

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

IRAK'IN THİ-QAR EYALETİNDEKİ HASTALARDAN İZOLE EDİLEN
ESCHERİCHİA COLİ'DE SHİGATOXİN GENİNİN MOLEKÜLER TESPİTİ

Talal Hasan Jaber ALFKAWI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2024

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Talal Hasan Jaber ALFKAWI tarafından hazırlanan “**Irak'ın Thi-Qar Eyaletindeki Hastalardan İzole Edilen *Escherichia Coli*'de Shigatoxin Geninin Moleküler Tespiti**” adlı tez çalışması 10/07/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Seçil Akıllı ŞİMŞEK

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Hanaa Daaj Khalaf AL-MOZAN

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç.Dr. İlkay ÇORAK ÖCAL
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Efehan ULAŞ
Biyoistatistik ve Temel Tıp Bilişimi Anabilim Dalı
Kırklareli Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Neslihan BAL
Biyoloji Anabilim Dalı
Gazi Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “**Irak'ın Thi-Qar Eyaletindeki Hastalardan İzole Edilen *Escherichia Coli*'de Shigatoxin Geninin Moleküler Tespiti**” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (10/07/2024).

Talal Hasan Jaber ALFKAWI

ÖZET

Doktora Tezi

IRAK'IN THİ-QAR EYALETİNDEKİ HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *ESCHERİCHİA COLİ*'DE SHİGATOXİN GENİNİN MOLEKÜLER TESPİTİ

Talal Hasan Jaber ALFKAWI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Seçil Akıllı ŞİMŞEK

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hanaa Daaj Khalaf AL-MOZAN

Escherichia coli, hem avantajlı hem de dezavantajlı olabilen bir üne sahip bir bakteridir. Bazı türleri bağırsak sağlığını korumak için çok önemliyken, diğerleri ciddi hastalıklara neden olma potansiyeline sahiptir. Patojenik *Escherichia coli*'nin endişe verici bir özelliği, antibiyotiklere karşı artan dirençleri ve biyofilm oluşturma konusundaki güçlü eğilimleridir. *Escherichia coli* bakterileri sık kullanılan antibiyotiklere karşı giderek artan bir direnç göstermektedir. Bu sorunun ana nedeni esasen hem insanlarda hem de hayvanlarda aşırı ve yanlış antibiyotik kullanımıdır. *Escherichia coli*, toplanma ve biyofilm olarak bilinen yapışkan, mukoza benzeri kaplamalar oluşturma yeteneğine sahiptir. Biyofilmler, mikropları yok etmek için antibiyotiklerin ve bağışıklık sisteminin erişimini engelleyen kaleler olarak hizmet eder. Biyofilmler antibiyotik direnci sorununu daha da kötüleştirir. Bir biyofilmin kompakt yapısı, antibiyotiklere dirençli bakterilerin hayatta kalması için elverişli bir ortam sağlayarak onları bu ilaçların etkisinden korur. *Escherichia coli* bakterisinin bazı türleri tarafından sentezlenen Shiga toksini, gıda kaynaklı hastalıklar alanında çok güçlü bir antagonisttir. Shiga toksin ailesi iki ana varyanttan oluşmaktadır: Stx1 ve Stx2, her ikisi de insan vücuduna önemli ölçüde zarar verme potansiyeline sahiptir. Shiga toksini üreten *Escherichia coli* olarak bilinen spesifik varyantlar, O157 gibi bu zararlı toksinleri üretebilir. H7, hastalığa neden olma eğilimi ile iyi bilinmektedir. Bazı *Escherichia coli* suşları, hastalığa neden olmaya yardımcı olan zararlı virülans faktörleri, proteinler ve yapılar koleksiyonuna sahiptir. Bunlar arasında hareket için kullanılan kıl benzeri yapılar olan flagella üreten, bağışıklık sisteminden kaçan ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunan flic genleri yer almaktadır. Biyofilmler tedaviye karşı direnci artırabilir. HlyA geni, kırmızı kan hücrelerini parçalama yeteneğine sahip olan hemolizin A olarak bilinen bir toksinin üretilmesinden sorumludur. Bu süreç, bir enfeksiyon oluştuğunda doku hasarına ve iltihaplanmaya yol açar. Ek olarak, konağın immünolojik tepkisini bozma potansiyeline sahiptir. Dahası, rfb-o157 genleri, dış zarın bir bileşenini oluşturan ve konakçı bağışıklık sistemiyle etkileşim de dahil olmak üzere birçok role hizmet eden farklı bir lipopolisakkarit formunun sentezlenmesinden sorumludur. Bu çalışmada, Nasiriye Eğitim Hastanesi'nde ishal ve idrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan 250 klinik örnek, tek kullanımlık steril idrar ve dışkı kapları kullanılarak toplanmıştır. Tüm örnekler zengin besiyerinde (Kanlı agar) üretilmiş, daha sonra sadece

Gram-negatif bakterileri üretmek için diferansiyel ve seçici besiyerinde (MacConkey agar) kültürlenmiş ve ardından tüm Gram-negatif pozitif kültürler, sadece *E. coli* izolatlarını izole etmek için bir dizi biyokimyasal test kullanılarak değerlendirilmiştir. Tanımlamanın doğrulanması ve antibiyotik direnç profilinin incelenmesinin ardından otomatik VITEK Kompakt-2 sistemi kullanılmıştır. *E. coli* O157:H7 izolatını diğer *E. coli* izolatlarından ayırmak için tüm izolatlar diferansiyel besiyerinde (Sorbitol agar) kültüre alınmıştır. *Saccharomyces bulradii* sabouraud dekstroz üzerinde büyütülmüş ve daha sonra *E. coli* genlerinin ekspresyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla bakteriyel besiyerine eklenmiştir. Bakterilerin biyofilm oluşturma kapasitesi mikrotiter plaka yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Tüm virülans genleri geleneksel bir polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak tespit edilmiş ve daha sonra jel elektroforezi ile tespit edilmiştir. Shiga toksinleri genlerinin ekspresyonu, niceliksel bir gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak tahmin edilmiştir. *E. coli* filogenisi, 16S rRNA çıkarıldıktan sonra analiz edilmiştir. En yüksek *E. coli* O157:H7 ile enfekte hasta sayısı 6 (%46,20) 21-30 yaş grubuyla ilişkilendirilirken, (11-20 ve 41-50 yaş gruplarında daha düşük enfeksiyonlu hastalar tespit edilmiştir. O157:H7 olmayan hastaların aksine, en yüksek sayı 11-20 yaş grubunda 11 (%91,7) iken, ≤ 10 ve 31-40 yaş grupları daha düşüktür. *E. coli* H7 ile enfekte ve enfekte olmayan hastalarda kadın sayısı sırasıyla 15 (%40,5) ve 22 (%59,5), erkeklerde ise 5 (%25) ve 15 (%75) olarak tespit edilmiştir. 250 idrar ve dışkı örneğinden yalnızca 29'unda (%50,88) idrar ve 28'inde (%49,12) *E. coli* pozitifliği saptanmış ve 37'sinde (%64,90) sorbitol fermente edilmiş, 20'sinde (%35,10) ise sorbitol fermente edilmemiştir. Hemoliz yeteneğine göre, 19 (%33,30) ve 11 (%19,30) örnek hemoliz yeteneğinin alfa ve beta modellerine sahipken, 27 örnek (%47,40) hemoliz yeteneğinin gama modeline sahiptir. STX1, STX2, rfo157 ve hlyA gen frekansları 19'unda (%33,30) pozitif, 38'inde (%66,70) negatiftir. fliC geni 37'sinde (%64,90) pozitif ve 20'sinde (%35,10) negatif iken, izolatların çoğunluğu, 48'i (%54,21), biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir ve 11'i (%19,30) zayıf, 16'sı (%28,07) güçlü ve 21'i (%36,84) orta derecede olarak sınıflandırılmıştır. En yüksek direnç seviyesi amikasinine karşı iken, en düşük direnç seviyeleri piprasilin, tazobaktam ve tobramisine karşıdır. STX1 gen ifadesinin kat değişimi *Saccharomyces bulradii* eklendikten sonra daha düşüktür (3.96) ve STX2 gen ifadesinde *Saccharomyces bulradii* eklendikten sonra iki kat daha düşük bir değişim (0.11) belirlenmiştir. Filogeniye göre, tüm *E. coli* 16S rRNA dizilerimiz tamamen aynıdır (%100). NCBI referanslarıyla karşılaştırıldığında ise %99,63 ile %100 arasında değişen yüksek bir özdeş dizi oranı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *E. coli* yüksek düzeyde virülans ve antibiyotik direnci göstermiştir; ancak *Saccharomyces bulradii*, Shiga-toksin gen ekspresyonunu etkilemede önemli bir role sahiptir ve bu maya farklı kronik ve akut *E. coli* enfeksiyon hastalıklarına dahil edilebilir.

2024, 97 sayfa

ANAHTAR KELİMELE: *Escherichia coli*, 16S rRNA geni, Shiga toksin geni, Polimeraz zincir reaksiyonu, Antibiyotik direnci

ABSTRACT

PhD Thesis

MOLECULAR DETECTION OF SHIGATOXIN GENE IN *ESCHERICHIA COLI*
ISOLATED FROM PATIENTS IN THI-QAR PROVINCE, IRAQ

Talal Hasan Jaber ALFKAWI

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

Advisor: Prof. Dr. Seçil Akıllı ŞİMŞEK

Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Hanaa Daaj Khalaf AL-MOZAN

Escherichia coli is a bacterium that has a reputation that may be both advantageous and disadvantageous. Certain types are crucial for maintaining gut health, while others have the potential to cause severe illnesses. An alarming characteristic of these pathogenic *Escherichia coli* is their increasing resistance to antibiotics and their strong inclination to build biofilms. *Escherichia coli* bacteria have shown a growing resistance to frequently used antibiotics. The main cause of this issue is essentially the excessive and incorrect use of antibiotics in both people and animals. *Escherichia coli* can aggregate and create cohesive, mucous-like coatings known as biofilms. Biofilms serve as strongholds, impeding the access of antibiotics and the immune system to eradicate the germs. Biofilms exacerbate the problem of antibiotic resistance. The compact nature of a biofilm provides a conducive environment for the survival of bacteria that are resistant to antibiotics, shielding them from the impact of these drugs. Shiga toxin, which is synthesized by some strains of *Escherichia coli* bacteria, is a very powerful antagonist in the realm of foodborne diseases. The Shiga toxin family consists of two primary variants: Stx1 and Stx2, both of which have the potential to cause significant harm to the human body. Specific variants, known as Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, can generate these detrimental toxins, such as O157. H7 is well known for its propensity to induce sickness. Some strains of *Escherichia coli* possess a harmful collection of virulence factors, proteins, and structures that aid in causing disease. These include flic genes that produce flagella, which are hair-like structures used for movement, evading the immune system, and contributing to the formation of biofilms. Biofilms can increase resistance to treatment. The *hlyA* gene is responsible for producing a toxin known as hemolysin A, which can break down red blood cells. This process leads to tissue damage and inflammation when an infection occurs. Additionally, it has the potential to impair the immunological response of the host. Moreover, the *rfb-o157* genes are accountable for synthesizing a distinct form of lipopolysaccharide, which constitutes a component of the outer membrane and serves many roles, including engagement with the host immune system. During this cross-sectional study, 250 clinical samples from patients at Nasiriyah Teaching Hospital with diarrhea and urinary tract infections were collected using disposable sterile urine and stool containers. All samples were grown on rich media (Blood agar), then cultured on differential and selective media (MacConkey agar) to grow only Gram-negative bacteria, and then all Gram-negative positive cultures were evaluated

by using a series of biochemical tests to isolate only *E. coli* isolates. Following confirmed identification and investigation of the antibiotic resistance profile, the automated VITEK compact-2 system was used. To differentiate the *E. coli* O157:H7 isolate from other *E. coli* isolates, all isolates were cultured on differential media (Sorbitol agar). The *Saccharomyces bulradii* were growing on sabouraud dextrose and then added to the bacterial broth in order to evaluate their effects on the expression of *E. coli* genes. The biofilm formation capacity of bacteria was determined using microtiter plate methods. All virulence genes were detected using a conventional polymerase chain reaction and then detected by gel electrophoresis. The expression of Shiga toxins genes was estimated using a quantitative real-time polymerase chain reaction. The *E. coli* phylogeny was analyzed after extracting 16S rRNA and sent to a determined sequencing Microgene company in Korea. The highest number of *E. coli* O157:H7-infected patients 6 (46.20%) was associated with the age group 21–30 years, while both age groups (11–20 and 41–50 years) were associated with lower-infected patients (8.3% and 14.3%, respectively). In contrast to the non-O157:H7 patients, the highest number was 11 (91.7%) in the age group 11–20 years, while the age groups ≤ 10 and 31–40 years were associated with a lower number of 4 (50% and 44.4%), respectively. The female numbers were higher 15 (40.5%) and 22 (59.5%) among *E. coli* H7-infected and *E. coli* NON-infected patients, respectively, compared to male numbers of 5 (25%) and 15 (75%), among the same groups. Among 250 urine and stool samples, only 29 (50.88%) urine and 28 (49.12%) stool samples were positive for *E. coli*, and only 37 (64.90%) had the ability to sorbitol ferment, while 20 (35.10%) did not. According to hemolysis ability, 19 (33.30%) and 11 (19.30%) had alpha and beta patterns of hemolysis ability, while 27 (47.40%) had a gamma pattern of hemolysis ability. The STX1, STX2, rfo157, and hlyA gene frequencies were positive among 19 (33.30%) and negative among 38 (66.70%). While the fliC gene was positive among 37 (64.90%) and negative among 20 (35.10%), Most isolates, 48 (54.21%), had the ability to form biofilm, categorized as follows: 11 (19.30%) of isolates had weak ability, 16 (28.07%) had strong ability, and 21 (36.84%) had moderate ability to form biofilm. The highest resistance level was against amikacin, while the lowest resistance levels were against piperacillin, tazobactam, and tobramycin. The fold change of STX1 gene expression was lower (3.96) after adding *saccharomyces bulradii*, and there was a two-fold lower change in STX2 gene expression (0.11) after adding *saccharomyces bulradii*. According to phylogeny, all our *E. coli* 16S rRNA sequences were completely identical (100%). While, when compared with NCBI references, there was a high identical sequence rate ranging from 99.63% to 100%. In conclusion, *E. coli* showed high levels of virulence and antibiotic resistance; however, *Saccharomyces bulradii* has a crucial role in influencing Shiga-toxin gene expression, and this yeast may be incorporated in different chronic and acute *E. coli* infection diseases.

2024, 97 pages

Keywords: *Escherichia coli*, 16S rRNA gene, Shiga toxin gene, Polymerase chain reaction, Antibiotic resistance

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Prof. Dr. Seçil Akıllı ŞİMŞEK'e sabrı, rehberliği ve anlayışı için teşekkür ederim.

Talal Hasan Jaber ALFKAWI

Çankırı, Temmuz 2024



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	5
2.1 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	5
2.2 Yetiştirme Ortamı	6
2.3 Antijenik Yapı	7
2.4 Epidemiyoloji.....	8
2.5 Patogenez	9
2.6 Antibiyotik Direnci	10
2.7 Antibiyotik Direnci Nedenleri.....	10
2.7.1 Genetik mutasyon	11
2.7.2 Genetik materyallerin transferi.....	11
2.7.3 Seçici baskı	12
2.7.4 Yanlış teşhis.....	12
2.7.5 Uygunsuz antibiyotik reçetesi.....	12
2.7.6 Kendi kendine ilaç tedavisi	12
2.7.7 Aşırı veya yetersiz antibiyotik tedavisi	13
2.7.8 Hastane ortamının kontaminasyonu.....	13
2.7.9 Tarımda geniş kullanım alanı.....	13
2.7.10 Antibiyotik bulunabilirliğinin az olması	14
2.8 Antibiyotik Direnci Mekanizmaları	14
2.8.1 Antibiyotik alımının sınırlandırılması	14
2.8.2 Antibiyotik akışı.....	15

2.8.4 Antibiyotik hedeflerinin değiştirilmesi	16
2.9 Biyofilm Oluşumu	17
2.9.1 Geri dönüşümlü bağlanma	17
2.9.2 Geri döndürülemez bağlantı.....	18
2.9.3 Olgunlaşma.....	19
2.9.4 Dağılım.....	19
2.10 Shiga Toksini Üreten <i>E. coli</i>	20
2.11 Shiga Toksini Üreten <i>E. coli</i> İnsan Enfeksiyonunun Kaynağı.....	21
2.11.1 Kontamine olmuş az pişmiş sığır eti ürünleri.....	21
2.11.2 Kirlenmiş taze ürünler.....	22
2.11.3 Çevre aracılı iletim	22
2.11.4 Doğrudan temas	23
2.12 Shiga Toksini Üreten <i>E. coli</i> 'nin Virülansı ve Patogenezi.....	23
2.12.1 Shiga toksini.....	23
2.12.2 Enterositin efasman lokusunun yapışıklıkları.....	25
2.12.3 Asit toleransı.....	26
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1 Materyal	27
3.1.1 Aletler ve teçhizat	27
3.1.2 Kimyasal malzemeler	28
3.1.3 Kitler	28
3.1.4 Kültür medya	29
3.1.5 Primerler	29
3.2 Yöntem	30
3.2.1 Çalışma tasarım, biyogüvenlik ve dezenfeksiyon	30
3.2.2 Örneklerin toplanması ve işlenmesi	31
3.2.3 Bakteriyel izolatların korunması	31
3.2.4 Kültür ortamının hazırlanması	31
3.2.5 Bakteri izolatlarının geleneksel yöntemlerle izolasyonu ve tanımlanması.....	32
3.2.6 VITEK-2 sistemi kullanılarak bakteri izolatlarının tanımlanmasının doğrulanması ve antibiyotik direnç profilinin belirlenmesi	35
3.2.7 Mikrotiter plaka yöntemleri kullanılarak bakteri izolatları arasında biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesi.....	35

3.2.8 Moleküler çalışma.....	36
3.2.9 Saccharomyces mayasının hazırlanması	41
3.2.10 RNA ekstraksiyonu	42
3.2.11 Ekstrakte edilen toplam RNA'nın tahmini.....	43
3.2.12 DNaz tedavisi.....	44
3.2.13 Ters transkripsiyon (cDNA).....	44
3.2.14 qRT-PCR	45
3.2.15 Filogenetik ağaç.....	46
3.2.16 İstatistiksel analiz.....	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	47
4.1 Hastaların Özellikleri.....	47
4.2 Örneklerin Dağılımı	49
4.3 Sorbitol Fermantasyonu	50
4.4 O157:H7 E. coli Suşlarının Sıklığı	52
4.5 Bakteri İzolatlarının Hemoliz Paternleri	54
4.6 Virülans Gen Sıklığı.....	55
4.7 Biyofilm Oluşturma Yeteneği.....	61
4.8 Antibiyotiklere Karşı Direnç Profili.....	62
4.9 STX1 ve STX2'nin Gen İfadesi	64
4.10 E. coli İzolatlarının Filogenetiği.....	69
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ.....	97

SİMGELER DİZİNİ

g	Gram
Kb	Kilo Dalton
μL	Mikro litre
mL	Mililitre
mg	Milli gram
nm	Nano metre
pmol	Pico molar



KISALTMALAR DİZİNİ

16sRNA	16 ribozomal Ribonükleik asit
AMR	Antimikrobiyal direnç
ABC	ATP-bağlayıcı kaset
MFS	Büyük kolaylaştırıcı süper ailesi
MDR	Çoklu ilaç direnci
DNA	Deoksi ribonükleik asit
RND	Direnç-nodülasyon-hücre bölünmesi
DAEC	Diyarejenik <i>Escherichia coli</i>
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
A/E	Ekleme ve çıkarma
ExPEC	Ekstraintestinal Patojenik <i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplazmik retikulum
EAEC	Enteroagregatif <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>
LEE	Enterosit efasmanının lokusu
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F-pili	Famberial-pili
H	Flagella antijeni
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
HUS	hemolitik üremik sendrom
H ₂ S	Hidrojen sülfür
KOH	Hidroksit potasyum
UTIs	İdrar yolu enfeksiyonları
K	Kapsüler antijen
SMR	Küçük çoklu ilaç direnci
sRNA	Küçük Ribonükleik asit
MacB	Makrolid sınıf B
OD	Optik yoğunluk
PBP's	Penisilin bağlayıcı proteinler
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
STX	Shiga toksini
STPE	Shiga-toksin üreten <i>Escherichia coli</i>
O	Somatik antijen
tRNA	Taşıyıcı- Ribonükleik asit
Tri	Transloke intimin reseptörü
TAE	Tris-asetat-EDTA
UV	Ultra-viyole
AIEC	Yapışık-İnvaziv <i>Escherichia coli</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Escherichia coli</i> 'nin morfolojisi (Köhler and Dobrindt 2011)	5
Şekil 2.2 Antijenik <i>E. coli</i> 'nin yapısı (Basavaraju and Gunashree 2023)	7
Şekil 2.3 <i>E. coli</i> 'nin tersinir bağlanması (Ballén <i>et al.</i> 2022).....	17
Şekil 2.4 Biyofilm olgunlaşması (Ballén <i>et al.</i> 2022).....	19
Şekil 2.5 <i>E. coli</i> 'nin biyofilm dağılımı (Ballén <i>et al.</i> 2022).....	20
Şekil 4.1 Örneklerin dağılımı.....	49
Şekil 4.2 A: sabouraud agarda <i>Sachromysces bulradii</i> , B: MacConkey agarda <i>E. coli</i> , C: Sorbitol agarda <i>E. coli</i> , D: Kanlı agarda <i>E. coli</i>	51
Şekil 4.3 O157:H7 <i>E. coli</i> izolatlarının sıklığı.....	53
Şekil 4.4 Bakteri izolatlarının hemoliz paternlerine göre dağılımı	54
Şekil 4.5 Jel elektroforezinde (%1,5 agaroz) shiga toksin-1 geninin (555 bp) PCR ürünü, 100 bp büyüklüğünde DNA markörü ve etidyum bromür boyası	56
Şekil 4.6 Jel elektroforezinde (%1,5 agaroz) shiga toksin-2 geninin PCR ürünü (687 bp), 100 bp büyüklüğünde DNA markörü ve etidyum bromür boyası	56
Şekil 4.7 Jel elektroforezinde (%1,5 agaroz) rfb-O157 geninin PCR ürünü (385 bp), 100 bp büyüklüğünde DNA markörü ve etidyum bromür boyası	57
Şekil 4.8 Jel elektroforezinde (%1,5 agaroz) hly geninin PCR ürünü (513 bp), 100 bp büyüklüğünde DNA markörü ve etidyum bromür boyası	57
Şekil 4.9 Jel elektroforezinde (%1,5 agaroz) fliC geninin PCR ürünü (475 bp), 100 bp büyüklüğünde DNA markörü ve etidyum bromür boyası	58
Şekil 4.10 Jel elektroforezinde (%1,5 agaroz) 16 S rRNA geninin (1500 bp) PCR ürünü, 100 -2000 bp boyutunda DNA markörü ve etidyum bromür boyası.....	58
Şekil 4.11 Bakteri izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitesi	61
Şekil 4.12 Mikrotiter plaka yöntemi kullanılarak bakteri izolatları arasında biyofilmin optik yoğunluğu ve konsantrasyonu	61
Şekil 4.13 (A) Gen ifade döngüleri (B) <i>Sachromysces bulradii</i> eklenmeden önce STX-1 geninin erime tepe sıcaklığı	65
Şekil 4.14 (A) Gen ifade döngüleri (B) <i>Sachromysces bulradii</i> eklendikten sonra STX-1 geninin erime tepe sıcaklığı	66
Şekil 4.15 (A) Gen ifade döngüleri (B) <i>Sachromysces bulradii</i> eklenmeden önce STX-2 geninin erime tepe sıcaklığı	66
Şekil 4.16 (A) Gen ifade döngüleri (B) <i>Sachromysces bulradii</i> eklendikten sonra STX-2 geninin erime tepe sıcaklığı	67
Şekil 4.17 (A) Gen ekspresyon döngüleri (B) <i>Sachromysces bulradii</i> 'nin eklenmesinden sonra temizlik (16rRNA) geninin erime tepe sıcaklığı.....	67
Şekil 4.18 Komşu-Birleştirme yöntemi ile tasarlanmış <i>E. coli</i> filogenetik ağacı.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar	27
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler	28
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kitler	29
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan Kültür ortamları	29
Çizelge 3.5 Konvansiyonel-PCR'da kullanılan primerler ve dizileri	30
Çizelge 3.6 Gerçek Zamanlı PCR'da kullanılan primerler ve diziler	30
Çizelge 3.7 DNA ekstraksiyon kiti bileşenleri	36
Çizelge 3.8 PCR karışımının reaktifleri	38
Çizelge 3.9 hylA geninin PCR amplifikasyon programı	39
Çizelge 3.10 rfb O157 geninin PCR amplifikasyon programı	39
Çizelge 3.11 fliC geninin PCR amplifikasyon programı	39
Çizelge 3.12 Stx1 geninin PCR amplifikasyon programı	40
Çizelge 3.13 Stx2 geninin PCR amplifikasyon programı	40
Çizelge 3.14 16r RNA geninin PCR amplifikasyon programı	40
Çizelge 3.15 DNase tedavi protokolü	44
Çizelge 3.16 Ters transkripsiyon prosedüründe kullanılan reaktifler	45
Çizelge 3.17 RNA'nın cDNA'ya Dönüştürülme protokolü	45
Çizelge 3.18 qRT-PCR'de kullanılan ana karışım bileşenleri protokolü	45
Çizelge 3.19 qRT -PCR döngü programı	46
Çizelge 4.1 <i>E. coli</i> O157:H7 ile enfekte ve enfekte olmayan hastaların yaş gruplarına göre dağılımı	47
Çizelge 4.2 Hastaların cinsiyete göre dağılımı	48
Çizelge 4.3 Sorbitol fermentasyonu için bakteri izolatlarının kapasitesi	51
Çizelge 4.4 Bakteriyel izolatlar arasında virülans genlerinin sıklığı	55
Çizelge 4.5 Antibiyogram direnç profili	63
Çizelge 4.6 <i>Saccharomyces bulradii</i> eklenmeden önce ve eklendikten sonra genlerin ifade düzeyleri	65
Çizelge 4.7 Örnek ve Referans kopyalarımız (NCBI) arasındaki BLAST Sonuçları	70

1. GİRİŞ

Enterobacteriaceae ailesi, *Escherichia coli* olarak bilinen gram-negatif basilleri içerir (Gözde and Emek 2019). Spor üretmeyen bu organizmalar fakültatif anaeroblardır. Bulaşıcı hastalık vakalarının yaklaşık %80'i ve sepsis vakalarının %40'u K1 kapsüler karbonhidrat maddesine sahip *E. coli* suşlarından kaynaklanmaktadır. Birçok farklı ishal türüne *E. coli*'nin çeşitli türleri neden olmaktadır. Her bir *Escherichia coli* türü, kendi O ve H flagellar antijenleri de dahil olmak üzere kendine özgü virülans faktörlerine sahiptir (Makvana and Krilov 2015). Fekal kontaminasyon göstergeleri uzun zamandır homöotermik hayvanlarda (insanlar dahil) sıklıkla bulunan bir mikrop olan *E. coli*'yi içermektedir. *E. coli* suşlarının çoğu zararlı değildir, ancak bazı suşlar ölümcüldür, özellikle de çok çeşitli hastalıklara neden olabilir (Cho *et al.* 2018).

Tipik hayvan hastalığı mikrobunun neden olduğu insan su kaynaklı hastalık salgınları, kirli içme ve dinlenme sularının bir sonucu olarak hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde meydana gelmektedir (Probert *et al.* 2017). Hem hayvan hem de insan atıklarındaki mikropların yaygınlığı nedeniyle, ekolojik su kaynakları kirlenmeye karşı hassastır. Yüzey sularının yaygın tüketimi ve rekreasyonel kullanımı nedeniyle, bu akarsularda zararlı *E. coli* bulunabilir ve bu da insanların hastalanma olasılığını artırır (Cho *et al.* 2018). İnsanlarda görülen hastalıkların önde gelen nedeni kontamine yiyecek ve içeceklerdir. Hafif ile şiddetli kanlı ishal de dahil olmak üzere çeşitli gastrointestinal semptomlar, yaklaşık üç ile dört günlük inkübasyondan sonra gelişir. Akut böbrek yetmezliği, kanama ve nörolojik semptomlar, bireylerin yaklaşık %8'ini etkileyen "hemolitik üremik sendromun" ayırt edici özellikleridir (Cho *et al.* 2018).

