 916-932.

127. Ertaş N, Yıldırım Y, Karadal F, Serhat AL. Hayvansal Gıdalarda Escherichia coli O157: H7'nin Önemi. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2013: 10.

128. Guran HS, Vural A, Erkan ME, Durmusoglu H. Prevalence and some virulence genes of Escherichia coli O157 isolated from chicken meats and giblets. Annals of animal science. 2017; 17(2): 555-563.

129. Suzuk S, Avcıküçük H, Kaşkatepe B. In Vitro Activity of Fosfomycin Against Escherichia coli Strains Isolated from Urinary Tract Infection. Flora Infeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi. 2014.

130. Sezgin FM, Nar R. İdrar yolu enfeksiyonu ön tanılı çocuk hastaların idrar kültürü ve idrar analiz sonuçlarının değerlendirilmesi. Pamukkale Tıp Dergisi. 2017; 10(3): 242-248.

131. Beyi AF, Fite AT, Tora E, Tafese A, Genu T, Kaba T, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Escherichia coli O157 in beef at butcher shops and restaurants in central Ethiopia. BMC Microbiol. 2017; 17: 1-6.

132.Nouichi S, Hamdi TM. Superficial bacterial contamination of ovine and bovine carcasses at El-Harrach slaughterhouse (Algeria). Eur. J. Sci. Res. 2009; 38(3): 474-485.

133. Parvej MS, Mamun M, Hassan J, Mahmud MM, Rahman M, Rahman MT, et al. Prevalence and characteristics of Shiga-toxin producing Escherichia coli

(STEC) isolated from beef slaughterhouse. J Adv Vet Anim Res. 2018; 5(2): 218-225.

134. Arthur TM, Bosilevac JM, Brichta-Harhay DM, Guerini MN, Kalchayanand N, Shackelford SD, et al. Transportation and lairage environment effects on prevalence, numbers, and diversity of Escherichia coli O157: H7 on hides and carcasses of beef cattle at processing. J Food Prot. 2007; 70(2): 280-286.

135. Mengistu S, Abayneh E, Shiferaw D. *E. coli* O157: H7 and Salmonella species: public health importance and microbial safety in beef at selected slaughter houses and retail shops in eastern Ethiopia. J Vet Sci Technol. 2017; 8(468): 2.

136. Elsharawy NT, Al-Zahrani HA, El-Waseif AA. Phenotypic and Genotypic Characterization of Antimicrobial Resistance in Escherichia coli Isolates from Chicken Meat. J. Food Nutr. Res. 2022; 10(2): 98-104.

137. Bauzad M, Yuliati FN, Prahesti KI, Malaka R. Total plate count and Escherichia coli in raw buffalo milk in curio district enrekang regency. In IOP Conference Series: Earth Environ Sci. 2019; Vol. 247, No. 1, p. 012027, IOP Publishing.

138. Queipo-Ortuño MI, De Dios Colmenero J, Macias M, Bravo MJ, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. Clin Vaccine Immunol. 2008; 15(2): 293-296.

139. Wang GC, Wang Y. The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. Microbiol. 1996; 142(5): 1107-1114.

140. Johnson JR, Murray AC, Gajewski A, Sullivan M, Snippes P, Kuskowski MA, et al. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic Escherichia coli from retail chicken products. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(7): 2161-2168.

141. Zhu Y, Dong W, Ma J, Yuan L, Hejair H, Pan Z, et al. Characterization and virulence clustering analysis of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from swine in China. BMC Vet Res. 2017; 13(1): 1-10.

142. Mühlberg E, Umstätter F, Kleist C, Domhan C, Mier W, Uhl P. Renaissance of vancomycin: Approaches for breaking antibiotic resistance in multidrug-resistant bacteria. Can J Microbiol. 2020; *66*(1): 11-16.

143. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 1991; 19: 6823–6831.

144. Garcia-Vallve S, Palau J, Romeu A. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in Escherichia coli and Bacillus subtilis. Mol. Bio. Evo. 1999; 16(9):1125-1134.

145. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. Nucleic Acids Res. 2019.

146. Xia F, Jiang M, Wen Z, Wang Z, Wang M, Xu Y, et al. Complete genomic analysis of ST117 lineage extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC) to reveal multiple genetic determinants to drive its global transmission: ST117 *E. coli* as an emerging multidrug-resistant foodborne ExPEC with zoonotic potential. Transbound Emerg Dis. 2022.