Antibiyotikler tarafından güçlendirilen direnç unsurlarının geliştirilmesi ve yayılması antimikrobiyal direnç (AMR) olarak bilinmektedir. Tek Sağlık perspektifine göre, antimikrobiyal direnç (AMR) halk sağlığı ve hayvanlardan gıda üreten sistemler açısından büyük bir endişe kaynağıdır (Agnew *et al.* 2021). En önemli patojenlerden biri olan *E. coli*'nin, diğer zararlı veya fırsatçı bakterilere geçebilecek direnç genlerine sahip olabileceğine dair endişeler giderek artmaktadır. Bu endişe hem kommensal hem de

Ekstraintestinal Patojenik *E. coli* (ExPEC) ile ilgili olarak gündeme getirilmiştir (Dell'Orco *et al.* 2019). Özellikle, yeni ve ilgili antibiyotik direnç genleri ExPEC suşları tarafından edinilmektedir (Manges *et al.* 2019). Gerçekten de çoklu ilaca dirençli bakterilerin küresel prevalansının arttığı ve antibakteriyel araç kutumuzun bu enfeksiyonlarla mücadelede daha az etkili hale geldiği gerçeği ışığında, küresel olarak ExPEC enfeksiyonları son zamanlarda halk sağlığı için büyük bir endişe kaynağı olarak ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, sağlık hizmeti sağlayıcıları ve halk, bu enfeksiyonların önemli klinik ve ekonomik zorluklar teşkil etmesi ve optimum yönetimlerinin karmaşık olması nedeniyle ExPEC'lerin önemi konusunda daha bilinçli hale gelmektedir (François *et al.* 2016).

Eritrojenik koli enfeksiyonlarının, oluşturdıkları biyofilmler nedeniyle ortadan kaldırılmasının zor olduğu bilinmektedir. Bilim dünyasının "biyofilm" olarak adlandırdığı şey aslında uyum içinde yaşayan bir mikrop topluluğudur ve ıslak ortamlarda katı yüzeylere yapıştıklarını görmek yaygındır. Biyofilm içindeki mikroorganizmalar hayatta kalma şanslarını artırmak için koruyucu kimyasallar olan çeşitli ekstra polisakkaritler salgırlar. Gastrointestinal rahatsızlıkların büyük bir kısmının *E. coli* biyofilmlerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Biyofilm, çoğunluk algılama yolu ile iletişimi sürdüren birbirine bağlı bakteri hücrelerinden oluşan bir ağdır. Bu süreç boyunca bakteri hücreleri tarafından hücre dışı ortama otoindükleyici kimyasallar salınır. Bütün bunlar olurken, bakteri hücreleri çevredeki ortama otoindükleyici kimyasallar salmaktadır. Bakteri hücreleri, gerekli yüksek yoğunluğa ulaşıldıktan sonra biyofilm oluşumunu ve olgunlaşmasını düzenler (Sturbelle *et al.* 2015). Biyofilmle ilişkili bakteri hücreleri, otoindükleyici kullanarak genetik mutasyonlar biriktirebilir, virülans proteinleri salgılayabilir ve konağın bağışıklık tepkisini değiştirebilir. Geleneksel antibiyotiklerin biyofilme nüfuz etmesi daha zordur ve biyofilm mevcut olduğunda hücrelerin kendileri antibiyotik etkisine daha az duyarlıdır (Mittal *et al.* 2015).

Shiga-toksin üreten (enterohemorajik) *E. coli* (STEC/EHEC), O157:H7 serotipinin neden olduğu ciddi gastrointestinal hastalıkların yüksek prevalansı nedeniyle önemli bir sağlık sorunu teşkil etmektedir (Kaper and O'Brien 2014). Çiğ veya az pişmiş etler, özellikle büyükbaş hayvanlar, toksik maddeler içerebilen pişmemiş sebzeler, filizler ve tohumlar

patojenin yaygın taşıyıcılarıdır (Caprioli *et al.* 2015). Böbrek yetmezliği ve nörolojik komplikasyonlara neden olabilen ciddi hemolitik üremik sendrom vakaları bu durumun sonuçları arasındadır. Hafif vakalar arasında sulu ishal ve hemorajik kolit yer alır. EHEC tüketildikten sonra bağırsaklara yerleşir ve kolon ve distal ileumdaki bağırsak epiteline bağlanır. Efektör proteinler, fimbria tarafından kolaylaştırılan ilk bağlanmanın ardından filamentöz bir tip III salgı sistemi tarafından Enterohemorajik *Escherichia coli*'ye (EHEC) enjekte edilir (Gaytán *et al.* 2016). Bakteriyel bağlanma ve fırça sınırı mikrovilluslarının çıkarılması, translokasyonlu intimin reseptörü (Tir) konak hücrenin plazma membranına enjekte edildiğinde tetiklenir. Bağlanma süreci, konak hücre ve bakteriyel dış membran proteini intimin bir araya geldiğinde başlatılır. İntimin ve Tir etkileşime girdiğinde başlatılan aktin polimerizasyonu ile bağlanma artı silinme (A/E) lezyonlarının oluşması, bakterinin yakın bağlantısına yol açar (Deborah Chen and Frankel 2005).

STEC suşları tarafından paylaşılan özellikler arasında Shiga toksinlerini ayıran bir çift gen, "Stx1 ve Stx2" üretme yeteneği de bulunmaktadır. İnsan hemolitik üremik sendromu sıklıkla Stx2'nin yedi alt tipinden ikisiyle- Stx2a ve Stx2c - Stx1'in bulunan dört alt tipiyle bağlantılıdır (Melton-Celsa 2014). Glikosfingolipid globotriaosilseramid, beyindeki kan damarlarını ve glomerülleri kaplayanlar da dahil olmak üzere birçok insan hücresinde keşfedilebilen Shiga toksinlerinin her iki çeşidini de bağlar (Legros *et al.* 2018). Protein sentezi durur ve nihayetinde hücre ölümü Stx zehirlerinin nihai sonucudur (Melton-Celsa 2014). Hemolitik üremik sendrom (HUS), vasküler disfonksiyon ve trombüs gelişimi şeklinde ortaya çıkan sistemik bir zehirlenme komplikasyonudur. Stx genleri lambdoid fajın geç bölümünde yer aldığı için ek tedavi olanakları karmaşıktır. Antibiyotikler genellikle STEC enfeksiyonlarının tedavisi için önerilmez çünkü bakterilerden fajların oluşmasına ve salınmasına yol açan bakteriyel "canımızı kurtarın" tepkisini aktive edebilirler. Bu durum özellikle kinolon ailesindeki antibiyotikler için geçerlidir (Kakoullis *et al.* 2019).

Bu çalışmada, hastalardan *E. coli*'nin tanımlanması ve izole edilmesi, *E. coli* serotipi O157; H7'nin tanımlanması, bakteri izolatlarının antibiyotik direnç profilinin, biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırılması, virülans genlerinin moleküler tespiti,

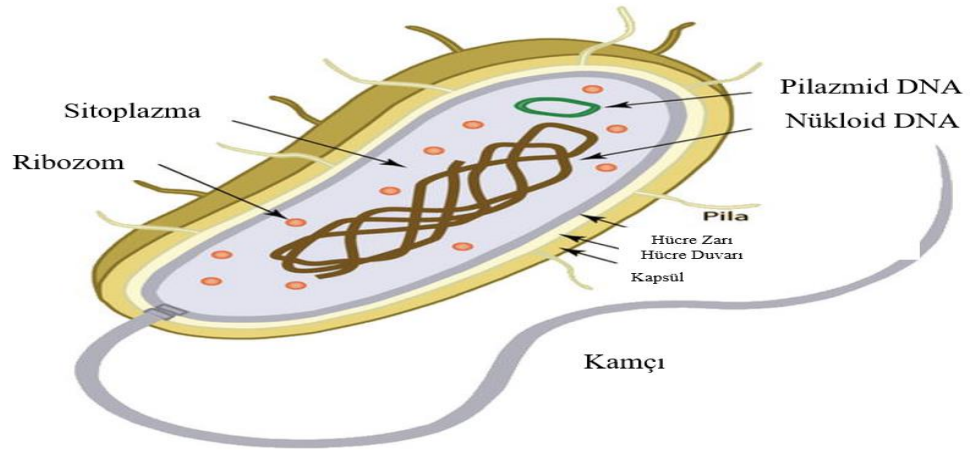
Saccharomyces boulardii uygulamasından önce ve sonra Shiga toksin1 ve Shiga toksin 2 gen ifadesinin tahmini ve Shiga toksin gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli bakterisi, *Escherichia* cinsine ait gram-negatif, sporlanmayan, çubuk şeklinde, fakültatif anaerobik ve koliform bir bakteridir. Genellikle çevrede, gıdalarda ve sıcakkanlı hayvanların alt bağırsak kısmında bulunur (Campbell and Reece 2002). Kamçısının peritrik düzenlemesi nedeniyle hareketlidir ve sadece ihmal edilebilir sayıda suşu hareketsizdir. *Escherichia coli* büyümesi için 37 santigrat derece sıcaklık optimum olsa da, bakterinin birkaç suşu 49 santigrat dereceye kadar yüksek sıcaklıklarda çoğalabilir. Koşullar uygun olduğunda, yirmi dakika gibi kısa bir sürede başarılı bir şekilde çoğalabilir (Basavaraju and Gunashree 2023). Kamçılı suşların hem motil hem de motil olmayan formlarını bulmak mümkündür. Bağırsak dışı hastalıklardan izole edilen bazı *E. coli* suşlarının bir polisakkarit kapsül bileşeni içerdiği gösterilmiştir. Koyu bir zemin üzerinde parlak bir halenin oluşmasıyla sonuçlanan negatif boyama teknikleri, *E. coli* kapsüllerinin net ve belirgin bir şekilde görülmesini mümkün kılmaktadır. Bu organizmaların hücre duvarı çok incedir ve Şekil 2.1'de görülebileceği gibi sadece bir veya iki kat peptidoglikandan oluşur (Köhler and Dobrindt 2011).



Şekil 2.1 *Escherichia coli*'nin morfolojisi (Köhler and Dobrindt 2011)

Doğumdan kısa bir süre sonra bebeğin gastrointestinal sistemine hızla yerleşir ve sağlıklı bir sindirim sisteminin korunmasına katkıda bulunur. Günümüzde ilaç endüstrisi, etkili

ve yararlı probiyotikler olarak tanımlanan çeşitli *E. coli* suşlarını kullanmaktadır. Oksijenli veya oksijensiz hayatta kalabilen ve hem solunum hem de fermantasyon yoluyla enerji elde edebilen oldukça uyumlu bir organizmadır (Blount 2015). *E. coli* suşlarının büyük çoğunluğu çok az tehdit oluşturmalarına rağmen, kontamine yiyecek veya içeceklerin alınması bazı serotipler nedeniyle ishale yol açabilir. Ayrıca, bazı serotipler idrar yolu enfeksiyonlarından (İYE), kan hücrelerini, solunum sistemini veya böbrekleri etkileyen rahatsızlıklardan da sorumlu olabilir (Blount 2015). Bununla birlikte, *E. coli*'nin bazı varyantları virülans bileşenleri elde etmek için plazmidler, transpozonlar, bakteriyofajlar ve/veya patojenite adaları kullanarak zararlı formlara dönüşmüştür (Kaper *et al.* 2004). Patojenik *E. coli* suşunun sınıflandırılması serogruplara, patojenite mekanizmalarına, klinik semptomlara ve virülans parametrelerine göre belirlenebilir (Sarowska *et al.* 2019a). Bakteri, uygun koşullar altında laboratuvar ortamında kolaylıkla ve uygun maliyetle yetiştirilebilir. Üreme süreci 20 dakika gibi kısa bir sürede tamamlanabilir ve 60 yılı aşkın süredir kapsamlı bir şekilde incelenmektedir (Basavaraju and Gunashree 2023). *E. coli*, biyoteknoloji ve mikrobiyoloji alanında model organizma olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Bu organizma, rekombinant DNA için bir konakçı rolü aracılığıyla DNA düzenleme ve protein sentezi çalışmaları için bir araç görevi gördüğü için büyük önem taşımaktadır (Idalia and Bernardo 2017).

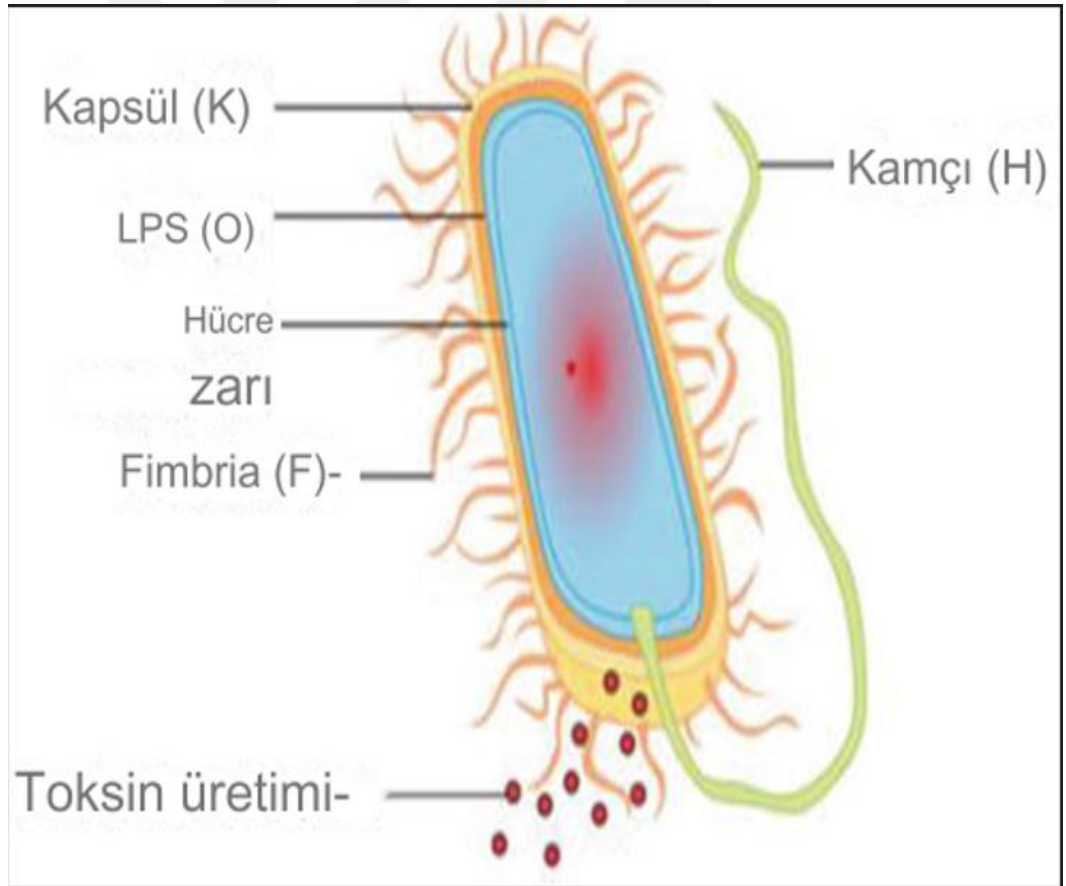
2.2 Yetiştirme Ortamı

Escherichia coli çok çeşitli farklı substratlar üzerinde gelişme yeteneğine sahiptir. *E. coli* nişi, konak türün bağırsaklarında mevcut olan besin miktarına göre belirlenir. *E. coli* için birincil yaşam alanı, insanlar ve önemli sayıda diğer türler de dahil olmak üzere sıcak kanlı hayvanların sindirim kanallarıdır. Fiziksel koşullar, mevcut besin çeşitliliği ve mevcut besin miktarı açısından birbirinden oldukça farklı olan sıcakkanlı hayvan bağırsakları ve çevre arasında, bu iki birincil yaşam alanı arasında gidip gelir. Hem *E. coli* hem de konakçısı karşılıklı olarak faydalı bir bağlantı geliştirir. Kolondaki *E. coli*, K ve B kompleks vitaminleri üretir ve gastrointestinal sistemi patojen mikroorganizmaların kolonizasyonuna karşı korur (Eckburg *et al.* 2005). Aynı zamanda, *E. coli*'nin gelişebilmesi için konakçı besinlerin yanı sıra ekolojik bir niş de sunmaktadır. Bağırsaklarda yaşayan çeşitli fakültatif anaeroblar arasında *Escherichia coli* açık ara en

yaygın olanıdır. Bağırsak mikrobiyotasının yaklaşık yüzde 0,1'i bu bakteriden oluşmaktadır (Eckburg *et al.* 2005). Ayrıca, *E. coli* sıcak kaynak yüzeyleri veya mezbahalarda işlenmiş öğütülmüş etler gibi daha sıcak yerlerde de bulunabilir (Li and Gänzle 2016).

2.3 Antijenik Yapı

E. coli'nin üç farklı antijen tarafından belirlenen yaklaşık 150-200 farklı serotipi veya serogrubu vardır: somatik (O) veya hücre duvarı antijeni, kapsüler (K) antijen ve flagellar (H) antijen. Flagellar antijen olarak da bilinen H antijeninin 75 farklı varyantının yanı sıra somatik antijen olarak da bilinen O antijeninin 173 farklı tipi ve kapsüler antijen olarak da bilinen K antijeninin 103 farklı tipi tanımlanmıştır (Şekil 2.2) (Van Dijk *et al.* 1979).



Şekil 2.2 Antijenik *E. coli*'nin yapısı (Basavaraju and Gunashree 2023)

2.4 Epidemiyoloji

Birçok hayvanın mikrobiyomunda enterik *E. coli* bulunmaktadır. İnsanlar, bozuk gıda maddelerini yeme veya içme, insan veya hayvan atıklarıyla kirlenmiş su içme veya insandan insana doğrudan bulaşma gibi çeşitli sağlıksız yollarla enfeksiyon kapabilir (Berger *et al.* 2010). Hangi bakterilerin ishalleri hastalıklara neden olduğu konusunda fikir birliği olmaması nedeniyle, enterik *E. coli* enfeksiyonlarının dünya çapındaki yaygınlığına ilişkin güvenilir tahminler elde etmek zordur. Sanayileşmiş ülkelerde Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC), Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC) ve Enteroagregatif *Escherichia coli*'nin (EAEC) neden olduğu enfeksiyonlar genellikle hafiftir ve kendiliğinden düzelir, ancak gelişmekte olan ülkelere çocuklarda şiddetli ishal ve hatta tedavi edilmezse ölüme neden olabilirler. Sanayileşmiş ülkelere, gıda zehirlenmesi salgınlarıyla bağlantılı en yaygın *E. coli* bakteri türleri Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC), Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) ve Shiga-toxin-EAEC'dir (Peng *et al.* 2009). ABD'de *E. coli* sepsisi ile ilişkili önemli bir ölüm oranı vardır (Biran and Ron 2018). İlgili araştırmalara göre, *E. coli* erken başlangıçlı sepsis tüm yaş kategorilerinde artış göstermektedir. Bunun da ötesinde, en çok kullanılan antibiyotiklere dayanabilen *E. coli* suşlarının prevalansında, yaş grubundan bağımsız olarak küresel ölçekte bir artış görülmüştür. Düşük doğum ağırlıklı bebekler en yaygın tür olmaya devam etmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunun yaygın kullanımının getirdiği *E. coli* erken başlangıçlı sepsis tanılarındaki artıştan en çok yenidoğan popülasyonu etkilenmiştir. Ayrıca, erken başlangıçlı sepsise neden olan *E. coli* sterotipleri daha yaygın hale gelmiştir ve bunlar çeşitli antibiyotiklere karşı oldukça dirençlidir (Mendoza-Palomar *et al.* 2017).

Brezilya'da EPEC izolatlarının %92'si gençlerde bulunmuştur (Scaletsky *et al.* 2010). İran'da ise EPEC suşları ishal olan küçük çocuklarda belirlenmiştir (Bakhshi *et al.* 2013). Norveç ve Avustralya'da yapılan çalışmalara göre, kalıcı ishal ataklarının EPEC izolatlarını içermesi olasılığı normal izolatlardan daha yüksektir (Afset *et al.* 2003). Nijeryalılar arasında, daha az sıhhi çalışma koşulları, bakterilere daha uzun süre maruz kalma (10 yıldan fazla) ve daha eski çiftlik ve pazarlarla bağlantılı olarak, çiftlik işçileri en yüksek dirençli *E. coli* oranına sahiptir (Aworh *et al.* 2019). Sığır kıymasından ve

pastörize edilmemiş süttten hazırlanan bir tür sosisin yüksek hemorajik üremik sendrom insidansıyla bağlantılı olduğu bir başka örnek İskoçya ve Avustralya'da görülmüştür. Japonya'daki araştırmacılar, bir çocuk kreşindeki vakaların %6,5'inin EHEC kaynaklı olduğunu tespit etmiştir. İngiltere'de iki doğrulanmış EIEC vakası görülmüştür (Gözde and Emek 2019).

2.5 Patogenezi

E. coli ile birçok insan arasındaki ilişki doğumdan hemen sonra başlar. Çoğu durumda, yenidoğanlar *E. coli*'yi annelerinden, doğumdan sonra annenin dışkılarıyla temas ederek ve daha sonraki işlemlerle alırlar (Leimbach *et al.* 2013). Çoğu durumda, kolonize edici suşlar salgı sistemleri ve pili sayesinde bebeğin bağırsak dokusuna tutunabilir ve etkileşime girebilir (Ventura *et al.* 2012). Hızla genişleyen bu *E. coli* popülasyonu tarafından konak doku hücrelerinin şekli ve işlevinde meydana getirilen değişiklikler, mikrobiyomun düzgün gelişimi için gerekli görünmektedir. Konak dokulara yapışma şekilleri, sindirim sistemindeki hem faydalı hem de zararlı *E. coli* için gereklidir. EPEC demetler oluşturabilen pili içerdiğinden, mikro koloniler oluşturabilir ve bu da lokalize yapışma modeliyle sonuçlanır. *E. coli*, kolonizasyon faktörleri aracılığıyla konakçı enteral hücrelere bağlanır. EAEC'nin enteral doku tabakası üzerinde oluşturduğu biyofilmlerde, bakteriler birbirlerine ve hücre yüzeyine "yığılmış tuğla" gibi tutunurlar. DAEC enteral hücrelerin yüzeylerine yayıldıkça dağınık bir yapışma modeli oluşur (Crohen *et al.* 2013). AIEC, Crohn hastalarının sindirim kanallarının mukozal astarını enfekte edip kolonize edebilir ve burada hem makrofajları hem de zararlı doku hücrelerini çoğaltabilir. AIEC istila etmek için enteral hücrelere ve onların uzun polar filamentlerine tutunur. Endotrakeal özofageal veya enterik kateterizasyona (EIEC) neden olan enfeksiyöz ajanlar, makrofajlar aracılığıyla konak dokulara sızabilir ve ardından bağ dokulara yayılabilir. Makrofaj nekrobiyozunu indükleyerek, EIEC submukozal fagositlerden kaçabilir. Daha sonra kolonositleri bazolateral taraftan istila eder ve lateral olarak açılırlar (Crohen *et al.* 2013).

2.6 Antibiyotik Direnci

Antibiyotikler řu anda mevcut olan en önemli ilaç kategorisidir ve aynı zamanda 20. yüzyılda geliştirilen en önemli tıbbi yenilikler arasındadır. Mikroplara karşı savaşta antibiyotikler, milyonlarca hayatın korunmasına yardımcı oldukları için insan uygarlığı için tartışmasız bir nimet olmuştur (Ribeiro da Cunha *et al.* 2019). Öte yandan, yirmi birinci yüzyılın başından bu yana, birçok ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu hastalıkların sayısındaki artış nedeniyle tedavisi mümkün olmayan enfeksiyon tehdidi baş göstermektedir (Gajdács and Albericio 2019). Antibiyotikler, bulaşıcı komplikasyonları yönetme becerisi ve önlenmesi antibiyotiklere bağı olan çeşitli ameliyatların ve bağışıklık sistemini baskılayıcı tedavilerin başarısı da dahil olmak üzere tıbbın birçok alanının gelişmesine yardımcı olmuş olsa da antimikrobiyal direnç (AMR) dünya genelindeki tüm sağık sistemleri için önemli bir sorundur (Dodds 2017). AMR, tüm organizmaların kendilerini ölümcül seçim baskısının etkilerinden korumak için genetik değışikliklere uğraması nedeniyle gerekli bir evrimsel sonuçtur. Antibakteriyel ilaçlar bakterilere karşı kullanılmaya devam edecek, bu da bakterilerin evrim geçirmeye ve dirence yol açan taktikleri benimsemeye devam edeceği anlamına gelmektedir. Dünya Sağık Örgütü (WHO) tarafından 2019 yılında yayınlanan bir araştırma, AMR'nin 700.000 kişinin ölümünden sorumlu olduğunu bildirmiştir. AMR'nin neden olduğu ölüm sayısının 2050 yılına kadar 20 milyona yükseleceğı öngörülmektedir. Bunun bir sonucu olarak hem yaşamlarımız hem de ekonomimiz için önemli bir tehdit oluşturan önemli bir sorun haline gelmiştir. AMR'nin hızlı gelişimi sadece ilaç sektörü için yatırım getirilerinin azalmasına neden olmakla kalmıyor, aynı zamanda antibiyotik araştırma ve geliştirme ile ilgili maliyetleri de önemli ölçüde artırıyor. Çok sayıda ilaç şirketi, yeni antibiyotiklerin araştırılması ve geliştirilmesinin yanı sıra antibiyotiklerin araştırılması ve geliştirilmesinden de vazgeçmiş durumdadır (Mohr 2016).

2.7 Antibiyotik Direnci Nedenleri

Bakteriler gibi mikroorganizmalar zaman içinde uyum sağılayan canlı organizmalardır. Temel amaçları mümkün olduğunca hızlı bir şekilde çoğalmak, hayatta kalmak ve yayılmaktır. Sonuç olarak, mikroplar çevrelerine uyum sağılar ve varlıklarının devamını

garanti altına alacak şekilde evrimleşirler (MacGowan and Macnaughton 2017). Antibiyotik büyüme kabiliyetlerini durdurursa, bakterileri ilaca karşı bağışık hale getiren ve hayatta kalmalarını sağlayan genetik modifikasyonlar ortaya çıkabilir (Munita and Arias 2016). Bakterilerin ilaç direnci geliştirmesi doğal bir süreçtir. Bununla birlikte, antibiyotik direncinin çok yönlü etiolojisinde şu anda birkaç unsur söz konusudur. Bunlar arasında antibiyotiklerin aşırı kullanımı ve suistimali, kesin olmayan tanı ve yanlış antibiyotik reçeteleme, hasta duyarlılığının kaybı ve kendi kendine ilaç tedavisi, kötü sağlık ortamları, kötü kişisel hijyen ve yaygın tarımsal kullanım yer almaktadır (Chokshi *et al.* 2019).

2.7.1 Genetik mutasyon

Bakteriyel replikasyon sırasında, az sayıda baz çiftindeki küçük değişiklikler, kilit hedef genlerde, düzenleyici genlerde veya kromozomal yapılarda bir veya birkaç amino asidin yer değiştirmesine yol açarak sonuçta yeni dirençli bakteri türlerinin ortaya çıkmasına neden olabilir (Von Wintersdorff *et al.* 2016). Yeni gelişen savunma mekanizması, antibiyotiklerin organizmaya karşı uzun vadede etkili olması amaçlanmasına rağmen antibiyotikleri işe yaramaz hale getirebilir (Von Wintersdorff *et al.* 2016).

2.7.2 Genetik materyallerin transferi

Daha önce savunmasız olan bir suşun zamanla başka bir türe veya cinse karşı direnç geliştirme olasılığı vardır. Plazmidler ve diğer mobil genetik element formları, antibakteriyel ajanlara direnç kazandıran genlerin çoğunu taşır. Bu genler çeşitli cins ve türlere ait bakterilere yayılma potansiyeline sahiptir ve şu anda da yayılmaktadır. İlaçlara dirençli olan bakterilerin genlerinin bir kopyasını ilaca dirençli olmayan bakterilere aktarması mümkündür. İlaç direnci geliştirme sürecinde, tedaviye dirençli olmayan bakteriler ilave DNA toplamaktadır (Von Wintersdorff *et al.* 2016).

2.7.3 Seçici baskı

Seçici baskıyı, benzersiz mutasyonlara veya yeni evrimleşmiş özelliklere sahip organizmaların varlığını sürdürmesini ve çoğalmasını mümkün kılan çevresel koşullar olarak tanımlamak mümkündür (Holmes *et al.* 2016). Mikroplar antimikrobiyal bir tedaviye maruz kaldıklarında ya ortadan kaldırılırlar ya da direnç genlerine sahiplerse hayatta kalabilirler (Martínez *et al.* 2015). Hayatta kalan bu mikroorganizmalar çoğalacak ve yakın zamanda ortaya çıkan dirençli mikroplar hızla mikrobiyal topluluğu ele geçirecek ve baskın form haline gelecektir (Zhao *et al.* 2019).

2.7.4 Yanlış teşhis

Tıp doktorları bir hastalığı teşhis ederken zaman zaman yanlış veya hatalı bilgilere dayanabilirler. Bu durum, "her ihtimale karşı" antibiyotik tedavisi önermelerine yol açabilir; örneğin, daha dar kapsamlı hedefe yönelik bir ilaç daha uygun olabilecekken geniş spektrumlu bir antibiyotik önerebilirler. Bu koşulların bir sonucu olarak, antimikrobiyal direnç gelişimini destekleyen seçim baskısı artmaktadır (Chokshi *et al.* 2019).

2.7.5 Uygunsuz antibiyotik reçetesi

Doktorların, bir hastalığın bakteriler mi yoksa virüsler tarafından mı kötüleştirildiğinden emin olmadıkları durumlarda antibiyotik vermeleri mümkündür. Ancak antibiyotikler viral enfeksiyonlara karşı etkisiz olduğundan enfeksiyon direnci gelişme riski bulunmaktadır (Marc *et al.* 2016).

2.7.6 Kendi kendine ilaç tedavisi

Antibiyotikler dünyanın çeşitli bölgelerinde genellikle doktor reçetesi olmadan kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin kendi kendine uygulanması, zararlı ilaç tepkilerine yol açabilecek, altta yatan hastalıkların semptomlarını gizleyebilecek ve

mikroorganizmalarda ilaç direncini artırabilecek yanlış ilaç kullanımı tehlikesiyle ilişkilidir (Nepal and Bhatta 2018).

2.7.7 Aşırı veya yetersiz antibiyotik tedavisi

Bir bireyin antibiyotik tedavisini tamamlamaması sonucunda bazı bakterilerin gelişmesi ve bir antibiyotiğe karşı direnç geliştirmesi mümkündür. Diğer taraftan, antibiyotiklerin yanlış nedenlerle uzun süre kullanılması, bakterilerde ilaçların mücadele edemeyeceği değişikliklere yol açabilir (Sulis *et al.* 2020).

2.7.8 Hastane ortamının kontaminasyonu

Her gün binlerce hasta, personel ve ziyaretçi hastanelere gelmektedir. Bu kişilerin her biri hem kendi vücutlarında hem de kıyafetlerinde kendi benzersiz mikrobiyomlarını ve kolonize edici bakterilerini beraberinde getirmektedir. Hastanelerin temiz alanların korunmasına yardımcı olacak uygun süreç ve protokollere sahip olmaması durumunda, hastaneler bakterilerin yayılma riskiyle karşı karşıya kalmaktadır. Böylece antimikrobiyal direncin oluşması ve yayılması kolaylaşır (Almagor *et al.* 2018).

2.7.9 Tarımda geniş kullanım alanı

Antibiyotiklerin, dünyanın hem sanayileşmiş hem de gelişmekte olan bölgelerinde hayvanlar için büyüme takviyesi ve büyümeyi destekleyici olarak kullanılması yaygın bir uygulamadır. İnsanlarda olduğu gibi, AMR gelişimi de hayvanlara antibiyotik uygulanmasının bir sonucu olarak ortaya çıkacaktır. Sığırlarda bulunan antibiyotiklere dirençli bakteriler, insanlarda hastalığa neden olma potansiyeline sahiptir, gıda zincirleri yoluyla insanlara kolayca bulaşır ve hayvan atıklarının bir sonucu olarak çevreye geniş ölçüde yayılır. Bu durum insanlarda tedavisi zor, kalıcı ve iyileştirilmesi güç enfeksiyonlara yol açabilir (Manyi-Loh *et al.* 2018).

2.7.10 Antibiyotik bulunabilirliğinin az olması

İlaç endüstrisi daha önce antibiyotiklere dirençli bakterilerle mücadelede başarılı olmasına rağmen, yeni antibiyotik geliştirme süreci, teknoloji ile ilgili sorunlar, yabancılık, bakteri fizyolojisine karşı mücadelede karşılaşılan zorlu zorluklar, parasal ve hükümet engelleri gibi bir dizi faktör nedeniyle önemli ölçüde yavaşlamıştır. Öte yandan, yeni antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, yaygın olarak kullanılmaya başlandıklarında pratikte önlenemeyecek bir durumdur. Karşılaştırılabilir etkinliği kanıtlanmış daha eski ajanlar, mikropların eski ilaçlara karşı direnç kazanarak onları işe yaramaz hale getirme olasılığını artırır (Sreeja *et al.* 2017).

2.8 Antibiyotik Direnci Mekanizmaları

Antibiyotik direncinin en yaygın iki türü, edinilmiş olanlar ve bakteriler arasında doğal olarak meydana gelenlerdir. Öte yandan, normal direnç aracılı veya doğuştan olabilir (Reygaert 2018). Buna karşılık, edinilmiş direnç, bakterinin translasyon, konjugasyon veya transpozisyon yoluyla genetik materyal elde etmesinin veya kendi kromozomal DNA'sındaki mutasyonların bir sonucu olabilir. AMR süreçlerini dört farklı tipte sınıflandırmak mümkündür (Culyba *et al.* 2015, Lerminiaux and Cameron 2019).

2.8.1 Antibiyotik alımının sınırlandırılması

Gram-negatif bakteriler, Gram-pozitif bakterilere kıyasla belirli antibiyotiklere karşı doğal olarak daha az geçirgendir. Bunun nedeni, Gram-negatif bakterilerin dış zarının, belirli antibiyotiklerin geçmesini engelleyerek bir geçirgenlik kalkanı oluşturan bir lipopolisakkarit tabakasına sahip olmasıdır. Bu doğal bariyerin etkinliğine mükemmel bir örnek olarak, vankomisin Gram-negatif bakterilere karşı etkisizliği gösterilebilir; bunun nedeni çoğunlukla dış bariyerlerini geçememesidir. Dış membranın geçirgenliğindeki değişikliklerin bir sonucu olarak, hidrofilik moleküller önemli ölçüde etkilenir (Blair *et al.* 2015). Bazı bakteriler, polar moleküllerin hücre duvarına nüfuz etmesini zorlaştıran aşağı regüle edilmiş porin kanalları içerir. Ayrıca, porin kanallarının seçici olmayan

kanallarla değiştirilmesi, aminoglikozidlere karşı içsel bir direnç kazandırır. Buna ek olarak, mevcut araştırmalar porin ifadesindeki azalmaların karbapenemler gibi ilaçlara karşı direnç gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Örneğin, *Enterobacter*'de karbapenemaz aktivitesinden sorumlu enzimler yoksa, mutasyonlar porin sentezini azaltıyorsa veya mutant porin alelleri mevcutsa karbapenemlere karşı direnç gelişecektir (Iredell *et al.* 2016). Biyofilm üretimi, bakterilerin kolonizasyonuna katkıda bulunan bir başka süreçtir (Pang *et al.* 2019). Biyofilm matrisi, savunma sağlamak amacıyla antimikrobiyal ajanların bakteriye erişimini imkânsız hale getirir ve bu da koruma sağlar (Hall and Mah 2017).

2.8.2 Antibiyotik akışı

Bakteriyel efluks pompaları tarafından aktif olarak hücre dışına taşınan çok sayıda antibiyotik vardır. Bu pompalar, Gram-negatif bakterilerin sahip olduğu doğal dirence önemli katkılarda bulunmaktadır. Bakterilerin çoğunda, efluks pompaları çeşitli tiplerde bulunabilir. Atık pompaları, enerji kaynaklarına ve yapısal özelliklerine göre beş ana kategoride gruplandırılır (Hall and Mah 2017). Bu ailelerin bazı örnekleri arasında ATP bağlayıcı kaset (ABC) ve küçük çoklu ilaç direnci (SMR) şeritleri, MATE veya çoklu ilaç ve tehlikeli bileşik ekstrüzyon sistemleri ailesi, direnç-nodülasyon-hücre bölünmesi (RND) olarak bilinen protein sınıfı ve büyük kolaylaştırıcı süper ailesi (MFS) yer almaktadır (Munita and Arias 2016).

2.8.3 Antibiyotik inaktivasyonu

- Antibiyotiklerin kimyasal modifikasyonu

Bakterilerin, ilaçların üzerindeki çeşitli kimyasal grupları bağlayabilen enzimler üretmesi mümkündür. Bu sayede antibiyotiğin öldürmesi amaçlanan bakteri hücresine bağlanması engellenir. Kimyasal grup transferi yoluyla ilaç inaktivasyonu söz konusu olduğunda, en başarılı yol fosforil, asetil ve adenil gruplarının maddeye transferidir (Lin *et al.* 2015). Asetilasyon yöntemi en sık kullanılan yöntemdir ve aminoglikozitler, kloramfenikol,

streptograminler ve florokinolonlar bu yöntemi kullandığına inanılan maddelere örnektir. Hem adenilasyon hem de fosforilasyonun aminoglikozidlerin hedeflenmesinden sorumlu mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. Aminoglikozidleri modifiye eden enzimlerin katılımıyla, aminoglikozid molekülünün hidroksil veya amino grupları kovalent bir şekilde değiştirilir ve böylece molekül inert hale getirilir. Bu, direnç ve dirence yol açan ilaç modifikasyonunun en belirgin örneklerinden biridir (Munita and Arias 2016).

- Antibiyotiklerin yok edilmesi

En sık kullanılan antimikrobiyal ilaçlar β -laktam ilaçlardır (Page 2011). Dört taraflı bir yapı olan β -laktam döngüsü, bu farmakolojik sınıfın çekirdek yapısıdır ve tüm üyeler tarafından paylaşılır. β -laktam döngüsünün yıkımından sorumlu olan β -laktamazlar, β -laktam direncinden sorumlu birincil mekanizmadır. Penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP'ler) bağlanmasını engellemek için, β -laktamazlar β -laktam halkasının sentezini hidrolize etmekten sorumludur (Bush and Bradford 2016).

2.8.4 Antibiyotik hedeflerinin değiştirilmesi

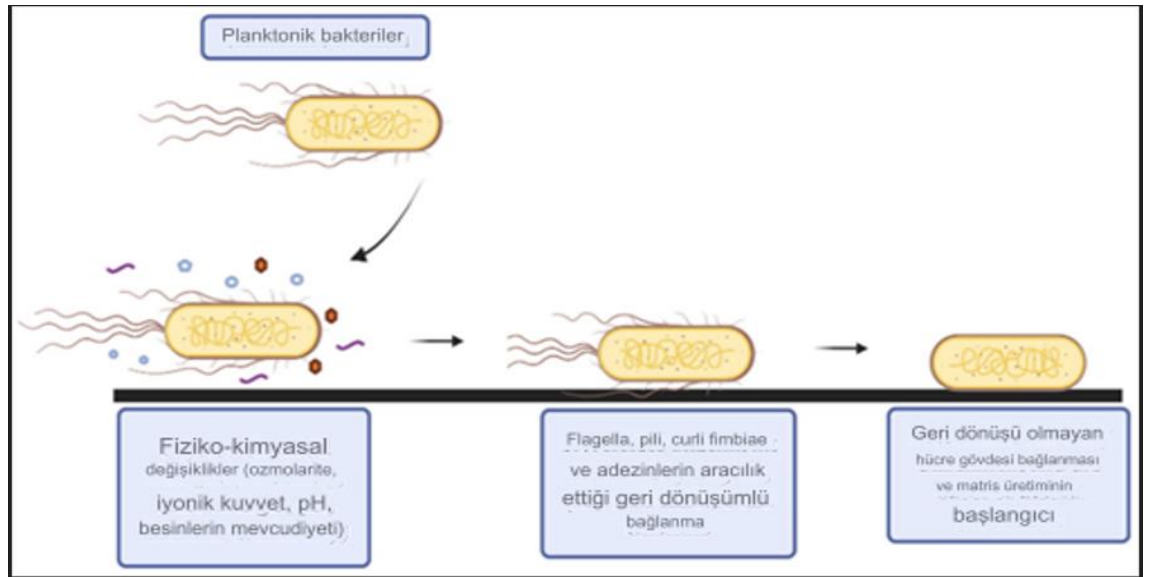
Bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesinin en tipik yollarından biri, antibiyotiğin hedefinin değiştirilmesidir (Reygaert 2018). β -laktam ilaçlara karşı çeşitli direnç mekanizmaları arasında, yollardan biri PBP'lerin konfigürasyonunda veya miktarında değişiklik gerektirir. PBP'lerin sayısındaki değişiklikler, hedefe bağlanabilen ilaç miktarı üzerinde etkilidir (Bush and Bradford 2016). Yapısal bir değişiklik sonucunda ilacın bağlanması azalacak ya da tamamen engellenecektir (Foster 2017). Bunu 16S rRNA'yı metilleyerek ve makrolidlerin, streptograminlerin ve linkozaminlerin moleküle bağlanmasını engelleyen ilaç bağlama bölgesini değiştirerek yapar (Peterson and Kaur 2018). DNA giraz veya topoizomera IV'teki değişiklikler, nükleik asitlerin sentezini engelleyen ilaçlara karşı direnç gelişiminden sorumlu olan mekanizmalardır. Bu mutasyonların giraz ve topoizomera bileşimini değiştirmesi nedeniyle, ilacın bu bileşenlere bağlanma kapasitesi ya azalır ya da tamamen ortadan kalkar (Nainu *et al.* 2021).

2.9 Biyofilm Oluşumu

İnsan mikrobiyomundaki en önemli bakterilerden biri, üzerinde kapsamlı çalışmalar yapılan *Escherichia coli*'dir. Ancak bu türlerden bazıları zararlı hale gelebilir, sadece bağırsakları değil biyofilm oluşturabilecekleri her yeri enfekte edebilir ve hastalıklara neden olabilir. *Escherichia coli*'de biyofilm oluşumunun karmaşık gelişim sürecinde yapışma (hem geri dönüşümlü hem de geri dönüşümsüz), olgunlaşma ve dağılma dahil olmak üzere çeşitli aşamalar vardır (Ballén *et al.* 2022).

2.9.1 Geri dönüşümlü bağlanma

Biyofilm gelişimindeki ilk adım, *E. coli*'nin yapışmaya elverişli yüzeyleri aramak için yarı katı veya sıvı ortamlarda göç etmesini içerir (Şekil 2.3). *E. coli*'nin bu görevi, yüzmek ve saat yönünde ve saat yönünün tersinde dönerek yüzeye ulaşmak için kullandığı kamçıları kullanarak nasıl gerçekleştirdiğini göstermektedir (Belas 2014). Ayrıca flagella, hücrenin yüzeyin itici kuvvetlerinin üstesinden gelmesine yardımcı olarak bakterinin yüzeye ulaşmasını ve yapışmasını sağlar. Flagellin alt birimleri bir araya gelerek flagella oluşturur (Fitzgerald *et al.* 2014).



Şekil 2.3 *E. coli*'nin tersinir bağlanması (Ballén *et al.* 2022)

E. coli tarafından biyofilm oluşumunun bu ilk aşamasında, iki bakteri popülasyonu tanımlanabilir: biri sürekli eksprese edilen flagella ve diğeri inhibe edilmiş flagella ekspresyonu. Bunun nedeni, *E. coli*'nin bu organeli darbeler halinde üretebilmesidir (Kim *et al.* 2020). *E. coli* ve yüzey bu aşamada tersine çevrilebilir bir etkileşim geliştirir. Çevredeki ortam değiştiğinde, bu ilişki oldukça hassastır. Bu değişiklikler, kemotaksisi olumsuz yönde düzenleyerek yüzey bağlanmasını tersine çevirme potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, kamçı kaybı, planktonik hücrelerin biyofilme dönüşmesinde stres tepkisinin neden olduğu tipik bir ilk adımdır. Hareketli olmayan türler tarafından biyofilm gelişimi, yüzey itici kuvvetlerinin üstesinden gelebilen ve substrata bağlanabilen flagella ve fimbriae ve curli gibi diğer yapışma organellerine dayanır (Vidal *et al.* 1998).

2.9.2 Geri döndürülemez bağlantı

Koşullar *E. coli*'nin sapsız bir varoluşa sahip olmasına izin veriyorsa, yüzeye tersinir bir şekilde bağlandıktan sonra geri döndürülemez hale gelebilir. *E. coli*'nin tersinir bir tutunmadan tersinmez bir tutunmaya geçtiği kontrollü mekanizma, biyofilm formuna girmeden önce yakın çevresini incelemesine olanak tanır (Goller and Romeo 2008). *E. coli* bu kalıcı bağı gerçekleştirmek için üç farklı organel kullanır. Biyofilm stabilitesi için konjugatif pili (F-pili olarak da bilinir) yatay gen transferini, hücreden hücreye teması, agregasyonu ve cansız yüzeylere spesifik olmayan yapışmayı teşvik eder (Hu *et al.* 2019). Yapışma ve biyofilm gelişimini teşvik etmek için bu plazmid, curli ve kolanik asit sentezini artırır (May and Okabe 2008). Biyofilm oluşumuna potansiyel olarak diğer uyumsuzluk gruplarından ek konjugatif plazmidler yardımcı olabilir (Ghigo 2001). Hücre toplanması ve cansız yüzeylere yapışması, kıvrımlı fimbiler olarak bilinen amiloid yapılar tarafından kolaylaştırılır (Beloïn *et al.* 2008). Bu lifler, *E. coli* biyofilm biyokütlesinin %85'ine varan büyük bir kısmını oluşturur (Salinas *et al.* 2020). Bir transkripsiyonel düzenleyici protein ve fimbriyayı ihraç etmek için gereken mekanizma iki operon tarafından kodlanırken, lifin yapısal bileşenleri diğer operon tarafından ifade edilir (Barnhart and Chapman 2006). Çevresel değişkenler ve sRNA aracılığıyla transkripsiyon sonrası modifikasyonlar, kıvrımlı üretimini başlatan birçok unsurdan ikisidir (Lüthje and Brauner 2014). *E. coli* biyofilm üretiminin erken aşamalarında, fimbria 1 veya tip 1 pili önemli bir rol oynamaktadır. Fimbria H proteini bir lektin alanına sahip olduğu için *E.*

coli ökaryotik hücreler ve cansız yüzeyler üzerindeki mannoza tutunabilmektedir (Beloïn *et al.* 2008). Biyofilmler, bakteriler kendilerini yüzeylere ve birbirlerine bağladıklarında oluşur. Dış membran proteini Ag43 bakteriyel agregasyonu teşvik eder ve bu hücreden hücreye temasta önemli bir rol oynar (Laganenka *et al.* 2016).

2.9.3 Olgunlaşma

Biyofilmler olgunlaşarak tamamen oluşmuş topluluklar haline geldikçe, matris oluşumu devreye girerek biyo-filmin nihai yapısını ve uzamsal organizasyonunu şekillendirir (Şekil 2.4). Matris, besinlerin ve atıkların biyofilmler boyunca taşınmasına izin verir, hücreler arası teması uyarır ve biyofilmleri stabilize eder (Rabin *et al.* 2015). Bu aşamada, biyofilm hücreleri bir çerçeve oluşturmak için bir araya toplanır. Polisakkaritler hücre-sel iletişimi teşvik eder ve kararlı kovalent bağlar yoluyla biyo-filmin stabilitesini sağlar (Flemming and Wingender 2010).

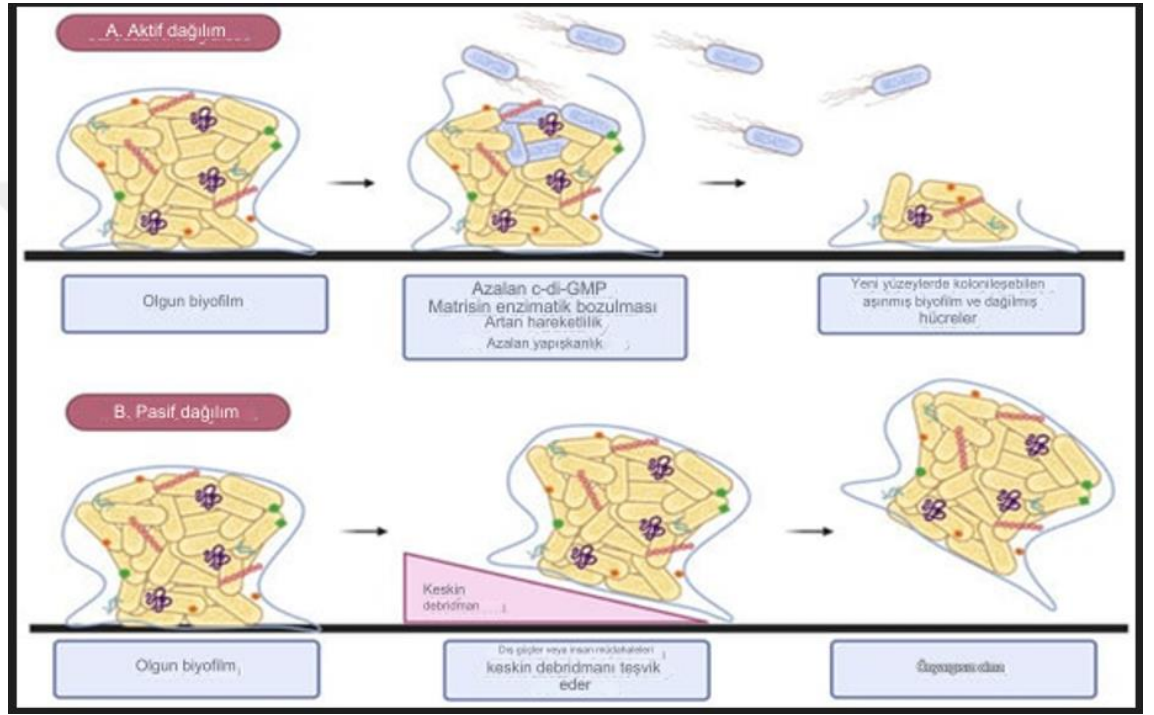


Şekil 2.4 Biyofilm olgunlaşması (Ballén *et al.* 2022)

2.9.4 Dağılım

Biyofilm gelişimi dağılıma süreciyle sonuçlanır. Bu adım, bakterilerin biyofilmden ayrılmasını teşvik ederek çevresel dağılıma ve diğer yüzeylerin veya nişlerin kolonizasyonuna kapı açar. Biyofilmlerin yayılmasını teşvik edebilecek koşullar arasında pH'daki değişiklikler, zayıf oksijen ve besin mevcudiyeti ve diğer stres faktörlerinin yanı

sıra yüksek miktarda zararlı kimyasallar yer alır (Kostakioti *et al.* 2013). Biyofilmden hücre salınımına aracılık eden iki yol vardır: (i) Dağılma sırasında, bakteriler biyofilmleri enzimlerle parçalayarak aktif bir şekilde biyofilmlerden kurtulur; bu, aşınmış biyofilmleri geride bırakır ve bakteriyel büyüme için yeni fırsatlar yaratır (Singh *et al.* 2021). (ii) Pasif ayrılmanın gerçekleşmesi için sıvı kesme basınçları, aşınma ve insan müdahalesi gibi dış kuvvetlerin mevcut olması gerekir (Şekil 2.5) (Rumbaugh and Sauer 2020).



Şekil 2.5 *E. coli*'nin biyofilm dağılımı (Ballén *et al.* 2022)

2.10 Shiga Toksini Üreten *E. coli*

Sağlıklı bireylerde hastalığa neden olabilen ishal yapıcı *E. coli* iyi tanımlanmış altı kategoriye ayrılabilir: enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), entero-invaziv *E. coli* (EIEC) ve diffüz olarak yapışan *E. coli* (DAEC) (Croxen *et al.* 2013). İzolattaki virülans faktörlerinin profilini temsil eden patojenik özellikler temelinde, diyarejenik *E. coli* grupları birbirinden ayrılır. Eşlik eden virülans faktörlerinin varlığı olmaksızın Shiga toksini taşıyan suşları ayırt etmek için bunları STEC olarak adlandıracağız. STEC'in bir insan patojeni olarak tanımlanması ilk kez 1982 yılında, *E. coli* O157:H7'nin iyice

pişirilmemiş kıyma alımıyla bağlantılı iki hemorajik kolit salgınından sorumlu olmasıyla gerçekleşmiştir (Gomes *et al.* 2016a). O zamandan bu yana, STEC'in farklı serotiplerinin yanı sıra sadece STEC O157:H7 vakalarıyla ilişkilendirilen gıda kaynaklı hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom (HUS) salgınlarına dair çok sayıda rapor bulunmaktadır. Tüm dünyada bu salgınlar patlak vermiştir. STEC enfeksiyonlarının gıda zincirine girmesinin başlıca yolu, kesim sırasında etin kontaminasyonudur. Bunun nedeni STEC'in sığır gibi geniş getiren hayvanların gastrointestinal sistemlerinde bulunmasıdır. STEC O157:H7 serotipi, STEC ile bağlantılı enfekte insanların ana serotipi olmuştur ve çoğu tespit yöntemi bu serotip üzerinde yoğunlaşmıştır. STEC'leri tespit etmek için çoğu tespit yaklaşımı Shiga toksini ve/veya Shiga toksini genlerine odaklanmıştır. Bu durum, O157 dışı STEC vakalarının daha fazla ortaya çıkmasına neden olmuştur. Dünya genelinde, STEC enfeksiyonları rapor edilen gastroenterit vakaları listesinin başında yer almaya devam etmektedir. Bazen HUS gibi hastanın hayatını tehlikeye atan ciddi bir komplikasyon görülebilir (Jun Terajima *et al.* 2017).

2.11 Shiga Toksini Üreten *E. coli* İnsan Enfeksiyonunun Kaynağı

2.11.1 Kontamine olmuş az pişmiş sığır eti ürünleri

STEC enfeksiyonunun bulaşmasının ana yolu sığırlardan elde edilen çiğ veya az pişmiş yemeklerin yenmesidir. Bunun nedeni, kusurlu gıdaların tüketilmesinin insanlarda STEC enfeksiyonunun başlıca kaynağı olmasıdır. Bir restoran zincirinin çeşitli eyaletlerde hamburger satması, (O'Brien *et al.* 1993), az pişmiş hamburger içeren diğer birkaç olaya ek olarak (Torso *et al.* 2015) bir salgınla doğrudan ilişkilendirilmiştir. Araştırmacılar kıymayı, hastalığı çok iyi bulaştırması nedeniyle STEC'in etkeni olarak tanımlamıştır. Ayrıca evde pişirilen hamburgerlerin de söz konusu olduğu ortaya çıkmıştır (Rivas *et al.* 2003). Çiğ veya az pişmiş sığır eti ürünlerinin kontamine bakterileri insanlara bulaştırma potansiyelinin daha yüksek olduğunu söylemeye gerek yoktur. Nitekim 2010 yılında çiğ sığır karaciğeri tüketimi sonucunda ortaya çıkan STEC O157 enfeksiyonları (Division 2011a), çiğ yumurta sarısı ve sığır etiyle yapılan bir Kore lezzeti olan Yukhoe'nin yenmesi nedeniyle patlak veren geniş çaplı bir STEC O111 salgını (Division 2012), bir restoran

zincirinin yaygın salgını ve küp şeklinde sığır etinin yenmesi (Division 2011b) gibi çeşitli sorunlardan bu ürünler sorumlu tutulmaktadır.