147. Saidenberg ABS, Van Vliet AH, Stegger M, Johannesen TB, Semmler T, Cunha M, et al. Genomic analysis of the zoonotic ST73 lineage containing avian and human extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC). Vet Microbiol. 2022; 267: 109372.

148. Manges AR, Geum HM, Guo A, Edens TJ, Fibke CD, Pitout JD. Global extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC) lineages. Clin Microbiol Rev. 2019; 32(3): e00135-18.

149. Meena PR, Priyanka P, Singh AP. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC) reservoirs, and antibiotics resistance trends: a one-health surveillance

for risk analysis from “farm-to-fork”. Lett Appl Microbiol. 2023; 76(1): ovac016

150. Schmidt JW, Agga GE, Bosilevac JM, Brichta-Harhay DM, Shackelford SD, Wang R, et al. Occurrence of antimicrobial-resistant Escherichia coli and Salmonella enterica in the beef cattle production and processing continuum. Appl Environ Microbiol. 2015; 81(2): 713-725.

151. Vázquez-Villanueva J, Vázquez K, Martínez-Vázquez AV, Wong-González A, Hernández-Escareño J, Cabrero-Martínez O, et al. Molecular and antimicrobial susceptibility characterization of Escherichia coli isolates from bovine slaughterhouse process. Antibiotics. 2023; 12(2): 291.

152. Hassan J, Parvej MS, Rahman MB, Khan MSR, Rahman MT, Kamal T, et al. Prevalence and characterization of Escherichia coli from rectal swab of apparently healthy cattle in Mymensingh, Bangladesh. Microbes and Health. 2014; 3(1): 12-14.

153. Ogunleye AO, Okunlade AO, Jeminlehin FO, Ajuwape ATP. Antibiotic resistance in Escherichia coli isolated from healthy cattle at a major cattle market in Ibadan, Oyo State, South Western, Nigeria. Afr J Microbiol Res. 2013; 7(37): 4572-4575.

154. Fikadu Y, Kabeta T, Diba D, Waktole H. Antimicrobial Profiles and Conventional PCR Assay of Shiga Toxigenic Escherichia coli O157: H7 (STEC) Isolated from Cattle Slaughtered at Bedele Municipal Abattoir, South West Ethiopia. Infect Drug Resist. 2023; 521-530.

155. Alvseike O, Røssvoll E, Røtterud OJ, Nesbakken T, Skjerve E, Prieto M, et al. Slaughter hygiene in European cattle and sheep abattoirs assessed by microbiological testing and Hygiene Performance Rating. Food Control. 2019; 101: 233-240.

156. Taha ZM, Yassin NA. Prevalence of diarrheagenic Escherichia coli in animal products in Duhok province, Iraq. Iran J Vet Res. 2019; 20(4): 255.

157. Fasanmi OG, Makinde GEO, Popoola MA, Fasina OF, Matere J, Ogundare ST. Potential risk factors associated with carcass contamination in slaughterhouse operations and hygiene in Oyo state, Nigeria. International Journal of Livestock Production. 2018; 9(8): 211-220.

158. Gutema FD, Abdi RD, Agga GE, Firew S, Rasschaert G, Mattheus W, et al. Assessment of beef carcass contamination with Salmonella and *E. coli* O 157 in slaughterhouses in Bishoftu, Ethiopia. Int J Food Contam. 2021; 8: 1-9.

159. Abayneh M, Tesfaw G, Woldemichael K, Yohannis M, Abdissa A. Assessment of extended-spectrum β-lactamase (ESBLs)–producing Escherichia coli from minced meat of cattle and swab samples and hygienic status of meat retailer shops in Jimma town, Southwest Ethiopia. BMC Infect Dis. 2019; 19(1): 1-8.

160. Sugrue I, Tobin C, Ross RP, Stanton C, Hill C. Foodborne pathogens and zoonotic diseases. In Raw milk (pp. 259-272). Academic Press. 2019.

161. Abebe E, Gugsa G, Ahmed M. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. J Trop Med. 2020.

162. Aslam M, Toufeer M, Bravo CN, Lai V, Rempel H, Manges A, et al. Characterization of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada. Int J Food Microbiol. 2014; 177: 49-56.