2.11.2 Kirlenmiş taze ürünler

Ürün, bakterinin bulaşması için bir araç olmasının yanı sıra, STEC'in çiğ veya işlenmiş meyve ve sebzelerle bağlanması için de bir araç olmuştur. Bir dizi HUS vakasında, büyük salgınlar marulla ilişkilendirilmiştir. 2011 yılında Avrupa Birliği'nde büyük bir O104:H4 salgını görülmüş ve bu da sürgünlerin tüketimiyle ilişkilendirilmiştir (Beutin and Martin 2012). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezlerinin (CDC) ürünlerle ilgili hastalık salgınlarını takip eden verilerine dayanarak, en yakından bağlantılı ürün yeşil yapraklı sebzeler olmuştur (Erickson and Doyle 2012). Bu durum tüm ürünler için geçerliydi. Genel olarak, salgınlar kontamine gıda ve yapraklarla ilişkilendirilmiştir; STEC O157:H7'nin köklere tutunabildiği ve köklere girebildiği gösterilmiştir (Wachtel *et al.* 2002). İsveç'teki bir salgın, yanlış işlenmiş sosislerle ilişkilendirilmiştir (Sartz *et al.* 2008). Ancak fermente ürünler, işleme parametrelerinin yetersiz olması durumunda bir enfeksiyon yöntemi sunabilir. Salgına dahil olan sebzelerden bazıları salamura sebzeler ve hafifçe tuzlanmış ve salata gibi taze olarak tüketilen sebzelerdir. Japonya'da STEC O157:H7 ile kontamine olduğu tespit edilen hafif tuzlanmış somon yumurtasının suşi garnitürü olarak kullanılması nedeniyle bir salgın patlak vermiştir (Terajima *et al.* 1999).

2.11.3 Çevre aracılı iletim

Bazı salgınlar, gübre ile dolu olması gereken otlak alanlarda düzenlenen halka açık etkinliklerle ilişkilendirilmiştir (Strachan *et al.* 2001). Bazı STEC salgınları halka açık toplantılarla ilişkilendirilmiştir ve gübre bu hastalık için önemli bir vektördür. Minnesota'daki bir sporadik STEC O157 enfeksiyonu vakasında hasta bahçe toprağında bulunan izolatlar, kompostla karıştırılmış toprakta iki aydan fazla yaşayabilmiştir. İnsanlarda görülen STEC salgınlarının büyükbaş hayvanların da yer aldığı tarım fuarlarıyla ilişkili olma ihtimali yüksektir (CDC 2012). STEC O157 salgınıyla bağlantılı olarak yürütülen soruşturmanın bulgularına göre, binanın yaygın kirliliği hastalığın kaynağı olabilir. Belirli yiyecek veya içecek sağlayıcılarını tanımlayan herhangi bir kanıt

bulunamamasına rağmen, binanın kireşleri STEC O157 için test edilmiştir (Varma *et al.* 2003). Su yoluyla bulaşan STEC'in neden olduğu enfeksiyonlar bir dizi münferit vakada ve salgında rapor edilmiştir (Muniesa *et al.* 2006). STEC salgınları, özel su kaynaklarından su içmenin yanı sıra göllerde ve havuzlarda yüzmeye de ilişkilendirilmiştir (Verma *et al.* 2007).

2.11.4 Doğrudan temas

El yıkama, insan-hayvan temasından kaynaklanan bulaşma riskini sınırlamak için alınabilecek en temel önleyici tedbirdir (National Association of State Public Health Veterinarians, and Centers for Disease Control 2011). STEC, insanlar ve hayvanlar arasında doğrudan temas yoluyla bulaşabilir. STEC salgınlarının genellikle halka açık alanlardaki hayvanlarla bağlantılı olduğu görülmüştür. Hayvanat bahçelerine veya çiftliklere yapılan ziyaretlerin yanı sıra kuzu besleme etkinliklerine katılım sırasında meydana gelen HUS vakaları, çocukların en savunmasız grup olduğunu vurgulamaktadır (Rowell *et al.* 2016). STEC'in insandan insana bulaşma süreciyle insanlara geçmesi mümkündür. Amerika Birleşik Devletleri'nde Ulusal Salgın Raporlama sistemi aracılığıyla gıda yoluyla bulaşan kırk STEC salgınının rapor edildiği tahmin edilmektedir. Buna ek olarak, kişisel temas yoluyla bulaşan beş STEC salgını daha rapor edilmiştir (Wikswa *et al.* 2012). Çocukların dar ortamları, gelişmekte olan bağışıklık sistemleri ve öz bakım becerilerinin eksikliği ile STEC'in kreşlerde bulaşmasına katkıda bulunabilir (Kanayama *et al.* 2015).

2.12 Shiga Toksini Üreten *E. coli*'nin Virülansı ve Patogenezi

2.12.1 Shiga toksini

Sargassum enteritidis serotip 1 ve *Shigella typhi* toksinleri (Stxs) patojenik sürecin önemli bileşenleridir. STX'lerden böbrekleri ve merkezi sinir sistemini etkileyen sistemik sorunlar gelişebilir ve bağırsak hasarını kötüleştirirler. Dizanteri salgını sırasında dizanteriye neden olan Shiga basilini keşfeden Dr. Kiyoshi Shiga'nın onuruna bu toksin

verilmiştir (Trofa *et al.* 1999). Bazı *Escherichia coli* suşları Vero hücrelerini öldürebilecek bir sitotoksin üretir; bu toksin Konowalchuk ve arkadaşlarının araştırmasından sonra Vero sitotoksini veya Verotoksin olarak adlandırılmıştır (Doughari *et al.* 2009). Ayrıca, bir hemorajik kolit salgınına *E. coli* O157:H7 suşu tarafından üretilen Shiga benzeri bir toksinin neden olduğu iddia edilmiş (Muniesa *et al.* 2012), bu toksinin *Escherichia coli* O157:H7'nin ürettiği verotoksin ile aynı olduğu doğrulanmıştır (Piérard *et al.* 2012). Bu toksin artık iki isimle bilinmektedir: Shiga toksinleri ve Verotoksinler. *S. dysenteriae* serotipi tarafından üretilen prototip Shiga toksinine kıyasla antijenik özelliklerine dayanarak, STEC iki tür Stx üretmektedir: tip 1 (Stx1) ve tip 2 (Stx2) (Scheutz 2014). Saf Stx2 uygulandığında farelerdeki medyan ölümcül dozajın 400 kat daha düşük olduğu bulunmuştur (Liu *et al.* 2011), ayrıca insan böbrek endotel hücrelerini Stx1'den bin kat daha etkili bir şekilde öldürür (Girard *et al.* 2015). Stx2 üreten STEC O157:H7 suşlarının Stx1 üretenlere kıyasla HUS ile daha sık bağlantılı olduğuna dair epidemiyolojik kanıtlar bulunmaktadır (Scheutz 2015). Moleküler olarak, Shiga toksin ailesinin bu üyeleri monomerik A ve pentamerik B olarak yapılandırılmıştır (Conrady *et al.* 2010). A katalizörü Hücre yüzeylerindeki glikosfingolipid globotriaosylceramide-3 (Gb3) reseptörlerine bağlanan B alt birimi, bir alt birime kovalent olmayan bir şekilde bağlanan özdeş B segmentlerinin bir pentamerinden oluşur (Allen 2013). Toksinler Gb3 reseptörlerine bağlandığında, hücre tarafından alınır ve retrograd hücre içi taşıma yoluyla ER'ye gönderilir. Proteoliz ve disülfid bağı indirgenmesi, endoplazmik retikulumla taşıma sırasında katalitik A alt birimlerini B alt birimlerinden ayırır (LaPointe *et al.* 2005). Katalitik A alt birimi, ökaryotik ribozomların 28S ribozomal RNA'sının bir adenin bazını kesen spesifik bir RNA N-glikozidaz aktivitesine sahip olduğundan (Endo 2014), uzama faktörüne bağlı amino-asil tRNA bağlanmasını ve ardından zincir uzamasını engeller (Clark *et al.* 1994).

Toksinin endoplazmik retikulumla (ER) taşınması ve ardından katalitik A alt birimlerinin sitoplazmaya retro-translokasyonu konak hücrelerde protein sentezini inhibe eder, ribotoksik stres ve endoplazmik retikulum stres yanıtlarını aktive eder ve nadir durumlarda apoptozu, sitokinleri ve kemokinleri indükler (Johannes and Römer 2010). Lambdoid profajların genomları içinde, faj geç gen promotörünün hemen aşağısında, STEC suşlarında bulunan stx genleri bulunur (Waldor and Friedman 2005). Stx1 ifadesi

düşük demir konsantrasyonlarında bile indüklenebilir çünkü demirle düzenlenen otantik promotör tarafından kontrol edilir (Berger *et al.* 2019), Geç promotör *stx2* ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Tyler *et al.* 2004). *Stx* sentezi, mitomisin C gibi DNA'ya zarar veren kimyasallar tarafından profaj indüksiyonu ile artırılabilir. Bu nedenle STEC suşlarındaki *stx* sentezi, *stx* kodlayan fajlarla yakından bağlantılıdır (Wagner *et al.* 2001).

2.12.2 Enterositin efasman lokusunun yapışıklıkları

Hem STEC hem de EPEC bağırsak epitelinde yapışma ve silinme (A/E) olarak bilinen lezyonlara neden olabilir (Liu 2015). Daha önce EPEC enfeksiyonunda belirtildiği gibi, A/E lezyonları insanlardan ve enfekte hayvanlardan alınan bağırsak biyopsi örneklerinde yaygın histolojik bulgulardır; bu lezyonlar mikrovillusların silinmesi ve epitel hücrelerinin yüzeyi ile bakteri arasında yakın yapışma ile tanımlanır (Lewis *et al.* 2015). Kromozom üzerindeki 35 kb'lik bir bölgenin EPEC ve STEC izolatlarında A/E lezyon gelişiminden sorumlu bakteriyel genleri içerdiği gösterilmiştir (Stevens and Frankel 2014). Enterosit efasman lokusu (LEE) olarak bilinen bu özel lokus, hastalığa neden olmayan *E. coli* suşlarında bulunmaz, ancak A/E lezyonuna neden olabilen EPEC ve STEC bakterilerinde mevcuttur. EHEC, LEE için pozitif test yapan STEC serotiplerine verilen isimdir (Michelacci 2013), HUS ve salgın hastalıklar söz konusu olduğunda, LEE-pozitif STEC serotipleri, LEE-negatif serotiplerden çok daha sık bağlantılıdır (Vélez *et al.* 2020). Bir tip III salgı sistemi, salınan birkaç protein, intimin Tri için translokasyonlu bir reseptör, intimin olarak bilinen bir bakteriyel adezin ve LEE'nin kendisi beş ana operon tarafından kodlanır (Stevens and Frankel 2014). *Eae* geni, A/E lezyonlarının gelişimi için gerekli olan dış membran proteini intimin'i kodlar (Blanco *et al.* 2004). A/E lezyonları, konak hücre zarının yüzeyine çekilen intimin, tip III salgı sistemi tarafından hücre içine taşındıktan sonra Tir'e bağlandığında başlar (Lai *et al.* 2013). STEC'in yapışkan nitelikleri, en önemlisi intimin olan çeşitli adezinler tarafından geliştirilmiştir (Farfan and Torres 2012).

2.12.3 Asit toleransı

Asitliğe dayanabildiği için STEC, tahminlere göre 100 veya daha az organizma bulaşıcı dozajına sahiptir (Chaucheyras-Durand *et al.* 2010). Ekşi kremanın bakterinin asidik mide ortamında hayatta kalma şansını arttırdığından bahsetmeye bile gerek yok (Birk *et al.* 2012). *E. coli*'nin aside direnç mekanizması, glikoz baskılı bir sistemin yanı sıra glutamat ve arjinine dayanan sistemlerden oluşur (Richard and Foster 2003). Glikoz baskılı bir sistem rpoS (sigma faktörünü kodlayan gen) ifade edemez, ancak amino asit bağımlı bir sistem glutamat ve arginin dekarboksilaza sahip olmalıdır. Glutamat ya da arginin dekarboksilasyona uğradığında, iki dekarboksilaz sisteminin proton kullandığı ve bunun da hücrenin iç pH'ının tehlikeli seviyelere düşmesini engellediği düşünülmektedir (Richard and Foster 2004).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Aletler ve teçhizat

Çalışmada kullanılan tüm alet ve ekipmanlar Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar

Ekipman ve aletler	Şirket (Menşei)
Ayarlanabilir Mikro Pipet 0.5-10 µl, 10-100µl, 20- 200µl, 100-1000µl	Termo Bilimsel (Finlandiya)
Otoklav	Hirayama (Japonya)
Santrifüj	Evrensel/16A (Almanya)
Soğutma santrifüj	Eppendorf (Almanya)
Derin dondurucu -80	Bağlayıcı (Almanya)
Kuru vidalı konteyner	Çin
Eppendorf tüpler 1.5 santrifüj tüp	Promega (ABD)
Filtre ipuçları	Kartell (İtalya)
Jel	Cleaver (İngiltere)
Jel elektroforezi sistem	Eppendorf (Almanya)
Jel tüpü	Hilab (Hindistan)
Gradyan Termodöngücü	Eppendorf (Almanya)
Hot plate	VLEP (Almanya)
Kuluçka makinesi	
Mikro spin Santrifüj	Eppendorf (Almanya)
Mikro pipetler	Eppendorf (Almanya)
Plaka kültür	Çin
qPCR	Sacace (İtalya)
Nano düşüşü	Invitrogen (ABD)
Mikrotitre plaka	AFCO (Çin)
ELISA yıkayıcı sistem	Biorad (ABD)
Raflar için tüpler	Deans gate (Çin)
Buzdolabı	Kelon (Kore)
Hassas denge	Denver (Avrupa Birlik)
Sterilize lateks cerrahi eldivenler	Dekanlar kapısı (Çin)
Termomikser	Eppendorf (Almanya)
UV ışığı sistem	Eppendorf (Almanya)
Vitek2 kompakt otomatik sistem (ID/AST cihazı)	Biomerieux (Fransa)
Vorteks	VLEP (Almanya)
Su banyosu	GFL (Almanya)
Su damıtıcı	GFL (Almanya)

3.1.2 Kimyasal malzemeler

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasal malzemeler Çizelge 3.2'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasal malzemeler	Şirket (Menşei)
Mutlak etil alkol (%99,9)	Elmas (Fransa)
Agaroz	Satır (İngiltere)
ddH ₂ O	Bariq (Irak)
DNA işaretleyici (100-1000) bp	NEP (İngiltere)
Nükleazsız su	NEP (İngiltere)
MgCL ₂	NEP (İngiltere)
Normal salin	Bioneer (Irak)
Nükleaz Özgür su	NEP (İngiltere)
Kırmızı güvenli boya	Intron (Güney Kore)
Hidrojen Peroksit (%3H ₂ O ₂)	Hi-media (Hindistan)
Oksidaz reaktif	Hi-media (Hindistan)
Katalaz reaktif	Hi-media (Hindistan)
Gliserol %25	Bariq (Irak)
Sodyum asetat %2	Hi-media (Hindistan)
Etanol	Hi-media (Hindistan)
Kristal menekşe %1	Hi-media (Hindistan)
SYBR® Yeşil Boya	Intron (Güney Kore)
TAB- Tampon (50x)	Carl ROTH (Almanya)

3.1.3 Kitler

Çalışmada kullanılan kitler Çizelge 3.3'te listelenmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kitler

Kitler	Şirket (menşei)
cDNA kiti	Zimo araştırma (ABD)
Geleneksel PCR kiti	Zimo araştırma (ABD)
DNA ekstraksiyon kiti	WizPrep™ (Kore)
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Evrensel	KAPA / ABD
OneTaq 2X Ana Karışım	NEB (İngiltere)
Primerler	Alfa DNA/ABD/Kanada
PrimeScript™ RT reaktif Kiti	TaKaRa / Japonya
Qubit™ dsDNA HS - Test Kiti	ThermoFisher (ABD)
Quick -RNA Fangal / Bakteriyel Mini hazırlık kiti (R2014)	Zimo Araştırma (ABD)
RNA ekstraksiyon kiti	Zimo araştırma (ABD)
RT qPCR kiti	Zimo araştırma (ABD)
1 VITEK® 2 AST Kartları	Biomerieux (Fransa)
2 VITEK® 2 GN ID kartı	Biomerieux (Fransa)
Wizard Genomik DNA saflaştırma Kiti	Promega (ABD)

3.1.4 Kültür medya

Çalışmada kullanılan kültür ortamları Çizelge 3.4'te listelenmiştir.

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan Kültür ortamları

Kültür medya	Şirket (Menşei)
Kanlı agar	Himedia (Hindistan)
Beyin kalp infüzyon suyu	
Beyin kalp infüzyon agarı	
MacConkey Agar	
Eozin metilen mavisi agar	
Üçlü Şeker Demir (TSI)	
Üre agar bazı	
Simmon sitrat	
Uraz bazı	
Sorbitol agar	

3.1.5 Primerler

Bu çalışmada kullanılan amplifikasyon primerleri ve dizileri Çizelge 3.5 ve 3.6'da listelenmiştir.

Çizelge 3.5 Konvansiyonel-PCR'da kullanılan primerler ve dizileri

Hedef gen		Sıra ("5-----3")	Amplifikasyon boyutu (bp)	Gen Bankası kodu
<i>HylA</i>	F	AGGGATGCTTTACTCGCAG	513	>KM596784.1
	R	AACTCCTTCGGTTGAGCCTC		
<i>Fli C</i>	F	TGGATAGCACCCAGGGAAGA	475	>OP600235.1
	R	CAACTCCTGGCGACAACCTCT		
<i>Stx1</i>	F	TCACACTGAACTGGGGGAGA	555	AB012102.1
	R	ATCCTGAACCTGACGCACAG		
<i>Stx2</i>	F	TGTGTATACGATGACGCCGG	687	AB052227.1
	R	GTCCTGGCCTATACGGAGC		
<i>rfb - O157</i>	F	GCCAAAGATCTTGAAGCCGC	400	AF049343.1
	R	ACGAACCGAGGAAAAGCAGT		
<i>16r RNA</i>	F	CCACACTGGGACTGAGACAC	1500	
	R	CCACTCCCGCTAACGTTCTT		

Çizelge 3.6 Gerçek Zamanlı PCR'da kullanılan primerler ve diziler

Hedef gen		Sıra ("5-----3")
<i>Stx1</i>	F	TACGATGACACCGGAAGAAGTG
	R	AAACTCCGGAAGCACATTGC
<i>Stx2</i>	F	TGTCTATCAGGGCGCGTTTGT
	R	ATGGAAACCGTTGTCACACC

3.2 Yöntem

3.2.1 Çalışma tasarım, biyogüvenlik ve dezenfeksiyon

Bu çalışmada Nasiriye Eğitim Hastanesi'nde ishal ve idrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan 200 örnek (dışkı ve idrar) toplanmıştır. Her aşama aseptik bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Örnek toplama sırasında steril laboratuvar önlükleri, eldivenler ve maskeler kullanılmıştır. Kültür, biyokimyasal test, DNA ve RNA ekstraksiyonu, ters transkripsiyon ve standart ve gerçek zamanlı PCR reaksiyon karışımlarının oluşturulması aşamalarının tümü biyogüvenlik kabininin kullanımını ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak yüzeyi temizlemek için %70 etanol, ardından RNase dekontaminasyon solüsyonu kullanılmış ve son olarak çalışma yüzeyi yaklaşık 20 dakika boyunca UV radyasyonuna

maruz bırakılmıştır. Etik onay açısından, her hastaya araştırmanın ayrıntıları açıklandıktan sonra doğrudan görüşme yoluyla sözlü onay alınmıştır.

3.2.2 Örneklerin toplanması ve işlenmesi

İshalli hastalardan belirli miktarda dışkı örneği ve idrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan 3 ml orta akım idrar örneği temiz, steril bir kap kullanılarak toplanmıştır. Laboratuvara ulaştıktan sonra, tüm örnekler hemen Kanlı agar, MacConkey, Eozin metilen mavisi agar ve sorbitolde kültüre alınmıştır. İnkübasyon ve gözlenen büyümenin ardından, her bir *E. coli* pozitif üremeden alınan tek koloniler biyokimyasal testlere tabi tutulmuş ve tanıyı doğrulamak ve antibiyotik direnç profilini belirlemek için VITEK-2 sistemi kullanılarak incelenmiştir. Tüm *E. coli* pozitif örnekler bir mikrotitre plakası kullanılarak biyofilm oluşturma kabiliyetlerini belirlemek için araştırılmıştır. Beyin kalbi infüzyonu (agar ve broth) kullanılarak tüm pozitif üremelerin korunmasından ve bakteri izolatlarının reaktivasyonundan sonra, DNA ve RNA ekstraksiyonu yapılmış ve ardından kalan tüm işlemler gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Bakteriyel izolatların korunması

Uzun süreli saklama için, bakteri izolatları %25 gliserol ile desteklenmiş Beyin kalp infüzyon agarı üzerinde saklanmıştır. Ek olarak, izolatlar -70 santigrat derece sıcaklıkta (derin dondurucu) birkaç ay boyunca dondurulmuş olarak tutulmuştur.

3.2.4 Kültür ortamının hazırlanması

Kimyasal testler için tüm kültür ortamları ve çözeltiler üretici tarafından hazır ve yasaklı olarak satın alınmış ve deneylere başlamadan önce laboratuvarında otoklav kullanılarak sterilize edilmiştir.

3.2.5 Bakteri izolatlarının geleneksel yöntemlerle izolasyonu ve tanımlanması

- Bakteri izolatlarının kültür ortamındaki morfolojilerinin belirlenmesi

Bakteri izolatlarının belirli özelliklerini tanımlamak ve belirlemek için çeşitli besiyerleri kullanılmıştır. Kanlı agar plaklarında gelişen kolonilerin şekli, boyutu, rengi ve kan hemoliz paterni değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma için izole edilen her bakteri suşu, laktoz şekerini üretilip fermente edip edemediklerini ve metalik yeşil bir parlaklık oluşturup oluşturamadıklarını görmek için MacConkey agar ve Eosin Metilen Mavisi agar üzerinde büyütülmüştür. Ayrıca, tüm bakteri izolatları sorbitolü fermente etme kapasitesine sahip olup olmadıklarını değerlendirmek ve sorbitolü fermente etmeyen O 157:H7 izolatları ile sorbitolü fermente eden O 157:H7 olmayan izolatları ayırt etmek için sorbitol agarda büyütülmüştür.

- Bakteri izolatlarının biyokimyasal özelliklerinin çeşitli biyokimyasal testler kullanılarak belirlenmesi

A- Katalaz testi

Bakterilerin katalaz enzimi üretme kapasitesi, yüzde üç konsantrasyonda hidrojen peroksit hazırlanması ve kullanılmasıyla belirlenmiştir. Bakteri üremesinden elde edilen saf koloniler tahta çubuk kullanılarak temiz lam üzerine aktarıldıktan sonra birkaç damla reaktif uygulanmış ve bakterilerle karıştırılmıştır. Lam daha sonra mikroskop altında incelenmiş ve kabarcıkların ortaya çıkması testin pozitif olduğunu göstermiştir.

B- Oksidaz testi

Bu reaktif, 0,1 gram "N, N, N-tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür"ün 10 mililitre damıtılmış suda ıslatılmasıyla koyu renkli bir kaptaki yeni yapılmıştır. İncelenen organizmaların bir kolonisi filtre kağıdına taşınmış, ardından koloniyi reaktifin içine

dağıtmak için bir aplikatör çubuğu kullanılmıştır. Testten sonra 10 ile 15 saniye arasında mavi-mor bir renk oluşması pozitif sonucu ortaya çıkarmıştır.

C- İndol testi

Bakterilerin triptofanaz enzimi üretme kapasitesi bu test ile araştırılmıştır. Değerlendirilen bakteri kültürü, üretici tarafından sağlanan talimatlara uygun olarak daha önce üretilmiş bir peptonlu su brothuna eklenmiştir. Karışım daha sonra yirmi dört saatlik bir süre boyunca 37 santigrat dereceye kadar ısıtılmıştır. Yirmi dört saatlik inkübasyonun ardından Kovac's olarak bilinen reaktiften birkaç damla damlatılmıştır. İndikatörün eklenmesinden bir ila üç dakika sonra test edilen tüpün üst kısmına yakın kırmızı bir halkanın ortaya çıkması, bu test için pozitif bir sonuç olduğunu, sarı bir halkanın varlığı ise negatif bir sonuç olduğunu gösterir.

D- Metil kırmızısı testi

Şeker fermantasyonunun ve bakteriler tarafından asitlik oluşumunun kalitatif incelemesi, üretici tarafından sağlanan talimatlar takip edilerek gerçekleştirilmiştir: metil kırmızısı besiyeri hazırlanmış, test edilen bakteri kültürleri steril bir halka kullanılarak eklenmiş ve ardından yirmi dört saat boyunca 37 santigrat derecede inkübe edilmiştir. Reaktif, test tüpüne üç ile beş damla miktarında eklenmiş ve sonuç kısa bir süre sonra kontrol edilmiştir. Sıvının kırmızı olması testin pozitif olduğunu gösterir.

E- Vogas-Proskauer testi

Bakterilerin nihai ürün olarak asetil metil karbinol (asetoin olarak da bilinir) oluşturma kapasitesi bu testin uygulanması ile değerlendirilmiştir. İncelenen bakteriler Vogas-Proskauer broth'tan oluşan bir besiyerinde büyütülmüş ve daha sonra yirmi dört saatlik bir süre boyunca 37 santigrat dereceye kadar ısıtılmıştır. Bundan sonra, bir mililitre KOH çözeltisi ve üç mililitre alfa-naftol çözeltisi et suyu kültürüne eklenmiş ve otuz dakika sonra gözlemlenmiştir. Alfa-naftol ile birleşen asetoin'in diasetil'e oksidasyonu, ortamın

rengini sarıdan pembeye değiştirmesi açısından faydalı bir etkiye sahiptir. Bu, reaksiyonun başarılı olduğunun bir göstergesidir.

F- Sitrat testi

Bu testin amacı, bakterilerin karbon bazlı metabolik yol için bir kaynak görevi gören sodyum sitratı metabolize edip edemediğini belirlemektir. Simmon's sitrat agar besiyeri, üretici tarafından sağlanan talimatlara uygun olarak üretilmiştir. Test edilen izolatlar steril bir halka kullanılarak hazırlanan besiyerinin üzerine yayılmış ve ardından besiyeri yirmi dört saat boyunca 37 santigrat dereceye kadar ısıtılmıştır. Bir gecelik inkübasyondan sonra kültür ortamının rengi yeşilden maviye dönerse bu testten başarılı bir sonuç alındığını gösterir.

G- Üçlü şeker demiri

Bu test, oluşacak fermentasyon türünün yanı sıra bakteriler tarafından fermente edilebilecek şeker türünü belirlemek için gerçekleştirilmiştir. İncelenen bakteri kültürü, glikoz, laktoz ve sükroz olmak üzere üç farklı şeker formunu içeren üçlü şekerli demir agar eğimli besiyerine saplanarak ve çizilerek ekilmiştir. Besiyeri daha sonra gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından sonuç, ortam tabanının ve eğimin rengine göre belirlenmiştir. şekerler fermentasyonu tamamladıktan sonra besiyeri sarı olur ve şeker fermentasyonundan kaynaklanan asit üretimi tabanın renginin kırmızıdan sarıya değişmesine neden olur. şekerin aerobik fermentasyonu sonucu besiyerinde kabarcıklar oluşabilir ve demir sülfat ile anaerobik fermentasyon sonucu oluşan H₂S arasındaki etkileşim sonucu dipte siyah kalıntı oluşabilir.

H- Üreaz testi

Üreaz testi, bakterilerin üreaz enzimi üretme kapasitesine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Yirmi dört saat boyunca 37 santigrat derecede inkübasyondan sonra, üre agardan oluşan bir besiyerine değerlendirilen saf bakteri

kolonisi ekilmiştir. Besiyerindeki sarıdan pembeye değişim olumlu sonuçlara işaret etmektedir.

3.2.6 VITEK-2 sistemi kullanılarak bakteri izolatlarının tanımlanmasının doğrulanması ve antibiyotik direnç profilinin belirlenmesi

VITEK 2 kompakt sisteminin bakterileri tanımlama yeteneği, yalnızca VITEK kartları kullanılarak birbiriyle bağlantılı olarak gerçekleştirilebilen bir dizi biyokimyasal araştırmaya dayanmaktadır. Her kartta 46 kuyu bulunmaktadır ve bunların her biri farklı bakteri türlerini tanımlamak için kullanılabilecek farklı bir biyokimyasal test yanıtını temsil etmektedir. Bakteri süspansiyonu VITEK kartlarına yerleştirildikten sonra bulgular bilgisayara girilmiş ve VITEK sistemiyle birlikte verilen yazılım kullanılarak kaydedilmiştir. VITEK kartları, bakteri süspansiyonu içeren tüplere özel raflar üzerinde yerleştirilmiştir. Raflar VITEK sistemi için kullanılan makinede hareket ettirilmiş ve her rafın barkodu ve erişim numarası bilgisayar tarafından yakalanarak izolat hakkında gerekli bilgiler girilmiştir.

3.2.7 Mikrotiter plaka yöntemleri kullanılarak bakteri izolatları arasında biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesi

Yapışık olmayan bakteri hücrelerini ortadan kaldırmak için her bir kuyucukta distile su kullanılarak durulama yapılmıştır. Daha sonra, %2'lik sodyum asetat ile sabitlemeden önce 15 dakika oda sıcaklığında doğal olarak kurumaya bırakılmıştır. Sodyum asetat çözeltisi çıkarıldıktan sonra, maddenin bir kez daha havada kurumaya izin verilmiştir. Hücreler 900 µL %1 kristal viyole içeren kristal viyole solüsyonu ile yirmi dakika boyandıktan sonra kristal viyole solüsyonu geri çekilmiştir. Bu adımın ardından hücreler distile su kullanılarak üç kez yıkanmıştır. Optik yoğunluğu 600 nm'de ölçmeden önce, kuyucuklarda hala mevcut olan kristal viyole, yüzde 80 konsantrasyona sahip bir mililitre etanol içinde çözülmüştür. Kristal viyole arka plan boyamasını düzeltmek için kullanılmış ve bu da negatif kontrolün 600 nm'deki ortalama optik yoğunluğunun bakteri izolatları tarafından biyofilm gelişiminin 600 nm'deki ortalama optik yoğunluğundan

düşürülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama değerin yanı sıra standart sapma kullanılarak raporlanmıştır.

- İzolatlar tarafından biyofilm oluşturma yeteneğinin sınıflandırılması

Ölçülen optik yoğunluk temelinde, biyofilm üretme kabiliyetleri açısından test edilen 57 bakteri izolatu ve pozitif kontroller dört farklı gruba ayrılmıştır. OD₆₀₀ olarak adlandırılan optik yoğunluk kesme değeri, negatif kontrolün ortalama optik yoğunluğundan üç standart sapma daha yüksek olarak tanımlanmıştır.

3.2.8 Moleküler çalışma

- Depolanmış bakteri izolatlarının reaktivasyonu

Depolanan bakteri izolatları 37°C'de bir gece inkübe edildikten sonra MacConkey agara inoküle edilmiş ve ardından 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, her bir besiyerindeki bakteri izolatları beyin kalp infüzyon suyu içeren tüplere aktarılmış ve büyütüldükten sonra tüm tüpler 15 dakika santrifüj edilmiştir.

- DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyon kitinin tüm bileşenleri Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7 DNA ekstraksiyon kiti bileşenleri

İçindekiler	Hacim
Yıkama tamponu (2)	16ml
Yıkama tamponu (1)	55ml
Proteinaz K	44 gram
GT (2) Tampon	25 ml
GT (1) Tampon	25 ml
Elüsyon tampon	10ml
DNA döndürme kolonu	100 adet

- Prosedür

1- Beyin kalp infüzyon suyundan elde edilen bakteriyel solüsyondan süpernatant çıkarıldıktan sonra, peletler 180 μ L GT1 tamponu kullanılarak süspanse edilmiştir.

2- 200 μ L hacminde GT2 tamponu ve 20 μ L proteinaz K eklenmesinin ardından örnek, on dakika boyunca 56 santigrat derece sıcaklıktaki su banyosuna yerleştirilmeden önce on saniye boyunca vortekslenmiştir. Örnek inkübe edilirken her beş dakikada bir ters çevrilmiştir.

3- Örnek lizatı, bir spin tüpüne aktarılmadan önce beş saniye süreyle vorteks içinde 200 μ L mutlak etanol ile birleştirilmiş ve 1 dakika boyunca yüksek hızda döndürülmüştür. Süpernatant daha sonra çıkarılmış ve bir döndürme kolonu kullanılarak tekrar birleştirilmiştir.

4- Döndürme kolonuna 500 μ L'ye kadar yıkama tamponu (1) eklenmiş ve süpernatant atılmadan ve döndürme kolonu tekrar bağlanmadan önce 1 dakika boyunca yüksek hızda döndürülmüştür. Döndürme kolonuna 750 μ L'ye kadar yıkama tamponu (2) eklenmiş, yüksek hızda bir dakika santrifüj edilmiş, süpernatant atılmış ve döndürme kolonu tekrar bağlanmıştır. Döndürme kolonu iki dakika boyunca hızla santrifüj edilmiştir.

5- Döndürme kolonuna, değiştirilen Eppendorf tüpleri yerleştirilmiştir. Tüp daha sonra içine 50 μ L'ye kadar elüsyon tamponu döküldükten sonra bir dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından DNA, -20 santigrat derece sıcaklıkta buzdolabına yerleştirilmeden önce yüksek hızda bir dakika santrifüj edilmiştir.

- Çıkarılan DNA konsantrasyonlarının ve saflığının belirlenmesi

DNA'nın hem konsantrasyonunu hem de saflığını analiz etmek için bir Nanodrop cihazı kullanılmıştır. Nanodrop cihazı bir mikrolitre DNA'yı analiz etmek için kullanılmış ve

sonuçlar bilgisayarda gösterilmiştir. Bu deneyin amacı doğrultusunda, elüsyon tamponu boş çözelti olarak kullanılmıştır.

- Geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak hylA, rfb, fliC, Stx1, Stx2 ve 16 r RNA genlerinin tespiti

1- Primer hazırlama

Nihai konsantrasyonu 100 pmol/μL olan bir stok çözeltisi oluşturmak için liyofilize primerler nükleaz içermeyen su içinde dağıtılmıştır. Bu primerlerden 10 pmol/μL içeren çalışılabilir primer çözeltisi, 90 μL nükleaz içermeyen su ile 10 μL primer stok çözeltisi karıştırılarak oluşturulmuştur.

2- PCR reaksiyonu karışımındaki reaktiflerin hacminin belirlenmesi

Virülans genlerinin varlığını tespit etmek için spesifik bir primer seti kullanılmıştır. Tespit, *Escherichia coli* izolatlarından ekstrakte edilen bir DNA şablonundaki hylA, rfb O157, fliC, Stx1, Stx2 ve 16r RNA genlerinin her bir gen için 25 μL hacminde bir reaksiyon karışımı kullanılarak amplifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. PCR'nin çoğaltılmış ürünleri %1,5 agaroz jel üzerinde elektroforeze tabi tutulmuştur. Çizelge 3.8 PCR karışımı reaktiflerinin nihai hacimlerini göstermektedir

Çizelge 3.8 PCR karışımının reaktifleri

Bileşenler	HylA	RFB	FliC	Stx1	Stx2	16r RNA
Ana karışım	12μL	12 μL	12 μL	12 μL	12 μL	12 μL
İleri primer	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
Ters primer	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
DNA şablonu	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
ddH2O	6 μL	6 μL	6 μL	6 μL	6 μL	6 μL
Hacim	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL

3-PCR programı

hlyA, rfb O157, fliC, Stx1, Stx2 ve 16r RNA genlerinin PCR amplifikasyon programı sırasıyla Çizelge 3.9, Çizelge 3.10, Çizelge 3.11, Çizelge 3.12, Çizelge 3.13 ve Çizelge 3.14'te açıklanmıştır.

Çizelge 3.9 hlyA geninin PCR amplifikasyon programı

Döngü No.	Aşama	Sıcaklık	Zaman
1	İlk denatürasyon	94°C	1 dakika
35	Denatürasyon	94°C	1 dakika
	Tavlama	55°C	2 dakika
	Eklenti	72°C	3 dakika
1	Son uzatma	72°C	5 dakika

Çizelge 3.10 rfb O157 geninin PCR amplifikasyon programı

Döngü No.	Aşama	Sıcaklık	Zaman
1	İlk denatürasyon	94°C	4 dakika
35	Denatürasyon	94°C	30 saniye
	Tavlama	55°C	30 saniye
	Eklenti	72°C	1 dakika
1	Son uzatma	72°C	4 dakika

Çizelge 3.11 fliC geninin PCR amplifikasyon programı

Döngü No.	Aşama	Sıcaklık	Zaman
1	İlk denatürasyon	94°C	30 saniye
35	Denatürasyon	94°C	30 saniye
	Tavlama	55°C	30 saniye
	Eklenti	72°C	1 dakika
1	Son uzatma	72°C	4 dakika

Çizelge 3.12 Stx1 geninin PCR amplifikasyon programı

Döngü No.	Aşama	Sıcaklık	Zaman
1	İlk denatürasyon	94°C	1 dakika
35	Denatürasyon	94°C	1 dakika
	Tavlama	56°C	1 dakika
	Eklenti	72°C	3 dakika
1	Son uzatma	72°C	5 dakika

Çizelge 3.13 Stx2 geninin PCR amplifikasyon programı

Döngü No.	Sahne	Sıcaklık	Zaman
1	İlk denatürasyon	94°C	1 dakika
35	Denatürasyon	94°C	1 dakika
	Tavlama	56°C	1 dakika
	Eklenti	72°C	3 dakika
1	Son uzatma	72°C	5 dakika

Çizelge 3.14 16r RNA geninin PCR amplifikasyon programı

Döngü No.	Aşama	Sıcaklık	Zaman
1	İlk denatürasyon	95°C	5 dakika
35	Denatürasyon	95°C	30 saniye
	Tavlama	60°C	30 saniye
	Eklenti	72°C	1 dakika
1	Son uzatma	72°C	7 dakika

4- Agaroz jel elektroforezi

PCR amplifikasyonunun ardından, amplifikasyonun varlığının doğrulanabilmesi için agaroz jel kullanılarak bir elektroforez prosedürü gerçekleştirilmiştir.

- Jel hazırlama

Agaroz jel, bir şişeye 100 mililitre kadar 1X TAE alınarak ve ardından karışıma 1,5 gram kadar agaroz eklenerek yapılmıştır. Çözelti kaynatıldıktan ve tüm jel partikülleri çözüldükten sonra, agaroz 1 µL'ye kadar güvenli kırmızı güvenli boya eklenmiştir. Çözelti 50 ile 60 santigrat derece arasında soğumaya bırakılırken, agaroz iyice karıştığından emin olmak ve kabarcık oluşumunu önlemek için döndürülmüştür.

- Agaroz jelin yatay dökümü

Jel tepsisinin her iki kenarı selofan bantla bantlandıktan sonra agaroz çözeltisi tepsiye konulmuş ve yarım saat boyunca oda sıcaklığında sertleşmeye bırakılmıştır. Tarak çok dikkatli bir şekilde çıkarıldıktan sonra jel, jel tepsisine aktarılmıştır. Kap daha sonra jel yüzeyinden 3-5 mm yüksekliğe ulaşana kadar 1X TAE tamponu ile doldurulmuştur.

- DNA'nın yüklenmesi

PCR ürünleri düz bir şekilde yüklenmiştir. PCR ürünü kuyucuğa 5 µL konsantrasyonda konulmuştur. Elektrik akımı 100 volt ve 100 miliamperde bir saat etkinleştirilmiştir. DNA'nın hareketi katottan anot artı kutuplara doğru gerçekleşir. Jelde mevcut olan kırmızı güvenli boyalı bantları görmek için bir jel görüntüleme ekipmanı kullanılmıştır.

3.2.9 Saccharomyces mayasının hazırlanması

1- Saccharomyces mayası talimatlara göre bir miktar su ile karıştırılmış ve ardından 24 saat bekletilmiştir.

2- Saf koloniler elde etmek için maya, sabouraud dekstroza besiyerine yayılarak ve daha sonra 37 ° C'de 24 saat inkübe edilerek büyütülerek saflaştırılmıştır.

3- Saf maya, tüplere dağıtılan peptonlu su ortamında büyütülmüş ve beş gün boyunca 37 °C'de inkübe edildikten sonra tüpler santrifüj cihazına yerleştirilmiştir. Santrifüj işlemi

tamamlandıktan sonra süzöntü alınmış ve tortu atılmıştır. Süzöntü daha sonra filtre kağıdı kullanılarak süzölmüştür.

4- Bu süzöntüden yaklaşık 5 ml alınmış ve 20'lik tüplere dağıtılmıştır. Ardından üzerine 15 ml broth besiyerine eklenmiştir.

5- Son olarak bakteriler maya içeren besiyerine eklenmiş ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

3.2.10 RNA ekstraksiyonu

Prosedür

A-Aritma

- Tamponun Hazırlanması: Hacmi 24 mililitre olan RNA Yıkama Tamponuna 96 mililitre saf etanol eklenmiştir.

B-Toplam RNA'nın saflaştırılması: Tüm işlemler oda sıcaklığında yapılırken karışım otuz saniye boyunca yüksek hızda santrifüj edilmiştir.

1- Çözöldükten sonra, donmuş hücrelerin peleti 800 µL RNA lizis solüsyonu içinde yeniden süspanse edilmiş ve daha sonra ileri işlemler için bir lizis tüpüne aktarılmıştır.

2- Tüp, 2 ml'lik bir tüpün takılı olduğu bir boncuk çırpıcıda sabitlendikten sonra deliklerle birleştirildikten sonra tüp işleme tabi tutulmuştur.

3- Tüp bir dakika santrifüj edildikten sonra debris pelletlenmiştir. Berraklaştırılmış süpernatantın 400 µL kadarı bir toplama tüpündeki kolon 2'ye aktarıldıktan sonra karışım santrifüjlenmiş ve akış suyu kaydedilmiştir.

4- Akış suyu için %95-100 kuvvetinde aynı miktarda etanol eklendikten sonra iyice karıştırılmıştır.

5- Karışım bir toplama tüpünün 2. kolonuna aktarıldıktan sonra santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve akış atılmıştır.

6- Kolona 400 µL kadar RNA Hazırlama tamponu eklendikten sonra santrifüj işlemine tabi tutularak akış atılmıştır.

7- Kolona 700 µL'ye kadar RNA yıkama tamponu eklendikten ve üzerinde santrifüj işlemi gerçekleştirildikten sonra, akış suyu atılmıştır.

8- Kolona 400 µL'ye kadar RNA yıkama tamponu eklenmiş, tüm yıkama tamponlarının çıkarıldığından emin olmak için 1 dakika döndürülmüştür. Kolon daha sonra dikkatlice nükleaz içermeyen bir tüpe aktarılmıştır.

9- Toplam 50 µL nükleaz içermeyen su doğrudan kolon matrisine eklenmiş ve santrifüjlenmiştir.

3.2.11 Ekstrakte edilen toplam RNA'nın tahmini

Ekstrakte edilen toplam RNA, RNA konsantrasyonunu (ng/µL) ölçen Nanodrop kullanılarak kontrol edilmiş ve RNA saflığı absorbans (260 /280 nm) ile aşağıdaki adımlar izlenerek kontrol edilmiştir:

1. Nanodrop yazılımı açıldıktan sonra uygun uygulama (Nükleik asit, RNA) seçilir.

2. Kuru bir mendil ile ölçüm kaideleri birkaç kez temizlenir. Ardından 2µl serbest nükleaz suyu dikkatlice pipetlenir ve sistemi boşaltmak için alt ölçüm kaidelerinin yüzeyine yerleştirilir.

3. Nanodrop örnekleme kolu indirilir ve 1µl RNA örneği ölçülür.

3.2.12 DNaz tedavi

Ekstrakte edilen RNA, elüe edilen toplam RNA'dan eser miktarda genomik DNA'yı çıkarmak için DNaz enzimi ile muamele edilmiş ve Çizelge 3.15'te gösterildiği gibi aşağıdaki yöntemle göre yapılmıştır:

Çizelge 3.15 DNase tedavi protokolü

Karışım	Hacim
Toplam RNA 1 µg	10µL
DNaz enzim	1µL
10X tampon	4µL
DEPC suyu	5µL
Toplam	10µL

Bundan sonra karışım 37C°'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, 1µl durdurma reaksiyonu eklenmiş ve DNaz enzim etkisinin inaktivasyonu için 65C°'de 10 dakika inkübe edilmiştir.

3.2.13 Ters transkripsiyon (cDNA)

- Prosedür:

Sonraki reaksiyon karışımı buz üzerinde yapılmıştır; pipetleme kayıplarını hesaba katmak için gerekenden biraz daha fazla miktarda ana karışım yapılmıştır. RNA örneği, Çizelge 3.16'da gösterildiği gibi, bu karışımın alikotları mikrotüplere dağıtıldıktan sonra eklenmiştir.

Çizelge 3.16 Ters transkripsiyon prosedüründe kullanılan reaktifler

Reaktifler	Hacim (µL)
Primer	1
Toplam RNA	8
RNaz Serbest dH ₂ O	1
Toplam	10

RNA, Çizelge 3.17'de gösterildiği gibi aşağıdaki termocycler koşulları altında cDNA'ya dönüştürülmüştür:

Çizelge 3.17 RNA'nın cDNA'ya Dönüştürülme protokolü

Aşama	Sıcaklık	Zaman
cDNA sentezi	42 °C	1 saat
Sıcaklık inaktivasyon	95 °C	5 dakika

3.2.14 qRT-PCR

- Ana karışım hazırlama prosedürü

Ana karışım bileşenlerinin protokolü ve qRT-PCR döngü programı sırasıyla Çizelge 3.18 ve 3.19'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.18 qRT-PCR'de kullanılan ana karışım bileşenleri protokolü

qPCR Ana Karışımı	10
İleri primer	1
Ters primer	1
Nükleaz içermeyen su	3
CDNA şablonu	5
Toplam	20

Çizelge 3.19 qRT -PCR döngü programı

Enzim aktivasyonu	95 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	20 saniye	40
Tavlama	60 °C	30 saniye	
Eklenti	60 °C	30 saniye	
Son uzatma	95 °C	30 saniye	1

3.2.15 Filogenetik ağaç

Kırmızı boyamanın ardından, PCR ürünleri %2 agaroz jel üzerinde elektroforez işleminden geçirilmiş ve ardından 302 nm dalga boyunda UV radyasyonuna maruz bırakılmıştır. Genin dizilemesi MacroGen Korea tarafından yapılmıştır. "National Center for Biotechnology Information (NCBI)" çevrimiçi adresinde (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bulunabilen Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı ve BioEdit yazılımı kullanılarak bir homoloji araması gerçekleştirilmiştir. Bu programların her ikisine de internet üzerinden erişim sağlanmıştır.

3.2.16 İstatistiksel analiz

Bu çalışmanın istatistiksel analizi "sosyal bilimler için istatistik programı (SPSS) 20.0 ve Microsoft Excel 2016" kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sunulan sayısal verileri karakterize etmek için ortalama ve standart sapma kullanılmıştır. Kategorik verilerin sayı ve yüzde dağılımları sağlanmıştır. Değişkenler arasındaki ilişkinin bir tahminini sağlamak için ki-kare testi yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılığın mevcut olduğu kabul edilen eşik 0,05'in altı veya eşdeğeridir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Hastaların Özellikleri

Çizelge 4.1, en fazla *E. coli* (O157:H7) ile enfekte hasta sayısının 6 (%46,20) ile 21-30 yaş grubunda olduğunu, bunu 5 (%55,6) ile 31-40 yaş grubunun, 4 (%50) ile ≤10 yaş grubunun ve 3 (%37,5) ile >50 yaş grubunun izlediğini göstermektedir. 11-20 ve 41-50 yaş grupları daha düşük enfekte hastalarla ilişkilidir (sırasıyla %8,3 ve %14,3). Buna karşılık, NON O157:H7 hastalarında en yüksek sayı 11 (%91,7) ile 11-20 yaş grubunda görülürken, bunu 7 (%53,8) ile 21-30 yaş grubu, 6 (%85,7) ile 41-50 yaş grubu ve 5 (%62,5) ile >50 yaş grubu izlemiş, ≤10 ve 31-40 yaş grupları ise sırasıyla 4 (%50 ve %44,4) ile daha düşük sayılarla ilişkilendirilmiştir.

Çizelge 4.1 *E. coli* O157:H7 ile enfekte ve enfekte olmayan hastaların yaş gruplarına göre dağılımı

		Hastalar				Toplam	P değeri
		O157:H7		O157:H7 Olmayan			
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	
Yaş grupları	<=10 yıl	4	%50,00	4	%50,00	8	0,143 ^{NS}
	11-20 yıl	1	%8,30	11	%91,70	12	
	21-30 yıl	6	%46,20	7	%53,80	13	
	31-40 yıl	5	%55,60	4	%44,40	9	
	41-50 yıl	1	%14,30	6	%85,70	7	
	> 50 yıl	3	%37,50	5	%62,50	8	

Mevcut çalışma sırasında, tüm örnekler idrar yolu enfeksiyonu ve ishali olan hastalardan toplanmış ve *E. coli*'nin farklı serotip ve patotiplerini içermiştir. Yaşa göre, Irak'ta daha önce yapılan bir çalışmaya göre, Musul şehrinde en yüksek enfeksiyon insidansı 15-28 yaş grubuyla ilişkiliyken, en düşük enfeksiyon insidansı 1-14 yaş grubuyla ilişkili olarak tespit edilmiştir (Abdulwahhab and Atiyea 2021). Irak'ta Kerkük'te yapılan bir başka çalışmada da 21-30 yaş grubu bakteriyel enfeksiyon insidansının en yaygın olduğu grup olarak belirtilmiştir (Almukhtar 2018). Uganda'da yapılan bir başka çalışmada da en yüksek enfeksiyon insidansının 20-30 yaş gruplarıyla ilişkili olduğu; buna karşılık, en düşük enfeksiyon insidansının 10 yaşından küçük yaş gruplarıyla ilişkili olduğu

bulunmuştur (Odoki *et al.* 2019). Genç yetişkinler ile öğrenci ve üniversite çağındakiler arasındaki enfeksiyon oranı, bu yaştaki kişilerin ev dışındaki kafeterya ve restoranlarda yemek yemek de dahil olmak üzere dış toplumla daha fazla temas halinde olduğunu gösterebilir. Buna ek olarak, bu yaştaki insanlar yeni evlidir veya cinsel açıdan daha aktiftir ve bu da enfeksiyonun yayılmasına katkıda bulunan diğer bir faktör olarak kabul edilmektedir. Çalışmalar arasında enfeksiyonun görülme sıklığındaki farklılık ise alınan numune sayısına, hastalığın ciddiyetine, kırsal ya da kentsel olsun toplumun yapısına ve hastaların genel kültürüne bağlanabilir. Bunların hepsi enfeksiyonun yayılmasını artırmaya veya azaltmaya yardımcı olan faktörlerdir.

Çizelge 4.2’de, *E. coli* O157:H7 ile enfekte olan ve enfekte olmayan hastalar arasında kadın sayısının sırasıyla 15 (%40,5) ve 22 (%59,5) olduğunu, erkek sayısının ise aynı gruplar arasında 5 (%25) ve 15 (%75) olduğunu görülmektedir.

Çizelge 4.2 Hastaların cinsiyete göre dağılımı

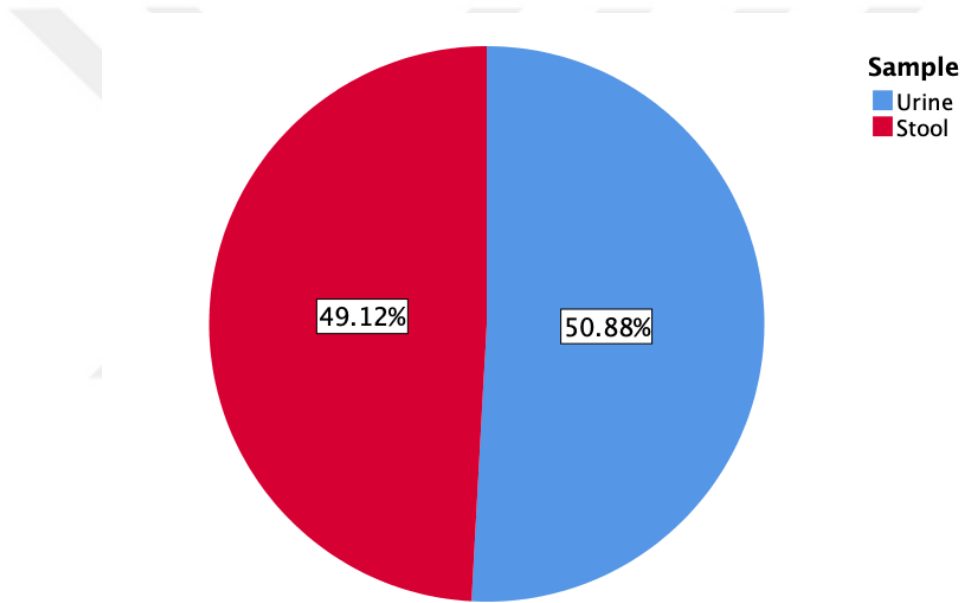
		Hastalar				Toplam	P değeri
		O157:H7		O157:H7 Olmayan			
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	
Cinsiyet	Dişi	15	%40,50	22	%59,50	37	0,241 ^{NS}
	Erkek	5	%25,00	15	%75,00	20	

Bir dizi araştırmanın bulgularına göre, kadınlar *E. coli* enfeksiyonlarının çeşitli patotiplerinin en yüksek sıklığına sahiptir. Çalışmamızla uyumlu olan Irak'taki araştırma bulgularına göre, kadın hasta sayısının erkek hasta sayısından dört kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Salmani *et al.* 2016). Polonya'daki çalışmada, *E. coli* enfeksiyonu prevalansının kadınlarda erkeklerden daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır (Stefaniuk *et al.* 2016). Çin'de yapılan bir çalışmada (He *et al.* 2018), *E. coli* ile enfekte olan kadın sayısının erkek sayısından çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *E. coli*'nin neden olduğu idrar yolu ve gastrointestinal sistem enfeksiyonları hem erkekleri hem de kadınları etkilemektedir, ancak kadınların etkilenme olasılığı çeşitli nedenlerden dolayı erkeklerden daha yüksektir. Bu nedenlerden en önemlisi, kadınların erkeklere kıyasla daha kısa bir üretraya sahip olmasıdır. Buna ek olarak, kadınlarda hormonal aktivite

erkeklerden önemli ölçüde daha yüksektir, bu da idrarın asitliğini etkiler ve sonuç olarak bakterilerin büyümesine elverişli bir ortam yaratır (Martelli *et al.* 1989). Kadınlarda *E. coli* görülme sıklığının artmasının olası bir açıklaması, anüs ve vajinanın birbirine çok yakın olmasıdır.

4.2 Örneklerin Dağılımı

Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, 250 idrar ve gaita örneği arasında 29 (%50,88) idrar örneğinde ve 28 (%49,12) gaita örneğinde *E. coli* pozitif bulunmuştur.



Şekil 4.1 Örneklerin dağılımı

İdrar yolu enfeksiyonları (İYE), insanları etkileyen en yaygın bakteriyel hastalıklar arasındadır. İYE'ler aynı zamanda tıbbi yaygınlık açısından en yaygın ikinci bakteriyel enfeksiyondur (Tabasi *et al.* 2015). Bebeklerden yaşlılara kadar tüm yaş grupları bu virüse yakalanmaya yatkındır (Tarchouna *et al.* 2013). Gram-negatif bakteriler, özellikle de *E. coli*, İYE'lere neden olan en önemli patojenlerden biri olarak kabul edilmektedir (Ali *et al.* 2014). UPEC, her yaştan ve cinsiyetten insanda İYE'ye neden olan en yaygın *E. coli* türüdür (Kudinha 2017). Araştırmamızla karşılaştırıldığında, Irak'ın kuzeyinde yapılan diğer bir çalışmada UPEC prevalansının yüzde 35,25 daha düşük olduğu gösterilmiştir (İbrahim *et al.* 2021). Buna ek olarak, Irak'ta yapılan bir dizi araştırmada

UPEC insidansı çalışmamızda elde ettiğimiz değere yakın bulunmuştur (Hassan *et al.* 2015). Kerbela'da UPEC prevalansı mevcut çalışmayla karşılaştırılabilir düzeydedir (Al-Hasnawi *et al.* 2019). İYE'ye yakalanma olasılığı, cinsiyet, yaş, immünolojik yetersizlik, altta yatan hastalıkların varlığı ve ürolojik kateterlerin etkisi gibi bir dizi risk faktörü ile artmaktadır. Mikrobiyal etiyolojinin ortaya çıkmasına rağmen, bu değişkenlerin her biri İYE gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Wagenlehner *et al.* 2011).