163. Santo E, Rodolpho D, Marin JM. Presence of extraintestinal pathogenic Escherichia coli in butcheries in Taquaritinga, SP, Brazil. Braz J Microbiol. 2007; 38: 591-593.

164. Lyhs U, Ikonen I, Pohjanvirta T, Raninen K, Perko-Mäkelä P, Pelkonen S. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli in poultry meat products on the Finnish retail market. Acta Vet Scand. 2012; 54: 1-6.

165. Ghodousi A, Bonura C, Di Carlo P, van Leeuwen WB, Mammina, C. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli sequence type 131 H30-R and H30-

Rx subclones in retail chicken meat, Italy. Int J Food Microbiol. 2016; 228: 10-13.

166. Micenková L, Bosák J, Vrba M, Ševčíková A, Šmajs D. Human extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains differ in prevalence of virulence factors, phylogroups, and bacteriocin determinants. BMC Microbiol. 2016; 16: 1-8.

167. Müller A, Stephan R, Nüesch-Inderbinen M. Distribution of virulence factors in ESBL-producing Escherichia coli isolated from the environment, livestock, food and humans. Sci Total Environ. 2016; 541: 667-672.

168. Zou M, Ma PP, Liu WS, Liang X, Li XY, Li YZ, et al. Prevalence and antibiotic resistance characteristics of extraintestinal pathogenic Escherichia coli among healthy chickens from farms and live poultry markets in China. Animals. 2021; 11(4): 1112.

169. Bhave S, Kolhe R, Mahadevaswamy R, Bhong C, Jadhav S, Nalband S, et al. Phylogrouping and antimicrobial resistance analysis of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from poultry species. Turk J Vet Anim Sci. 2019; 43(1): 117-126.

170. Maluta RP, Logue CM, Casas MRT, Meng T, Guastalli EAL, Rojas TCG, et al. Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra-intestinal pathogenic (ExPEC) Escherichia coli isolated in Brazil. PloS one. 2014; 9(8): e105016.

171. Chakraborty A, Saralaya V, Adhikari P, Shenoy S, Baliga S, Hegde, A. Characterization of Escherichia coli phylogenetic groups associated with extraintestinal infections in South Indian population. Ann Med Health Sci Res. 2015; 5(4): 241-246.

172. Tayh G, Elmanama A, Selmi R, Slama KB. Antibiotic resistance profile and molecular characterization of extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC) from human clinical samples in gaza strip, palestine. Lett Appl Microbiol. 2023; 76(1): ovac033.

173. Chellat MF, Raguž L, Riedl R. Targeting antibiotic resistance. Angewandte Chemie International Edition. 2016; 55(23): 6600-6626.

174. Frieri M, Kumar K, Boutin, A. Antibiotic resistance. J Infect Public Health. 2017; 10(4): 369-378.

175. Kalyoncu BN, Koçoğlu E, Özekinci T, Biçer RT, Aydın G, Önder N, et al. İstanbul'da Bir Şehir Hastanesinde İzole Edilen Üriner Sistem Patojenleri Ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Değerlendirilmesi. Ankem Dergisi. 2023; 37(1): 18-27.

176. Rayasam SD, Ray I, Smith KR, Riley LW. Extraintestinal pathogenic escherichia coli and antimicrobial drug resistance in a maharashtrian drinking water system. Am J Trop Med Hyg. 2019; 100(5): 1101.

177. Ateba CN, Mbewe M. Genotypic characterization of Escherichia coli O157: H7 isolates from different sources in the north-west province, South Africa, using enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR analysis. Int J Mol Sci. 2014; 15(6): 9735-9747.

178. Fendri I, Ben Hassena A, Grosset N, Barkallah M, Khannous L, Chuat V, et al. Genetic diversity of food-isolated Salmonella strains through pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR). PLoS One. 2013; 8(12): e81315.

179. Gautam H, Maheshwari B, Mohapatra S, Sood S, Dhawan B, Kapil A, et al. Clonal relationship among Acinetobacter baumannii isolates from different clinical specimens by ERIC-PCR. Int J Infect Dis. 2022; 116: s18-s19.