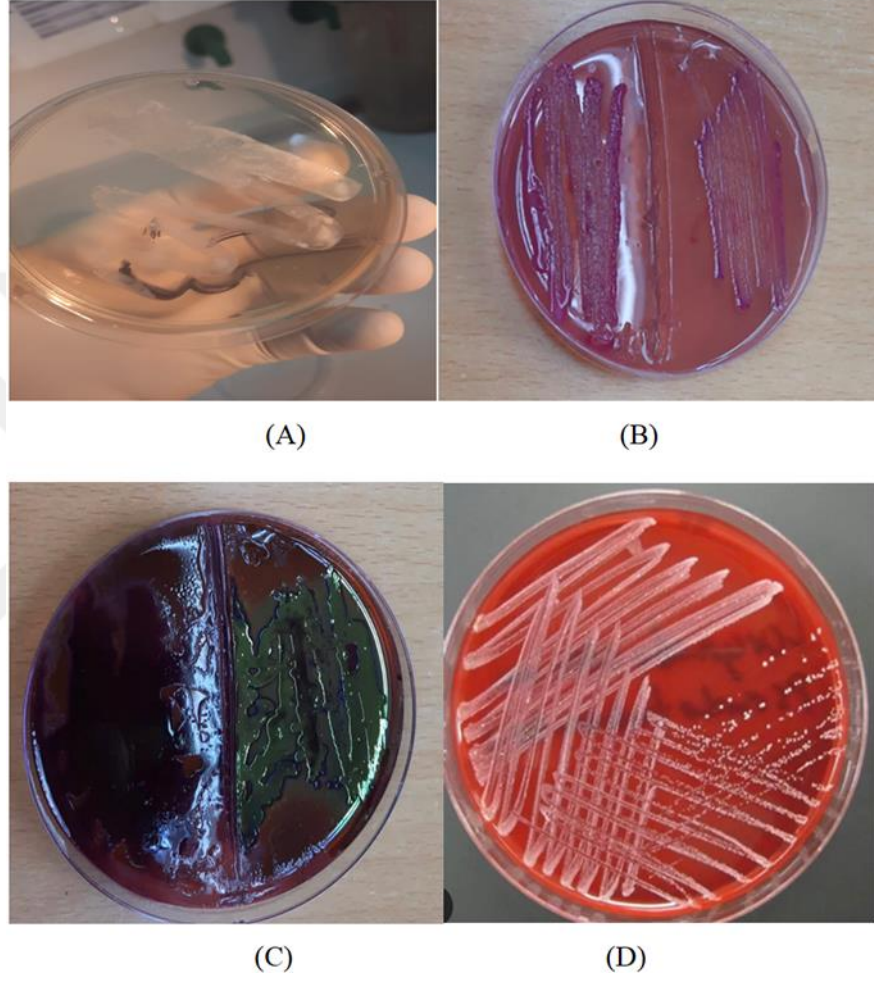
E. coli suşlarının çoğu bağırsaklarda herhangi bir hasara yol açmadan kalabilir ve sağlıklı insanlarda nadiren hastalığa neden olurlar. Bununla birlikte, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde olduğu kadar sağlıklı kişilerde de ishale veya bağırsak dışı rahatsızlıklara neden olabilen bir dizi patojen bakteri vardır. İshale neden olan bulaşıcı hastalıklar önemli bir halk sağlığı sorunudur ve özellikle gelişme sürecindeki ülkelerde yenidoğanlarda ve küçük çocuklarda hastalık ve ölüme birincil katkıda bulunmaktadır. İshalden sorumlu olan *E. coli* suşları, yatay gen transferi süreci yoluyla, konakçıda etkili bir şekilde kalabilen belirli bir özellik kombinasyonu elde ederek gelişmiştir (Gomes *et al.* 2016b). Pakistan'da yapılan bir çalışmada; *E. coli* sıklığı tüm ishal-genik vakalar arasında %54'tür (Masood *et al.* 2023). Ayrıca önceki araştırmalarla da tutarlıdır ve ishali tolere eden çocuklardan alınan numunelerde önemli ölçüde ishale neden olan etkenlerin tespit edildiğini ortaya koymaktadır (David *et al.* 2020). Buna karşılık, Hindistan'da yapılan araştırmada daha düşük bir prevalans bulunmuştur (Moharana *et al.* 2019). Buna ek olarak, Hasan ve arkadaşları tarafından Irak'ta yapılan bir başka çalışmada bakteriyel enfeksiyonların yüksek prevalansı (%87) bulunmuştur (Hasan *et al.* 2020). Bu durum birçok koşula bağlı olabilir. Bunun nedeni, numune alımından önce anti-mikrobiyal ilaçların reçete edilmiş olması olabilir. İlaçlar *E. coli* patojenlerini önemli ölçüde azaltabilir. Ayrıca, bakteriyel çeşitliliğin özgünlüğü, genetik çeşitlilik ve farklı ülkeler arasındaki sosyo-farklılık, sonuçlardaki farklılıklara bağlanmaktadır.

4.3 Sorbitol Fermantasyonu

Çizelge 4.3'te açıklandığı üzere, 57 *E. coli* izolatından sadece 37'si (%64,90) sorbitol fermente etme yeteneğine sahipken, 20'si (%35,10) sahip değildir. Şekil 4.2 kültür ortamındaki *E. coli* suşunu ve *Sarchomyces bulardii*'yi göstermektedir.

Çizelge 4.3 Sorbitol fermantasyonu için bakteri izolatlarının kapasitesi

		Sayı	%
Sorbitol	Hiçbiri	20	%35,10
	Fermentör	37	%64,90



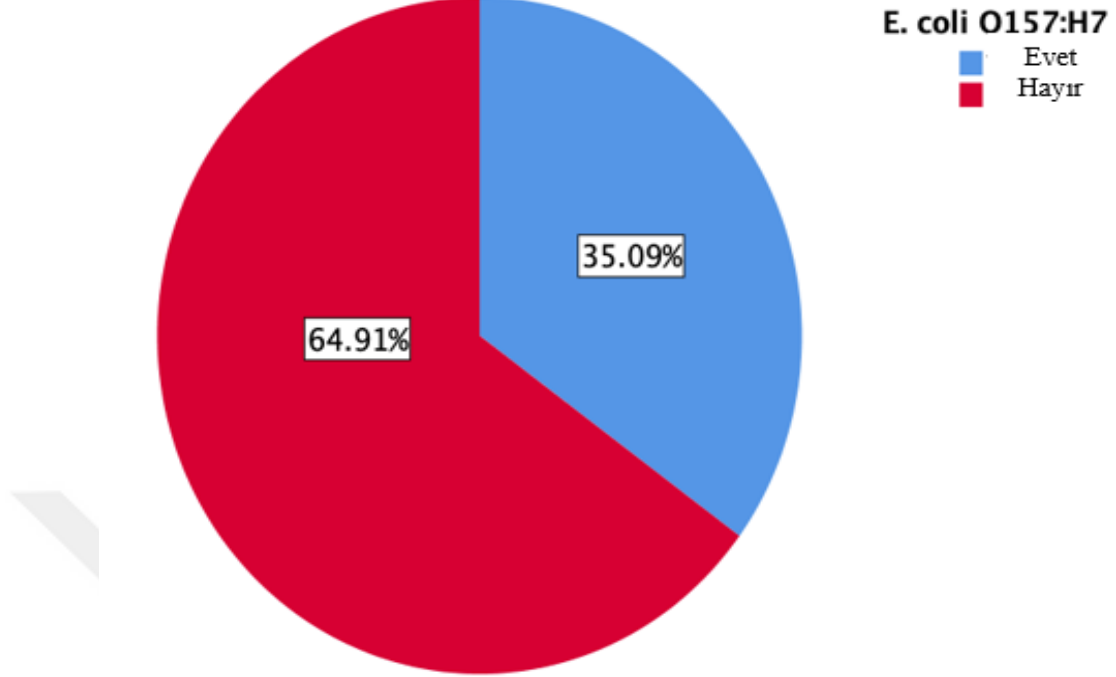
Şekil 4.2 A: sabouraud agarda *Sachromysces bulradii*, B: MacConkey agarda *E. coli*, C: Sorbitol agarda *E. coli*, D: Kanlı agarda *E. coli*

Öte yandan, sadece az sayıda *E. coli* serotipi patojeniktir, yani hem insanlarda hem de hayvanlarda ciddi hastalıklara neden olabilirler (Sarowska *et al.* 2019b). *E. coli*, alt bağırsakta yaşayan ve doğal olarak oluşan kommensal bakterilerdir. *E. coli* O157, birkaç tehlikeli serotipten biridir ve küresel olarak gıda ve su kaynaklı en önemli patojenlerden biri olarak kabul edilmektedir (Cheng *et al.* 2017). Gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu tüm salgınların yüzde yirmisinden sorumludur (Getaneh *et al.* 2021). Bu

bakterinin insanlarda meydana gelen bir dizi hastalık ve ölümle bağlantılı olduğuna dair kanıtlar vardır (Lim *et al.* 2010). Bu hastalıklarla ilişkili ölüm oranı, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış kişiler, çocuklar ve yaşlılar arasında oldukça yüksektir (Lupindua 2018). *E. coli* O157'nin çocuklarda daha çok ishal ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Esumeh *et al.* 2011). Son derece virülans diyareajenik enterohaemorajik ve Shiga-toksijenik *E. coli* serotipini, sorbitolü fermente edememesi ile diğer *E. coli* serotiplerinden ayırmak mümkündür. Sonuç olarak, sorbitol agar üzerinde renksiz koloniler halinde ürer. O157:H7 serotipi gibi sorbitol-negatif *E. coli*'nin tanımlanması, sorbitol agar olarak bilinen seçici ve diferansiyel bir besiyerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilir. *E. coli* serotipi O157:H7'nin hemorajik kolit salgınlarının çoğundan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Sorbitol agar, formülasyonun bir varyasyonudur ve *E. coli* O157:H7'yi bakterinin diğer serotiplerinden ayırt etmek için etkilidir. Laktoz, *E. coli* serotipi O157:H7 tarafından çok hızlı bir şekilde fermente edilir ve standart laktoz içeren besiyerinde yetiştirildiğinde diğer *E. coli* suşlarının çoğundan ayırt edilmesi zordur. Öte yandan, diğer *E. coli* suşlarının yaklaşık yüzde 80'inin aksine, O157:H7 serotipinin neredeyse tüm izolatları D-sorbitolü fermente etmez. *E. coli* O157:H7'nin izolasyonu için tercih edilen besiyeridir ve MacConkey agarda laktoz yerine karbonhidrat sorbitol kullanılarak bu özellikten faydalanmak üzere tasarlanmıştır. Sorbitol bu özellikten yararlanmak üzere geliştirilmiştir. Öte yandan, diğer serotiplerin çoğu sorbitolü fermente eder ve bu da klasik pembe kolonilerin oluşmasına neden olur. O157:H7 serotipi sorbitolü fermente etmez ve besiyerinde opak ve renksiz koloniler üretir. Ayrıca, safra tuzlarının ve kristal viyolenin eklenmesi, geleneksel MacConkey agarda olduğu gibi besiyerinin seçiciliğine katkıda bulunur. Gram-pozitif bakteriler, güçlü inhibitörler olan bu iki seçici ilacın hedefidir (Islam *et al.* 2015).

4.4 O157:H7 *E. coli* Suşlarının Sıklığı

Mevcut çalışma sırasında izole edilen 57 *E. coli* suşundan sadece 20'si (%35,09) O157:H7 suşu iken, 37'si (%64,91) Şekil 4.3'te açıklandığı gibi O157:H7 dışı suşlardır.

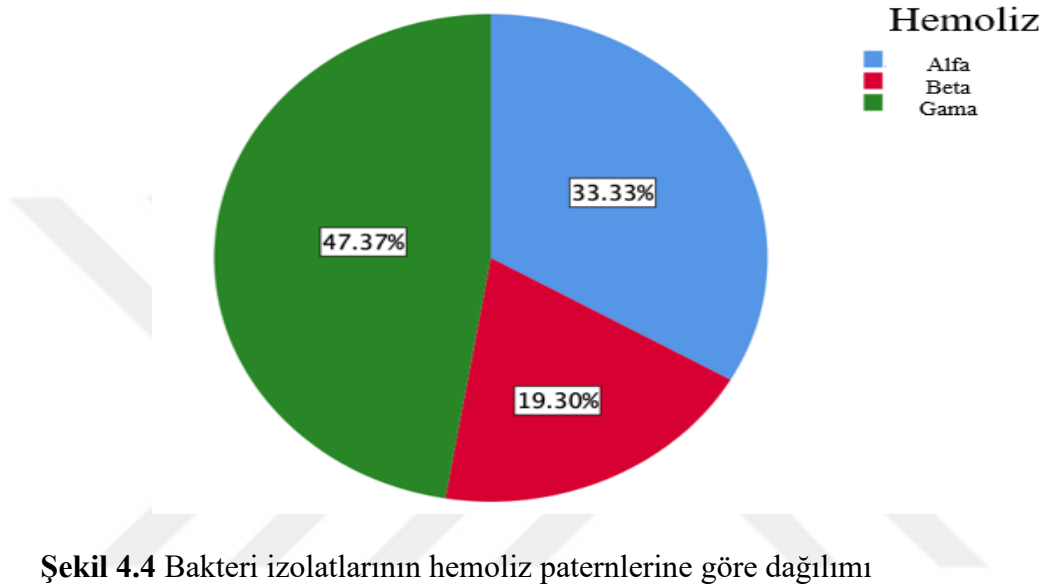


Şekil 4.3 O157:H7 *E. coli* izolatlarının sıklığı

Araştırmamızın sonuçlarının aksine, 2020 yılında Irak'ta yapılan bir çalışmada, ishal yaşayan hastalar arasında *E. coli* O157:H7 prevalansı incelenmiştir. Bu serotipin prevalansı %45,7 olup, bizim bulduğumuz prevalanstan daha yüksektir (Nasir *et al.* 2020). Irak'ta yapılan diğer araştırmalar ise hastalar arasında *E. coli* O157:H7 sıklığının bizim sonuçlarımızla uyumlu olduğu sonucuna varmıştır (Khudor *et al.* 2012, Nasir *et al.* 2020). Ayrıca, bulgularımızın aksine, Vally ve meslektaşları tarafından 2013 yılında yapılan araştırma da bulgularımızla benzer şekilde tutarlıdır (Scallan *et al.* 2013). Avustralya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yürütülen iki çalışma sırasında tespit edilen hastalar arasında *E. coli* O157:H7 sıklığı daha düşükken (Vally *et al.* 2012). Arif *et al.* (2010), Irak'ın kuzeyindeki çocuklardan alınan ishalleri dışkı örneklerinin yüzde 38'inde ishal yapıcı *E. coli*'nin hedef genlerinin bulunduğunu tespit etmiştir (Nessa *et al.* 2007). Önceki çalışma ile mevcut çalışma arasındaki yaygınlık bulgularındaki bu farklılıkların çeşitli nedenleri olabilir. Bu nedenlerden bazıları, çalışmaya katılan hasta sayısındaki ve yaşlarındaki değişiklik, örneklerin toplanmasından önce uygulanan antibiyotikler, her bir hastanın immünolojik yanıtı ve diğer değişkenlerdir.

4.5 Bakteri İzolatlarının Hemoliz Paternleri

Mevcut çalışma sırasında, 57 bakteri izolatından 19'u (%33,30) Şekil 4.4'te gösterildiği gibi alfa hemoliz yeteneğine, 11'i (%19,30) beta hemoliz yeteneğine ve 27'si (%47,40) gama hemoliz yeteneğine sahiptir.



Şekil 4.4 Bakteri izolatlarının hemoliz paternlerine göre dağılımı

Kanlı agar olarak bilinen klinik besiyeri önemli bir besiyeridir. Aynı zamanda farklılaştırılmış ve zenginleştirilmiştir. Kanda çok sayıda besin bulunur ve bu besinler, ekstra veya özel türde besin desteğine ihtiyaç duyan bakteriler olan "titiz" bakterileri beslemeye yarar. Birçok farklı bakteri türü kanı kısmen veya tamamen hemolize uğratma yeteneğine sahiptir ve ürettikleri hemoliz modelleri belirli bakteriyel hastalıkları ayırt etmek ve tanımlamak için kullanılabilir. Hemoliz iki türe ayrılabilir. Kandaki kırmızı kan hücrelerinin hasar görmesi, ortamın şeffaf olması ve kolonileri çevreleyen yeşilimsi bir renk tonuna sahip olmasıyla karakterize edilen alfa-hemolizin (α) nedenidir. Beta-hemoliz (β) sürecinde, kırmızı kan hücreleri parçalanır ve ortam kolonileri çevreleyen tamamen şeffaf görünür. Gama-hemoliz bakterileri olarak da bilinen hemolitik olmayan bakteriler söz konusu olduğunda, herhangi bir lizis veya herhangi bir türde berraklık göstermezler (Buxton 2005). *E. coli*'nin çeşitli suşları tarafından üretilen en önemli virülans faktörlerinden biri RTX toksin ailesinin bir üyesi olan hemolitik toksin α -hemolizindir ve çeşitli insan hastalıklarıyla oldukça ilişkilidir (Cavalieri *et al.* 1984,

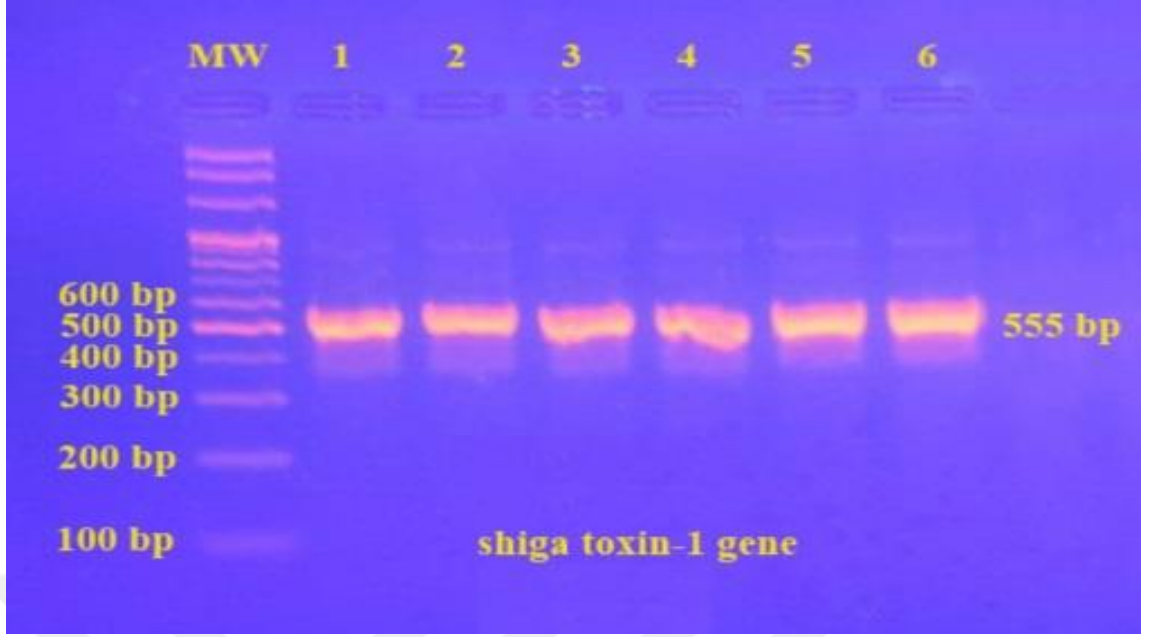
Coote, 1992). Farklı bir araştırmanın bulgularına göre, *E. coli* izolatlarının yüzde kırkı hemolizin üretebilmektedir. Öte yandan, izolatların yüzde altmışı γ -hemoliz sergilemiş ve hemolizin üretmeyenler olarak kategorize edilmiştir (I. A. J. Ibrahim *et al.* 2014). Martinez-Martinez ve arkadaşları klinik ortamlarda kullanılan *E. coli* izolatlarının %27,3'ünün hemolitik olduğunu keşfetmiştir (Martínez-Martínez *et al.* 1999). Al-Chalabi ise *E.coli*'nin %57,1'inin hemolizin ürettiğini bulmuştur (Al-Chalabi 2004). Abdel Rahman, kronik İYE'lerden izole edilen *E. coli*'lerin %70,5'inin hemolitik olduğunu bulmuştur (Abdel Rahman 2006). Üretilen hemolizinin türü, bakteri kaynağı, tarama tekniği ve kan kaynağı gibi bir dizi faktör, *E. coli* izolatlarının hemolizin üretim yüzdesindeki değişimden sorumlu olabilir.

4.6 Virülans Gen Sıklığı

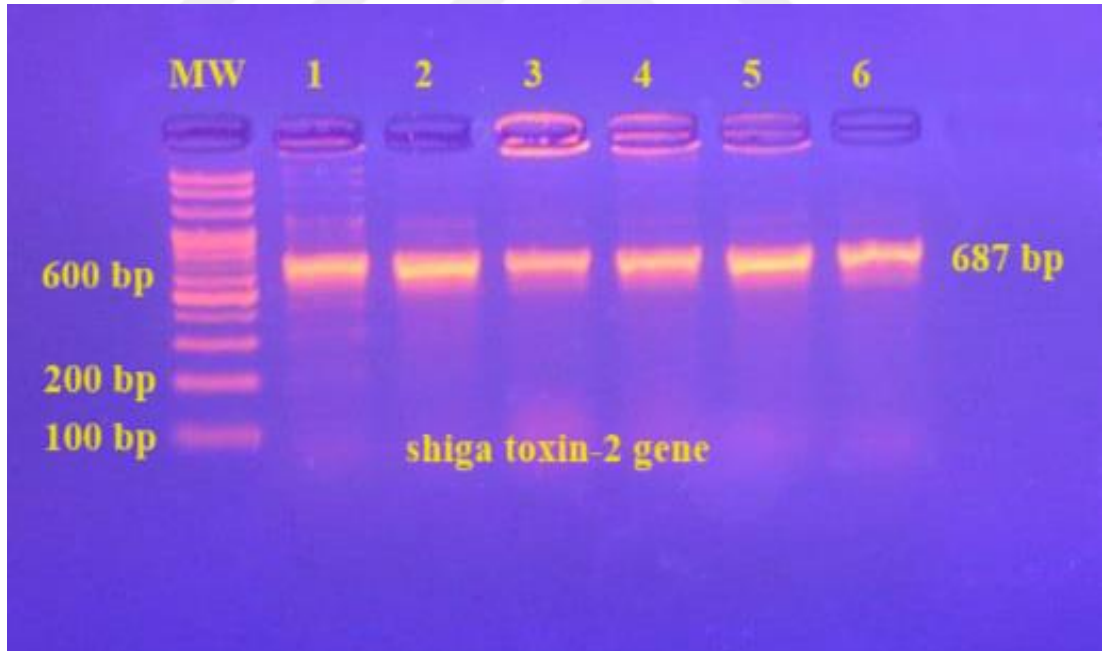
Çizelge 4.4'e göre, STX1, STX2, rfb157 ve hlyA gen frekansları 19 (%33,30) kişide pozitif ve 38 (%66,70) kişide negatiftir. FliC geni ise 37'sinde (%64,90) pozitif, 20'sinde (%35,10) negatif bulunmuştur. Jel elektroforezinde STX1, STX2, rfb-O157, hly, fliC ve 16rRNA genlerine ait PCR ürünleri sırasıyla Şekil 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 Bakteriyel izolatlar arasında virülans genlerinin sıklığı

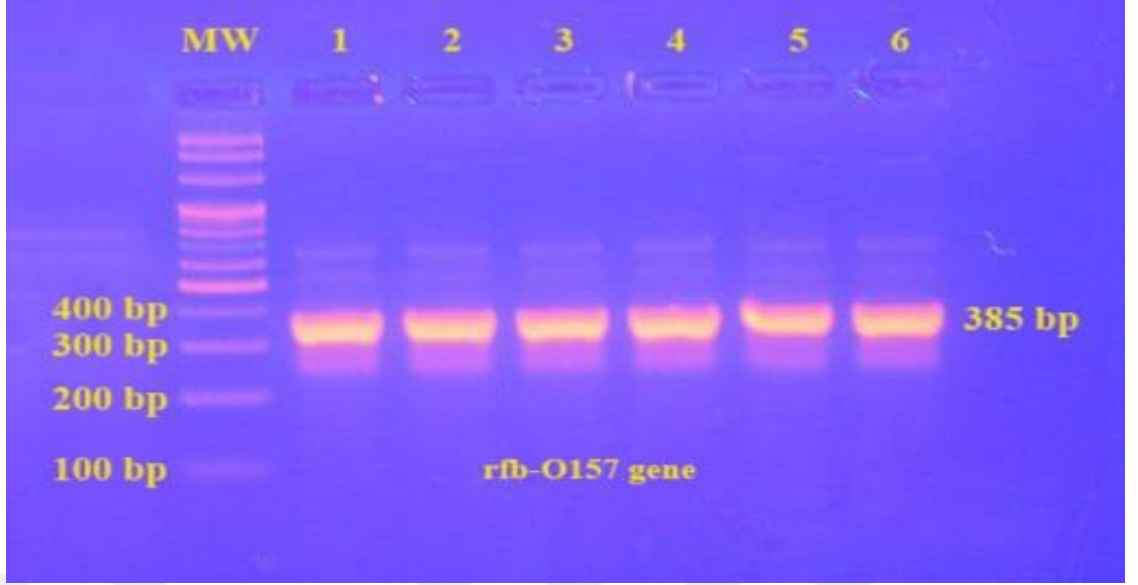
Gen	Pozitif		Negatif	
<i>Rfb-157</i>	19	%33,30	38	%66,70
<i>FliC</i>	37	%64,90	20	%35,10
<i>HlyA</i>	19	%33,30	38	%66,70
<i>STX1</i>	19	%33,30	38	%66,70
<i>STX2</i>	19	%33,30	38	%66,70



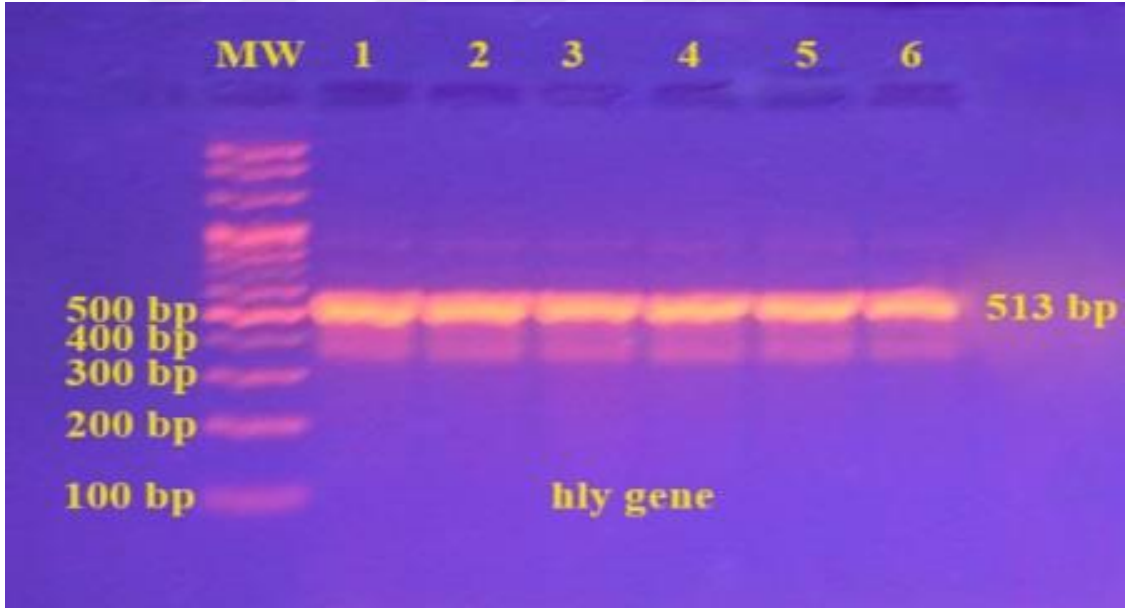
Şekil 4.5 Jel elektroforezinde (%1,5 agaroz) shiga toksin-1 geninin (555 bp) PCR ürünü, 100 bp büyüklüğünde DNA markörü ve etidyum bromür boyası



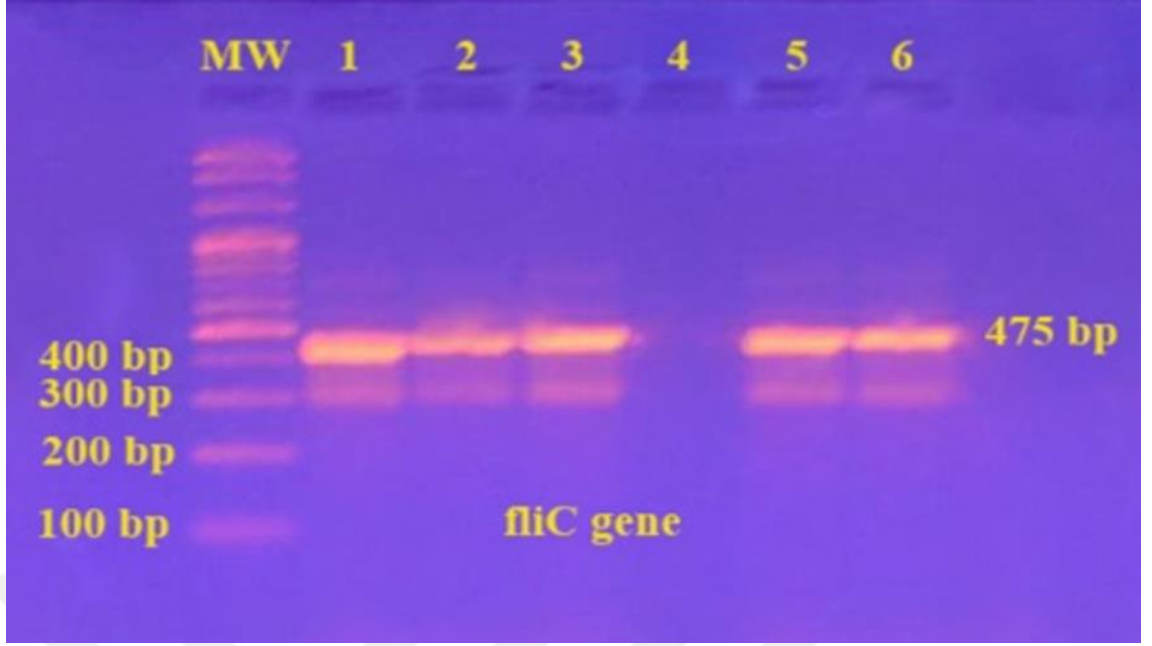
Şekil 4.6 Jel elektroforezinde (%1,5 agaroz) shiga toksin-2 geninin PCR ürünü (687 bp), 100 bp büyüklüğünde DNA markörü ve etidyum bromür boyası



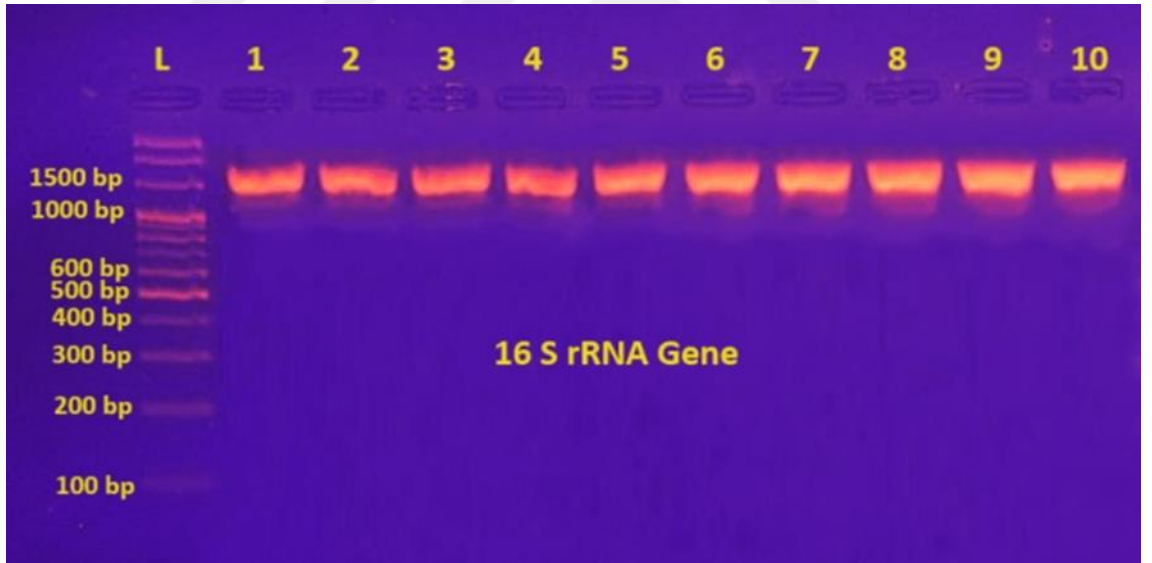
Şekil 4.7 Jel elektroforezinde (%1,5 agaroz) rfb-O157 geninin PCR ürünü (385 bp), 100 bp büyüklüğünde DNA markörü ve etidyum bromür boyası



Şekil 4.8 Jel elektroforezinde (%1,5 agaroz) hly geninin PCR ürünü (513 bp), 100 bp büyüklüğünde DNA markörü ve etidyum bromür boyası



Şekil 4.9 Jel elektroforezinde (%1,5 agaroz) *fliC* geninin PCR ürünü (475 bp), 100 bp büyüklüğünde DNA markörü ve etidyum bromür boyası



Şekil 4.10 Jel elektroforezinde (%1,5 agaroz) 16S rRNA geninin (1500 bp) PCR ürünü, 100 -2000 bp boyutunda DNA markörü ve etidyum bromür boyası

E. coli, hem insanların hem de hayvanların sindirim sistemlerinde bulunan normal mikrobiyotada çok önemli bir rol oynayan olağanüstü uyartılabilir bakterilerdir. Virülans faktörleri üreten genleri içeren çeşitli tam hareketli genetik bileşenleri edinerek, bu zararsız kommensal bakteri, bağırsak ve bağırsak dışı yolları etkileyen çok çeşitli

hastalıklara neden olabilen acil bir insan patojeni olma potansiyeline sahiptir (Pakbin *et al.* 2021). Belirli virölans faktörlerinden sorumlu olduğu belirlenen hlyA, flic, rfb-O157 genlerinin yanı sıra STX1 ve STX2'yi tanımlamak için PCR kullanılarak moleküler analiz gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmanın amacı için enterohemolizin proteini hly A seçilmiştir. Hemolizin, bu gen tarafından kodlanan enzimin adıdır. Hemolizin olarak bilinen toksin kırmızı kan hücrelerini parçalama özelliğine sahiptir. *E. coli* suşlarında hlyA geninin varlığı, bu suşların virölans ile ilişkili olma ve hemorajik kolit gibi hastalıklardan sorumlu olma olasılığını artırır. Flagella gelişiminde rol oynayan flic genleri olarak bilinen bir gen topluluğu vardır. Kamçılar kuyruklara benzeyen yapılardır ve *E. coli* gibi bakterilerin hareket etmesini ve yüzmesini sağlamaktan sorumludur. Hareketlilik *E. coli* için gereklidir çünkü kaynakları bulmasına, konakçısını kolonize etmesine ve uygun olmayan koşullardan kaçmasına izin verir (Schwidder *et al.* 2019). Irak'ta yapılan bir çalışmada, insan deneklerin idrar ve dışkı örneklerinden alınan on bir farklı *E. coli* izolatında hlyA ve flic genlerinin mevcut olduğu gösterilmiştir (Al-Jobory *et al.* 2017). Bağdat'ta yürütülen farklı bir Irak çalışmasında bu genlerin sekiz *E. coli* izolatında bulunmasına rağmen (Al-wgaa 2014), Irak'ın güney bölgesinde yürütülen bir çalışmada flic ve hly A genlerinin sıklığı %5,3 olarak bulunmuştur (Khudor *et al.* 2012). Bu bulgular, bu patojenin insanlarda gastrointestinal sistem hasarına ve idrar yolu enfeksiyonuna önemli bir katkıda bulunduğunun yaygın olarak kabul edildiğine dair daha fazla kanıt sağlamıştır.

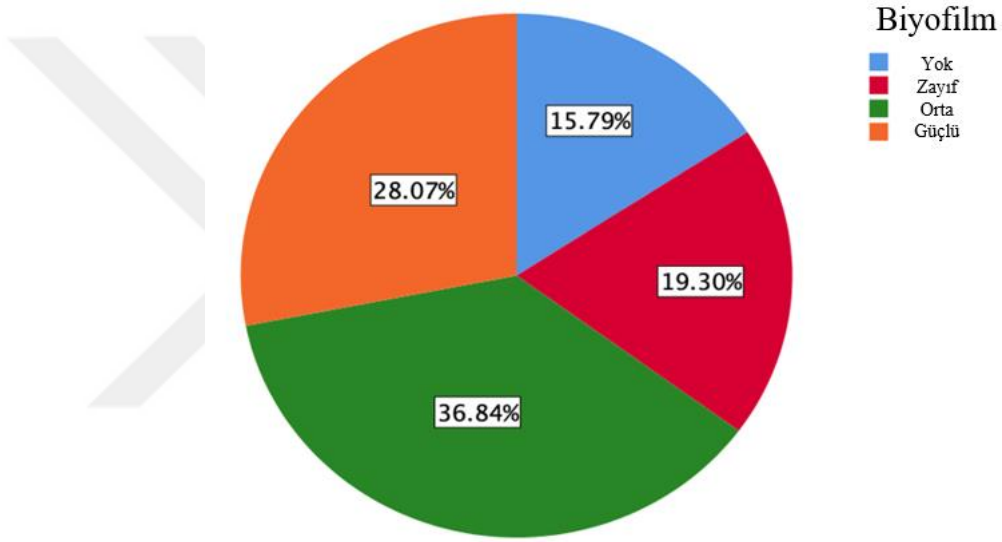
E. coli'nin bir patojen olarak patojenitesinde ve hayatta kalmasında rol oynayan çeşitli virölans faktörleri vardır. *E. coli*, bakterinin yüzeyinde bulunan bir antijenin gelişiminden sorumlu olan rfb-O157 olarak bilinen bir gene sahiptir. Daha doğrusu, O-antijeni bu gen tarafından üretilmektedir. Referansa göre bu antijen, bakterilerde *E. coli*'nin dış zarının önemli bir bileşeni olan lipopolisakkarit (LPS) molekülünün bir bileşenidir. *E. coli*'nin konakçının bağışıklık sisteminden kaçmasına yardımcı olmanın yanı sıra (Tarr *et al.* 2000). O-antijeninin bakterinin patojenitesinde de bir rolü olabilir. Rfb-O157 geninin varlığı, gıda yoluyla bulaşan hastalıklara neden olduğu bilinen bir *E. coli* türü olan *E. coli* O157:H7 için oldukça spesifik bir belirteçtir (Liu *et al.* 2020). Enfeksiyona neden olan bu suşu hızlı bir şekilde tanımlamak için rfb-O157 genine odaklanan bir dizi tanı testi bulunmaktadır (Desmarchelier *et al.* 1998). Irak'ta yapılan bir başka çalışmaya göre, 52

E. coli O157:H7 suşu arasında *rfb*-O157 geninin yaygınlığı %11,5 olarak belirlenmiştir (Khudor *et al.* 2012). Ayrıca, yine Irak'ta yapılan bir başka çalışmada, İYE ve ishalden muzdarip hastalardan elde edilen 11 *E. coli* izolatında *rfb*-O157 geni tespit edilmiştir (Al-Jobory *et al.* 2017). *E. coli* O157:H7 suşları arasında *rfb*-O157 geninin yaygınlık miktarını belirlemeye odaklanan yeterli araştırma olmadığından, yapılan araştırmalar yalnızca hayvanlardan, süttten ve su kaynaklarından elde edilen izolatlar içindir. Sonuç olarak, bu genin sıklığının yanı sıra *E. coli* O157:H7 suşlarının patojenitesini teşhis etme ve değerlendirme sürecindeki işlevini tespit etmek için daha fazla araştırma yapılmasını önerilmektedir.

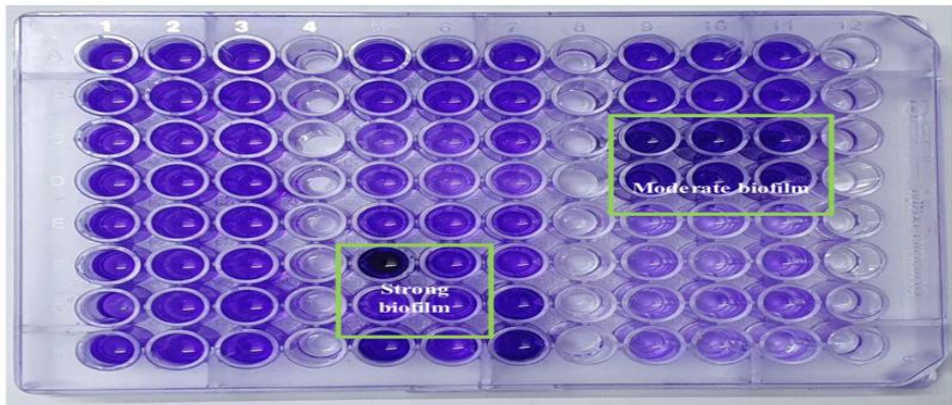
E. coli Shiga toksini üretir. EHEC, önemli ve oldukça bulaşıcı bir bakteri türünün bir bölümüdür. STEC'in neden olduğu insan enfeksiyonu vakalarının çoğu, kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi ve enfekte bireylerle doğrudan temas sonucu ortaya çıkmaktadır (Kaneda *et al.* 2017). STEC O157:H7'nin hastalığa neden olma kabiliyetine katkıda bulunan Shiga toksinlerinin ve diğer değişkenlerin varlığı incelenmiş ve tanımlanmıştır (Pianciola *et al.* 2016). Shiga toksinleri iki ana kategoriden oluşmaktadır: Genetik olarak profaj içinde kodlanmış olan STX 1 ve STX 2 (Zhu *et al.* 2017). Shiga toksin genlerinin *E. coli*'ye yatay olarak aktarılması, shiga toksin üretmeyen suşların toksin üreten bakterilere dönüşmesini sağlar (Lindsey *et al.* 2016). Irak'ta yapılan ayrı bir araştırma, toplam 161 *E. coli* izolatından 19'unun hem STX 1 hem de 2 genlerine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Toplamda 14 birey STX1 ve 16 birey STX2 için pozitif test edilmiştir. Bununla birlikte, bu izolatların sadece 11'inin her iki gene de sahip olduğu keşfedilmiştir, bu da çalışmamızdan daha düşük bir seviyeye işaret etmektedir (Alkaby and Jebur 2020). Aljanaby tarafından Irak'ın Najf şehrinde yapılan bir araştırma, STX-1 geninin sadece iki izolatta bulunduğunu, STX-2 geninin ise üç izolatta bulunduğunu ortaya koymuştur (Aljanaby and Alfaham 2017). Pakistan'da daha önce yapılan bir çalışmada, izolatların %11'inde STX 1 ve 2 genlerinin varlığı tespit edilmiştir (Mohsin *et al.* 2007). Ayrıca, İtalya'da bu genlerin tüm izolatlarda %12,1 oranında görüldüğü tespit edilmiştir (Loconsole *et al.* 2020). Bu araştırmalarda görülen farklılıklar, örneklem büyüklüğündeki, tanımlama protokolleri için kullanılan metodolojilerdeki, örnek toplama zamanlamasındaki ve bakteri izolatlarının kaynağındaki farklılıklara bağlanabilir.

4.7 Biyofilm Oluşturma Yeteneği

Bakteri izolatının biyofilm oluşturma kabiliyetine göre, Şekil 4.11 izolatların çoğunluğunun, 48'inin (%54,21) biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip olduğunu, 9 izolatın (%15,79) ise sahip olmadığını göstermektedir. Biyofilm oluşturma kabiliyeti açısından, Şekil 4.12'de gösterildiği üzere, mikrotitre plakası yöntemi kullanılarak biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip izolatların 11'i (%19,30) zayıf, 16'sı (%28,07) güçlü ve 21'i (%36,84) orta derecede kabiliyete sahiptir.



Şekil 4.11 Bakteri izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitesi



Şekil 4.12 Mikrotiter plaka yöntemi kullanılarak bakteri izolatları arasında biyofilmin optik yoğunluğu ve konsantrasyonu

İnsan hastalıklarının yüzde 65'inde biyofilmlerin yaygın olarak oluşmasının bir sonucu olarak (Amin *et al.* 2019), araştırmacılar ve hekimler henüz ele alınmamış önemli bir sorunla karşı karşıyadır. Bu bakterilerin ekstra polisakkarit matris üretme kabiliyetleri ile hastane enfeksiyonlarına dönüşme eğilimleri arasında açık bir korelasyon vardır ve bu da hastanelerin zorlu fiziksel ortamlarında hayatta kalmalarını sağlar (Seifi *et al.* 2016). Ayrıca biyofilmler, anatomik bölgenin farmakokinetik niteliklerini artırarak dolambaçlı bir şekilde bakterilerde antibiyotik direncinin gelişmesine katkıda bulunur (Verderosa *et al.* 2019). Biyofilmlerin oluşumu ile bu bakterilerdeki transkripsiyonel değişiklikler arasında, genellikle çekirdek algılama (QS) tabanlı süreçlerin aracılık ettiği bir korelasyon vardır. Bu durum, çeşitli virülans faktörlerinin, metabolik son ürünlerin veya antibiyotik direnç belirleyicilerinin diferansiyel ekspresyonuyla sonuçlanabilir. Çevredeki bakterilerin popülasyon yoğunluğunda bir eşiğin aşılması sonucunda bakterilerde meydana gelen transkripsiyonel değişiklikler olgusu, bakteriyel hücre-hücre iletişimi veya QS olarak adlandırılır. Bu değişikliklere salınan ve otoindüktör olarak bilinen maddeler aracılık eder (Nadell and Bassler 2011). Irak'ta yapılan önceki araştırmanın bulguları, izolatların %93'ünün biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Bu izolatlar biyofilm üretim yeteneklerine göre üç kategoriye ayrılmıştır: güçlü üreticiler (%34), orta üreticiler (%45) ve zayıf üreticiler (%21) (Jaber and Aal Owaif 2020). İran'da yapılan araştırmaya göre, izolatların %92'sinin biyofilm oluşumu açısından pozitif test edildiği gösterilmiştir (Fattahi *et al.* 2015). Irak'ta yapılan ayrı bir araştırma, izolatların %90'ının biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymuştur (Makia *et al.* 2013). Araştırma bulguları, izolatların %78'inden fazlasının biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (Al-Taai *et al.* 2018, Elsayed Gawad *et al.* 2018). Mikroorganizmalar tarafından biyofilm oluşumu, bunu gerçekleştiren türler için önemli bir patojenite faktörüdür. Biyofilm gelişimindeki ilk aşama, bakterilerin epitel hücrelerinin yüzeylerine tutunmasıdır (Anderson *et al.* 2007).

4.8 Antibiyotiklere Karşı Direnç Profili

Bakteri izolatları arasındaki antibiyotik direncine göre, mevcut çalışma sırasında farklı antibiyotik türlerine karşı farklı direnç seviyeleri tespit edilmiştir. En yüksek direnç seviyesi %68,40 ile amikasin, bunu %66,70 ile siprofloksasin, %61,40 ile trimetoprim-

sülfametoksazol, %59,60 ile seftazidim izlemektedir. %60, gentamisin %56,10, imipenem %54,40, meropenem %52,60, tikarsilin %50,90, tikarsilin %45,60, sefepim %42,10, minosiklin %40,405 ve aztreonam %38,60 ile takip ederken, en düşük direnç düzeyleri Çizelge 4.5'te gösterildiği gibi sırasıyla %29,80 ile piprasilin-tazobaktam ve %24,60 ile tobramisinine karşı olmuştur.

Çizelge 4.5 Antibiyogram direnç profili

Antibiyotik türleri	Hassas	%	Dayanıklı	%
Tikarsilin	31	%54,40	26	%45,60
Tikarsilin-Klavulanik asit	28	%49,10	29	%50,90
Piprasilin-Tazobaktam	40	%70,20	17	%29,80
Seftazidin	23	%40,40	34	%59,60
Sefepin	33	%57,90	24	%42,10
Aztreonam	35	%61,40	22	%38,60
İmipenem	26	%45,60	31	%54,40
Meropenim	27	%47,40	30	%52,60
Amikasin	18	%31,60	39	%68,40
Antibiyotik	25	%43,90	32	%56,10
Tobramisin	43	%75,40	14	%24,60
Siprofloksasin	19	%33,30	38	%66,70
Minosiklin	34	%59,60	23	%40,40
Trimetoprim-Sülfametoksazol	22	%38,60	35	%61,40

Antimikrobiyal direnç, dünyanın her bölgesinde halk sağlığını etkileyen önemli bir sorundur (Bryce *et al.* 2016). İnsanlar, endüstriler ve çiftlikler tarafından uygunsuz antibiyotik kullanımı, yetersiz hijyen ve sanitasyon ve hastane ortamlarında yetersiz enfeksiyon önleme ve kontrolü gibi birçok faktörün antibiyotiklere dirençli bakterilerin oluşmasına ve yayılmasına katkıda bulunduğu inanılmaktadır (Boonyasiri *et al.* 2014). Potansiyel olarak ölümcül hastalıklara neden olabilen çok ilaca dirençli bakteriler antibiyotik direnci gösterebilmektedir (Pormohammad *et al.* 2019). Antimikrobiyallere karşı direnç geliştiren *E. coli*, her köşedeki sağlık sistemini kasıp kavurmaktadır. Bu durum, en başarılı tedavilerden bazılarının etkinliğini yitirdiği, tedavi sonuçlarını zorlaştıran, tedavi maliyetlerini artıran ve terapötik alternatifleri sınırlayan post-antimikrobiyal çağın küresel spektrumuyla sonuçlanmaktadır. Tüm bu faktörler post-antimikrobiyal çağın küresel spektrumuna yol açmaktadır. Geçmişte yapılan çalışmalar, bakterilerin hem modern hem de geleneksel ilaçlar da dahil olmak üzere geleneksel

antibiyotiklere karşı artan direncini tutarlı bir şekilde ortaya koymuştur. Raporlara göre, *E. coli*'nin antimikrobiyal direnci, ekonomik açıdan dezavantajlı olan ülkelerde bulaşıcı hastalık tedavisinin başarısızlığına katkıda bulunan önemli bir faktördür (Tuem *et al.* 2018). Dünya Ekonomik Forumu tarafından 2016 yılında yapılan bir açıklamaya göre, çoklu ilaç direnci "zamanımızın en büyük sağlık sorunlarından biridir (Koo and Seo 2019).

Irak'ta yapılan ve çeşitli klinik örneklerden alınan *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç profilini inceleyen ayrı bir araştırmada, direnç oranının ampisiline karşı daha yüksek olduğu, nitrofurantoine karşı direnç oranının ise daha düşük olduğu keşfedilmiştir (Abdulhameed and Abduljabbar 2022). Ayrıca, farklı bir araştırmada da aynı sonuçlar görülmüştür (Al-Taai *et al.* 2018). Öte yandan, (Ghazali *et al.* 2020) tarafından yürütülen bir araştırmanın bulgularına göre, ertapeneme dirençli *E. coli* izolatlarının yüzdesi oldukça yüksektir. Çeşitli çalışmalardaki *E. coli* izolatları arasındaki direnç profilindeki bu farklılıklar, örneklem büyüklüğüne, enfeksiyon bölgesine, bakteri serotipine ve özellikle ülkemde antibiyotiklerin hekim tarifi olmadan eczaneden elden alınması ve hastaların uygun antibiyotik tedavi süresini ve ardından uygun dozu tamamlamaması nedeniyle uygunsuz antibiyotik kullanımına bağlanabilir. Tüm bu değişkenler, birçok ilaca karşı dirençli mikropların ortaya çıkmasında başlıca etkenler olmuştur.

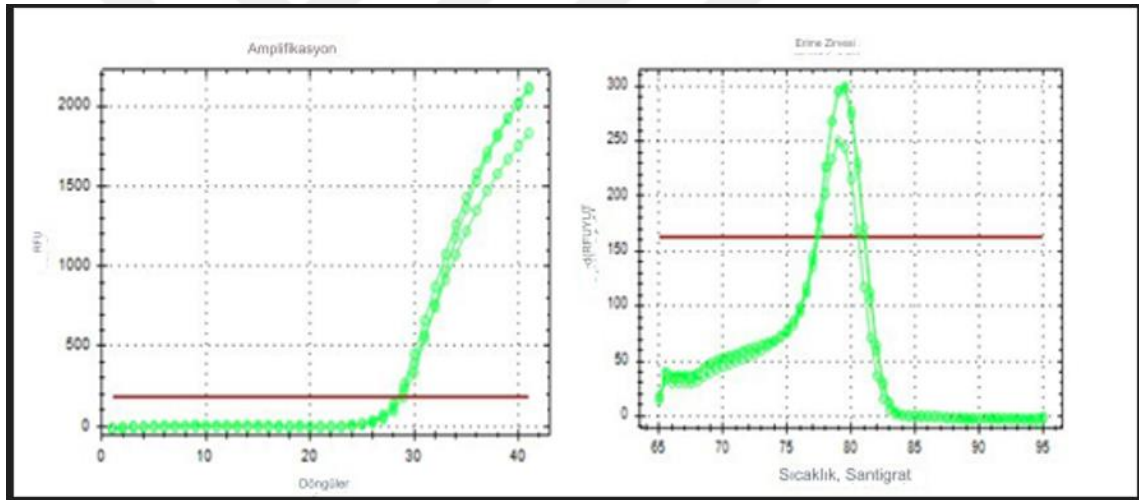
4.9 STX1 ve STX2'nin Gen İfadesi

Çizelge 4.6'ya göre, STX1 gen ifadesinin kat değişimi *Saccharomyces bulradii* eklendikten sonra 3,96 ve eklenmeden önce ise 4,07 olarak belirlenmiştir. STX2 gen ifadesi *Saccharomyces bulradii* eklenmeden önce 2,15, eklendikten sonra 0,11 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6 *Saccharomyces bulradii* eklenmeden önce ve eklendikten sonra genlerin ifade düzeyleri

Genler	Önce				Sonra			
	Eksprese edilen genlerin CT oranları	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	Kat değişimi	Eksprese edilen genlerin CT oranları	Δ Ct	$\Delta\Delta$ CT	Kat değişimi
STX1	33.99	-4.82	0	4.07	24.5	-6.51	-1.69	3.96
STX2	34.4	-5.4	0	2.15	23.1	-1.36	4.04	0.11

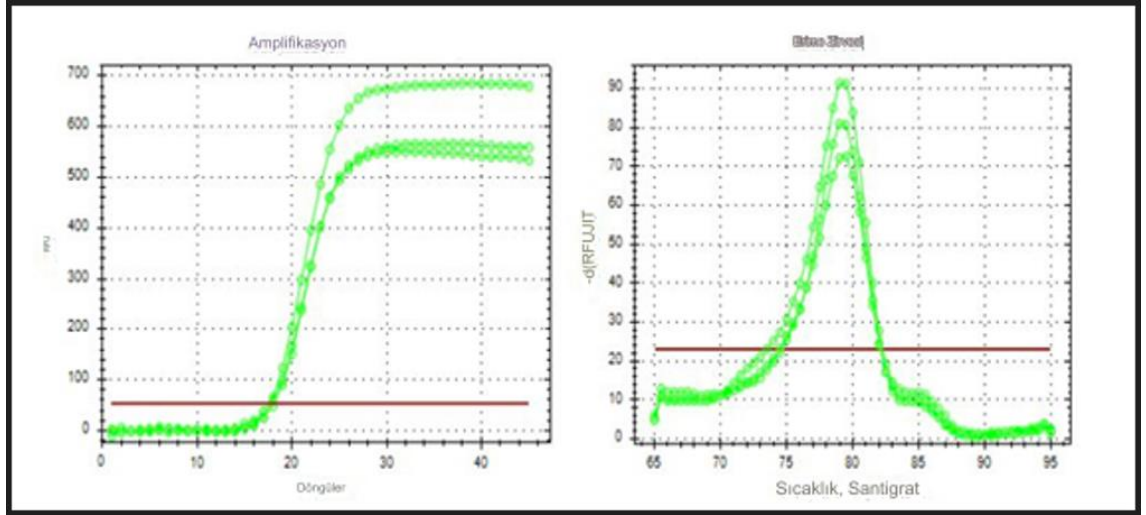
Şekil 4.13, 4.14, 4.15, 4.16 ve 4.17 sırasıyla Shiga-toxin-1, Shiga-toxin-2'nin eklenmeden önceki ve eklendikten sonraki gen ekspresyon döngüleri ve erime sıcaklığı piklerini ve *Sachromysces bulradii* tutucu (16rRNA) genlerini göstermektedir.