180. Sarowska J, Olszak T, Jama-Kmiecik A, Frej-Madrzak M, Futoma-Koloch B, Gawel A, et al. Comparative characteristics and pathogenic potential of Escherichia coli isolates originating from poultry farms, retail meat, and human urinary tract infection. Life. 2022; 12(6): 845.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Reşat	**Soyadı**	ÇİFTÇİ
Doğum Yeri		**Doğum Tarihi**	
Uyruğu		**Tel**	
E-posta			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora/Uzmanlık	Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Gıda Hijyeni ve Teknolojisi	2023
Tezli Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi	2017
Tezsiz Yüksek Lisans		
Lisans	Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2009
Lise		

İş Deneyimi

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**

Yabancı Dil Sınav Notu								
KPDS/ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

10. EKLER

10.1. Doktora için makale şartı

The current issue and full text archive of this journal is available on Emerald Insight at:
https://www.emerald.com/insight/0007-070X.htm

BFJ
122,4

1238

Received 21 October 2019
Revised 26 December 2019
6 January 2020
Accepted 7 January 2020

Prevalence of antibiotic-resistant *Salmonella* in retail organic chicken

Husnu Sahan Guran
Department of Food Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, Dicle University, Diyarbakir, Turkey
Resat Ciftci
Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry, Batman Directorate of Provincial Agriculture and Forestry, Batman, Turkey
Nafia Canan Gursoy
Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Inonu University, Malatya, Turkey
Tuncer Ozekinci
Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Istanbul Medeniyet University, Istanbul, Turkey, and
Walid Q. Alali
Department of Epidemiology and Biostatistics, Faculty of Public Health, Kuwait University, Kuwait

Abstract

Purpose – The objective of this study was to determine *Salmonella* prevalence, antimicrobial-resistant phenotypes, and their genetic relatedness in frozen organic chicken collected at retail level in Turkey.

Design/methodology/approach – Retail packs (n = 348) of cut-up chicken parts (breast, leg quarter and drumstick) and whole chicken carcasses were purchased from a central hypermarket in Diyarbakir (Southeast Anatolia Region in Turkey) and from a large online retailer in Turkey. The retail packs were paired by part type, brand, production date, and sell-by date. The chicken samples were analyzed for the presence of *Salmonella* spp., and then isolates were screened for antibiotic susceptibility, class I integron, and genetic similarity.

Findings – *Salmonella* prevalence in retail frozen organic chicken samples was 6.3 percent; however, the prevalence by parts, leg quarter, drumstick, breast, and whole chicken was 2.1 percent, 10.4 percent, 10.4 percent, and 0 percent, respectively. *Salmonella* prevalence was significantly higher in samples obtained from the hypermarket (9.2 percent) compared to online retailer (3.8 percent). All the isolates were serotype Infantis, genetically similar (highly clonal), and 68.2 percent harbored class I integron. All isolates were resistant to ciprofloxacin (drug of choice to treat salmonellosis in human), and 86.3 percent of the isolates were multidrug-resistant.

Originality/value – *Salmonella* prevalence in organic chicken meat, regardless of the retail market source in Turkey, may pose a health risk to consumers especially with the high prevalence of multi-drug resistant phenotypes. Findings inform researchers and the public about the safety of organically produced chicken and the potential health risk to consumers.

Keywords *Salmonella*, Organic chicken, Antibiotic resistance, Class 1 integrons, Turkey

Paper type Research paper

British Food Journal
Vol. 122 No. 4, 2020
pp. 1238-1251
© Emerald Publishing Limited
0007-070X
DOI 10.1108/BFJ-10-2019-0790

The authors would like to thank Professor Baris Otlu for his help in performing PFGE. We respectfully dedicate this manuscript to Dr. Nafia Canan Gursoy, who passed away after this study was completed. Her kindness and inspiring spirit are not forgotten. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

11. ORİJİNALLİK RAPORU



Tez

ORİJİNALLİK RAPORU

%9	%11	%5	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
2	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	%2
3	www.wjgnet.com İnternet Kaynağı	%1
4	openaccess.firat.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
5	mdpi-res.com İnternet Kaynağı	%1
6	papyrus.bib.umontreal.ca İnternet Kaynağı	%1
7	ueaeprints.uea.ac.uk İnternet Kaynağı	%1