(A)

(B)

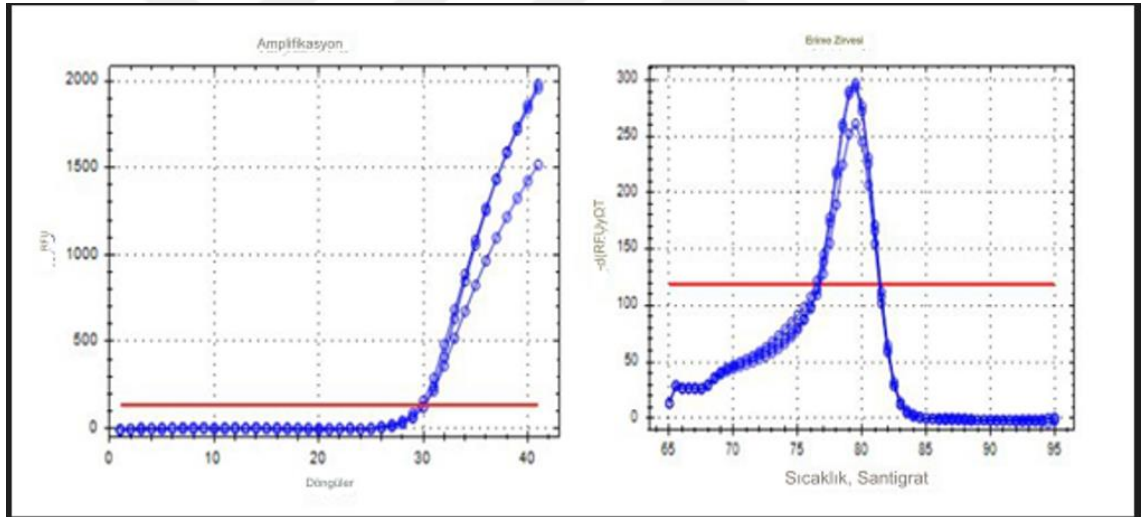
Şekil 4.13 (A) Gen ifade döngüleri (B) *Sachromysces bulradii* eklenmeden önce STX-1 geninin erime tepe sıcaklığı



(A)

(B)

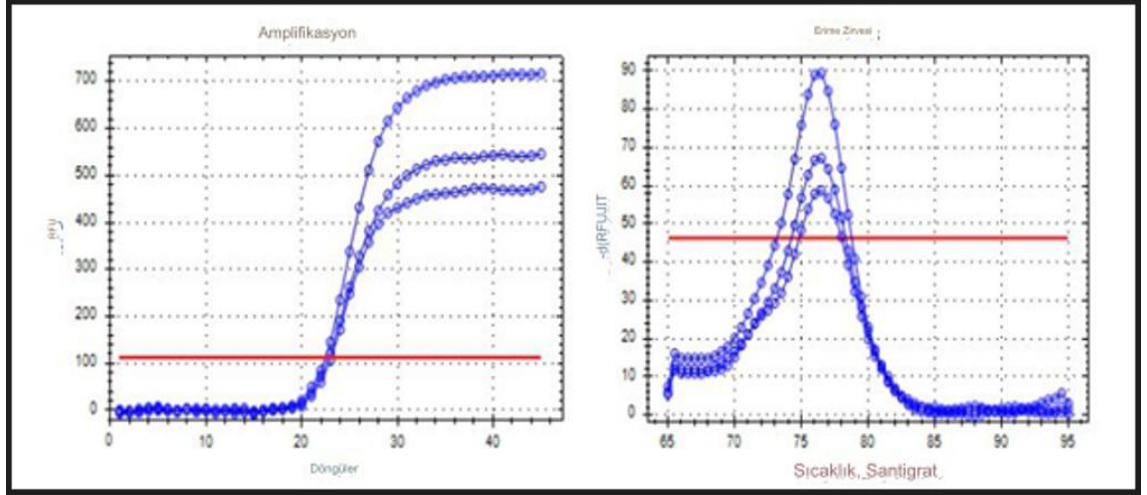
Şekil 4.14 (A) Gen ifade döngüleri (B) *Sachromysces bulradii* eklendikten sonra STX-1 geninin erime tepe sıcaklığı



(A)

(B)

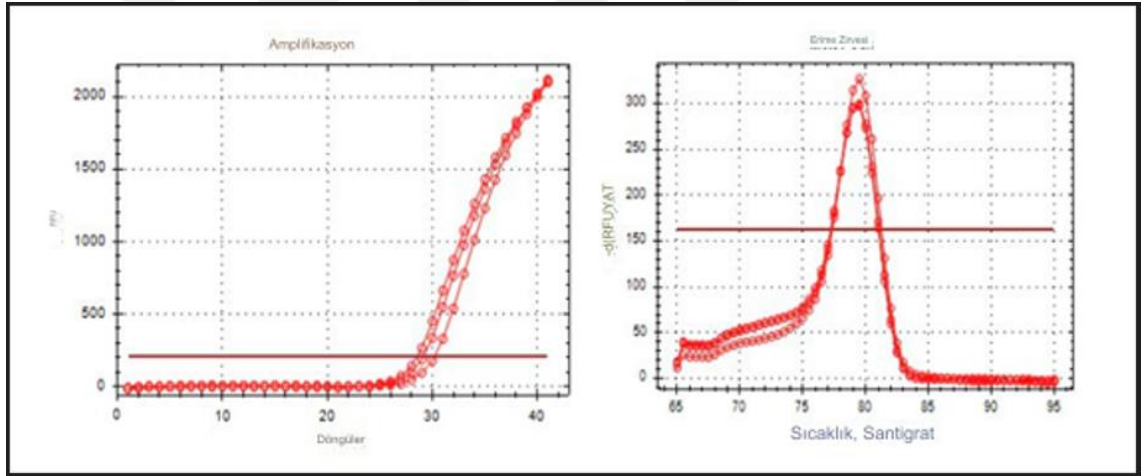
Şekil 4.15 (A) Gen ifade döngüleri (B) *Sachromysces bulradii* eklenmeden önce STX-2 geninin erime tepe sıcaklığı



(A)

(B)

Şekil 4.16 (A) Gen ifade döngüleri (B) *Sachromysces bulradii* eklendikten sonra STX-2 geninin erime tepe sıcaklığı



(A)

(B)

Şekil 4.17 (A) Gen ekspresyon döngüleri (B) *Sachromysces bulradii*'nin eklenmesinden sonra temizlik (16rRNA) geninin erime tepe sıcaklığı

Mayalar, hayvan mikrobiyal florası, toprak, bitkiler, su, havadaki parçacıklar, gıda ve diğer spesifik ekosistemler dahil olmak üzere çeşitli doğal habitatlarda sıklıkla bulunan ökaryotik mikroorganizmalardır (Hatoum *et al.* 2012). Mayaların karmaşık ekosistemler üzerinde önemli bir etkisi vardır. Ek olarak karşılıklık, simbiyoz, parazitlik ve düşmanlık gibi çeşitli aktiviteler yoluyla çeşitli spesifik mikroplarla etkileşime girerler. Mayalar birçok fermente yiyecek ve içeceğin mikroflorasında önemli bir rol oynar. Maya ortamı ister insanlardan ister hayvanlardan elde edilsin, bu öğelerin güvenliği ve

beslenme özellikleri üzerinde dikkate değer bir etkiye sahiptir (Möndel *et al.* 2009). Besin takviyeleri genellikle Brewer mayalarını (*Saccharomyces* spp.) içerir çünkü bunlar daha yüksek miktarda besin ve mineral içerir. İnsan kökenli olmasalar da patojen olmayan bu mayalar, probiyotik olarak sınıflandırılmak için gerekli gereklilikleri karşılamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre probiyotikler, "yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmaktadır (WHO 2002). *Saccharomyces boulardii* dahil mayalar, besin takviyesi veya farmakolojik yardımcı olarak kullanılır (Terciolo *et al.* 2019).

S. boulardii, dünya çapında probiyotik olarak yaygın ve yaygın şekilde kullanılan, patojenik olmayan bir mayadır. Liyofilize *S. boulardii*, ABD'de hem çocuklar hem de yetişkinler için mevcut olan bir besin takviyesidir. Bağırsak florasının dengesini korumak, optimal bağırsak fonksiyonunu teşvik etmek ve genel bağırsak sağlığını desteklemek de dahil olmak üzere çeşitli rollere sahiptir. Bir gnotobiyotik fare modelinin kullanılmasıyla, *S. boulardii* kültürlerinin, bağırsaklardaki *Shigella flexneri* miktarını azaltmadan fareleri *Shigella flexneri* enfeksiyonunun neden olduğu doku hasarına karşı etkili bir şekilde koruduğu gösterilmiştir (Rodrigues *et al.* 2000). *S. boulardii* muhtemelen bağırsak mukozasını doğrudan etkileyerek konağı ishal enfeksiyonlarına karşı korur. Bu, enzimatik aktivitenin uyarılması ve konağın bağırsak mukozal immün tepkisinin arttırılmasıyla elde edilir (Barc *et al.* 2008). *S. boulardii*, konağın fizyolojik sıcaklığı olan 37°C'de gelişen termofilik bir maya olarak işlev görür. Son çalışma, *S. boulardii*'nin simüle edilmiş bir gastrointestinal hastalığa karşı çok daha yüksek direnç sahip olduğunu göstermiştir (Tiago *et al.* 2015). *S. boulardii*, monogastrik deneysel çalışmalarda gösterildiği gibi bağırsak sağlığını iyileştirmede anahtar mekanizma olan bağırsaklardaki mikrobiyal çeşitliliği artırır (Möndel *et al.* 2009). Probiyotik mayaya olan ilgi, mayaların gıda kaynaklı hastalıklarla nadiren ilişkilendirilmesi nedeniyle insan kullanımına odaklanmıştır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi, geçmiş kayıtlarına göre maya türlerinin çoğunluğunun güvenli olduğunu kabul etmektedir (EFSA 2015). Araştırmalar, ilk olarak pratik yaklaşımlar kullanılarak seçilen bazı *S. boulardii* türlerinin, çeşitli mide-bağırsak bozukluklarını ortadan kaldırma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle *S. boulardii* model bir probiyotik olarak kabul edilir (Buts 2009). Gıdada kullanılabilir mayaların kullanımının kapsamlı sağlık yararlarını

açıklamak için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Klinik çalışmalarda mayaların probiyotik organizmalar olarak, yani antibiyotikle ilişkili ishal, enfeksiyöz ishal, irritabl bağırsak sendromu ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları vakalarında yararlı yararları olduğu gösterilmiştir (Foligné *et al.* 2010). *S. boulardii*'nin antibiyotik kullanımıyla ilişkili kişilerde ishal ve kolitin hem önlenmesinde hem de tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur (Guslandi *et al.* 2003).

4.10 E. coli İzolatlarının Filogenetiği

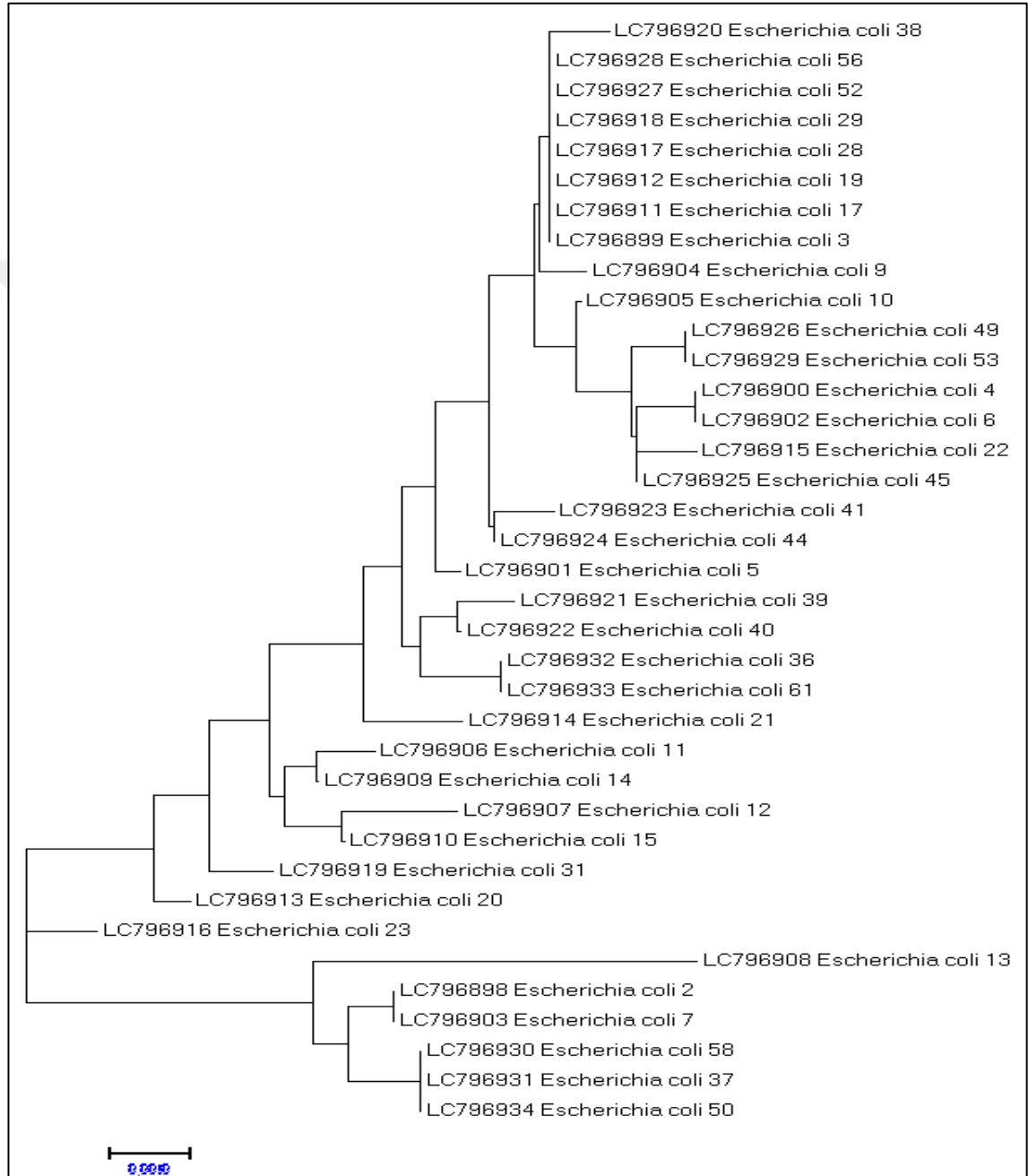
Bakteri izolatları arasında 16S rRNA geninin tanımlanmasının ardından bu sonuçlara göre bu gen fragmanlarının tamamı dizilemeye tabi tutulmuştur. Çizelge 4.7, tüm *E. coli* 16S rRNA dizilerimizin tamamen aynı (%100) olduğunu göstermiştir. NCBI referanslarıyla karşılaştırıldığında %99,63 ile %100 arasında değişen yüksek bir özdeş dizi oranı belirlenmiştir.

Çizelge 4.7 Örnek ve Referans kopyalarımız (NCBI) arasındaki BLAST Sonuçları

Örnek No.	Katılım Sayı	Sorgu kapsamı %'si	Yüzde Tanılama %	Organizmalar	Referans kopyalar (NCBI)
2	LC796898	100%	%99,63	<i>Escherichia coli</i>	CP055167.1
3	LC796899	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	CP098929.1
4	LC796900	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	CP098931.1
5	LC796901	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	KJ576900.1
6	LC796902	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	CP098931.1
7	LC796903	100%	%99,63	<i>Escherichia coli</i>	CP028617.1
9	LC796904	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	MT649780.1
10	LC796905	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	MK878418.1
11	LC796906	100%	%99,85	<i>Escherichia coli</i>	CP123237.1
19	LC796907	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	CP098931.1
13	LC796908	100%	%99,63	<i>Escherichia coli</i>	CP058752.1
14	LC796909	100%	%99,93	<i>Escherichia coli</i>	CP110095.1
15	LC796910	100%	%99,93	<i>Escherichia coli</i>	KJ477008.1
17	LC796911	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	CP098929.1
19	LC796912	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	CP098931.1
20	LC796913	100%	%99,93	<i>Escherichia coli</i>	MN083306.1
21	LC796914	100%	%99,85	<i>Escherichia coli</i>	CP031906.1
22	LC796915	100%	%99,93	<i>Escherichia coli</i>	MN557058.1
23	LC796916	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	CP048337.1
28	LC796917	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	CP099003.1
29	LC796918	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	MN704518.1
31	LC796919	100%	%99,78	<i>Escherichia coli</i>	CP037903.1
38	LC796920	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	CP087287.1
39	LC796921	100%	%99,85	<i>Escherichia coli</i>	MK560859.1
40	LC796922	100%	%99,93	<i>Escherichia coli</i>	KJ576900.1
41	LC796923	100%	%99,93	<i>Escherichia coli</i>	MN083301.1
44	LC796924	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	MN083301.1
45	LC796925	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	MK621219.1
49	LC796926	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	KF574805.1
52	LC796927	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	CP099032.1
56	LC796928	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	CP098929.1
53	LC796929	100%	100%	<i>Escherichia coli</i>	KF574805.1
58	LC796930	100%	%99,78	<i>Escherichia coli</i>	CP031916.1
36	LC796932	100%	%99,85	<i>Escherichia coli</i>	MN704520.1
37	LC796931	100%	%99,55	<i>Escherichia coli</i>	MH532531.1
61	LC796933	100%	%99,85	<i>Escherichia coli</i>	MN704520.1
50	LC796934	100%	%99,63	<i>Escherichia coli</i>	CP028617.1

Mevcut çalışma sırasında Şekil 4.18'de incelenen *E. coli* izolatlarının filogenetik ağacına göre, tüm bu izolatlar arasında tamamen aynı diziler olmasına rağmen, filogenetik ağaç 38, 56, 52, 29, 26, 19, 17, 3 ve 9 numaralı izolatların aynı orijinalden ortak olduğunu ve 10 numaralı izolatla yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. 48, 53, 4, 6, 22 ve 45 numaralı izolatlar da aynı orijinal kaynakla ilişkilendirilmiştir. Öte yandan, 5 numaralı izolatla yakından ilişkili 41 ve 44 numaralı izolatlar; 39, 40, 36, 61 ve 21 numaralı

izolatlar; 11 ve 14 numaralı izolatlar; 12 ve 15 numaralı izolatlar; ve 13 numaralı izolatla yakından ilişkili 31, 20 ve 23 numaralı izolatlar arasında aynı orijinal kaynak bulunmaktadır. Ayrıca, 2, 7, 58, 37 ve 50 numaralı izolatlar aynı bakteriyel kökeni paylaşmaktadır.



Şekil 4.18 Komşu-Birleştirme yöntemi ile tasarlanmış *E. coli* filogenetik ağacı

Irak'ta yapılan çalışmada, klinik örneklerden elde edilen *E. coli* izolatları arasında 16S rRNA gen dizileri analiz edilmiş ve filogenetik analizleri izolatlar arasında %99 uyumluluk göstermiştir (Jasim 2019). Aynı doğrultuda, 16S rRNA geninin incelenmesine dayalı olarak *E. coli* izolatları arasında yüksek uyumluluk vardı (Alwaily 2021). Filogenetik ağaçlar, ortak atalarını göstererek türler veya genler arasındaki ilişkileri göstermektedir. Bu çalışma, çok çeşitli türlerle sonuçlanan farklılaşan kalıpları ve genetik değişiklikleri sunarak evrimi anlamamızı geliştirir (Gregory 2008). Filogeniler, evrim teorisinin temel bir ilkesi olan paylaşılan soyun kanıtını sağlar. Ortak özelliklerin incelenmesi yoluyla, tarih boyunca organizmaların aşamalı olarak farklılaştığını gösterirler. Filogenetik analiz, yalnızca yüzeysel benzerliklere dayanmak yerine, türleri evrimsel bağlantılarına göre kategorize etmeye yardımcı olur. Bu, Dünya üzerindeki yaşamı sınıflandırmak için daha kesin ve aydınlatıcı bir yöntem sunar (Pagel 1994). Genellikle 16S rRNA verilerini kullanan filogenetik analiz, evrimi anlamak, biyolojik bilgileri düzenlemek ve sağlık ve endüstride pratik uygulamaları ortaya çıkarmak için güçlü bir tekniktir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, *E. coli* O157 izolatlarının en yüksek yüzdesi 21-30 ve 11-20 yaş grubunda tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, bu gruplardaki tüm hastaların okul ve üniversite çağında olduğunu ve çevreyle daha fazla teması olduğu düşünülenlerin enfeksiyon açısından yüksek risk altında olduğunu göstermiştir.

Kadınlarda erkeklere kıyasla daha fazla sayıda enfeksiyon görülmüştür; bu bulgular kadınların üreme sistemi anatomisi, hormonal değişiklikler ve diğerleri gibi çeşitli faktörler nedeniyle daha yüksek enfeksiyon riski altında olduğunu göstermektedir.

E. coli'nin örnek türlerine göre dağılımı hem dışkı hem de idrar örnekleri arasında yarı özdeş bir yüzde göstermiştir; bu da UPEC'in GIT enfeksiyonlarına neden olabileceğini ve bunun tersinin de geçerli olduğunu göstermektedir.

57 *E. coli* izolatının 20'si sorbitol fermantasyonsuz, 37'si ise sorbitol fermantasyonludur. Bu bulgular *E. coli* O157 sıklığının yüksek olduğunu göstermektedir. *E. coli* izolatları arasında yüksek hemoliz aktivitesi belirlenmiştir. Bu durum *E. coli*'nin kırmızı kan hücrelerini parçalama yeteneğinin *E. coli* patogeneğinde, özellikle *E. coli* O157 izolatlarında çok önemli bir faktör olarak kabul edilebileceğini göstermektedir.

E. coli izolatları arasında STX1, STX2, rfo157, fliC ve hylA genlerinin yüksek sıklıkta bulunması, bu genlerin *E. coli* enfeksiyonlarının hayatta kalması, virülansı ve patolojisinde önemli rol oynadığını göstermiştir.

E. coli izolatlarının çoğunluğu hem idrar yolu enfeksiyonlarında hem de gastrointestinal enfeksiyonlarda biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir, bu da biyofilmin güçlü yapışıklıklar ve konakçı bağışıklık tepkisine karşı direnç nedeniyle kronik enfeksiyonların gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

E. coli izolatları arasında farklı antibiyotik türlerine karşı dirençteki değişkenlik, bu bakterilerin yeni ve eski ilaçlara karşı farklı antibiyotik direnç mekanizmaları geliştirme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir.

Saccharomyces bulradii eklendikten sonra *E. coli*'nin STX1 ve STX2 gen ekspresyon seviyelerindeki azalma, bu mayanın *E. coli* ile ilişkili enfeksiyonların, özellikle de ÜSYE ve GIT enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Çalışılan izolatlar ve referans izolatlar arasındaki yüksek oranda özdeş sekanslama, mevcut çalışmadaki izolatların aynı antik kökeni ve aynı sekansları paylaşabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, 16S rRNA geninin tüm Gram-negatif bakterilerde bulunduğu düşünüldüğünden, referanslarımız ve komşu izolatlar arasındaki yeni farklılıkları elde etmek için diğer genlerin dizilenmesi, Efluks-pompa geni gibi antibiyotik direnç genlerine odaklanmak ve bunların bakteriyel filogeniyle ilişkilerini araştırmak için daha fazla çalışma yapılması, Biyofilme karşı bağışıklık yanıtının araştırılmasının çok önemli olduğu düşünülmektedir; bakteriyel biyofilme karşı doğuştan gelen ve adaptif konak bağışıklık yanıtlarının rolünü değerlendirilmesi ve Farklı enfeksiyon kaynakları arasındaki antibiyotik direnci seviyeleri ile ve çoklu ilaç direnci gibi çeşitli direnç modelleri geliştirme yeteneklerinin değerlendirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel Rahman, M. 2006. Study of some bacteriological and immunological parameters in chronic urinary tract infection. Al-Mustansiriya University.
- Abdulhameed, H. and Abduljabbar, A. 2022. Isolation, identification and antibiotic resistance profile distribution of clinical *E. coli* in Iraqi patients. 8(5): 1-9.
- Abdulwahhab, M. A. and Atiyea, Q. M. 2021. Isolation and Diagnosis of *Escherichia Coli* Causing Urinary Tract Infections from People of Different Ages in Mosul City. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 7017–7025.
- Afset, J. E., Bergh, K. and Bevanger, L. 2003. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, 52(Pt 11): 1015–1019.
- Agnew, E., Dolecek, C., Hasan, R., Lahra, M., Merk, H., Perovic, O., Sievert, D., Smith, R., Taylor, A. and Turner, P. 2021. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report. World Health Organization, 21(7): 99.
- Al-Chalabi, R. 2004. Relation between hemolysin production and biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*. MSc, Thesis, Al-Nahrain University, 99 page, Al-Nahrain.
- Al-Hasnawi, A. thaher N., Zaid, D. A. A. and Al-Hasnawy, H. H. 2019. Immunological and Molecular study of interleukin-17A and Uropathogenic *E. Coli* among Patients in Holy Karbala, Iraq. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(2): 967–973.
- Ali, I., Kumar, N., Ahmed, S. and Dasti, J. I. 2014. Antibiotic resistance in uropathogenic *E. coli* strains isolated from non-hospitalized patients in Pakistan. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 8(9): DC01.
- Aljanaby, A. A. J. and Alfaham, Q. M. H. 2017. Phenotypic and Molecular Characterization of some Virulence Factors in Multidrug Resistance *Escherichia coli* Isolated from Different Clinical Infections in Iraq. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 7(2): 65–78.
- Al-Jobory, M., N. Al-Thwaini, A. and M. Najeeb, L. 2017. Molecular identification of some virulence related genes for *E. coli* O157:H7 isolated from bloody diarrhea and UTI in Baghdad city. *Journal of University of Anbar for Pure Science*, 11(3): 17–25.

- Alkaby, S. M. and Jebur, M. 2020. Genetic Characterization of *Escherichia coli* O157 Isolated From Human Stool Specimens in Wassit Province of Iraq. *Journal of Techniques*, 2(3): 1–8.
- Allen, R. 2013. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using loop mediated isothermal amplification. University of Alberta Medical Sciences, 93 page, Edmonton.
- Almagor, J., Temkin, E., Benenson, I., Fallach, N., Carmeli, Y. and consortium, D.-A. 2018. The impact of antibiotic use on transmission of resistant bacteria in hospitals: Insights from an agent-based model. *PloS One*, 13(5): 197111.
- Almukhtar, S. H. 2018. Urinary tract infection among women aged (18-40) years old in Kirkuk city, Iraq. *The Open Nursing Journal*, 12(1): 109.
- Al-Taai, H. R. R., Al-Jebouri, Z. A. S., Khalaf, B. H. and Mohammed, Y. Q. 2018. Antibiotic resistance patterns and adhesion ability of uropathogenic *Escherichia coli* in children. *Iraqi Journal of Biotechnology*, 17(1): 18–26.
- Alwaily, E. R. 2021. Identification of *Escherichia coli* by analysis of 16S rRNA and study some Identification of *Escherichia coli* by analysis of 16S rRNA and study some Virulence genes isolated from female genital tract Infections. 10(10): 78–88.
- Al-wgaa, A. 2014. Using PCR technique for diagnosis of bacterium *Escherichia coli* O157:H7 isolated from urine samples of humans and sheep. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, 38(2): 17–21.
- Amin, M., Navidifar, T., Shooshtari, F. S., Rashno, M., Savari, M., Jahangirmehr, F. and Arshadi, M. 2019. Association Between Biofilm Formation, Structure, and the Expression Levels of Genes Related to biofilm formation and Biofilm-Specific Resistance of *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Burn Infection in Ahvaz, Iran. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3867–3881.
- Anderson, B. N., Ding, A. M., Nilsson, L. M., Kusuma, K., Tchesnokova, V., Vogel, V., Sokurenko, E. V, and Thomas, W. E. 2007. Weak rolling adhesion enhances bacterial surface colonization. *Journal of Bacteriology*, 189(5): 1794–1802.
- Aworh, M. K., Kwaga, J., Okolocha, E., Mba, N. and Thakur, S. 2019. Prevalence and risk factors for multi-drug resistant *Escherichia coli* among poultry workers in the Federal Capital Territory, Abuja, Nigeria. *PloS One*, 14(11): e0225379.

- Bakhshi, B., Fallahzad, S. and Pourshafie, M. R. 2013. The occurrence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains among children with diarrhea in Iran. *Journal of Infection and Chemotherapy : Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 19(4): 615–620.
- Ballén, V., Cepas, V., Ratia, C., Gabasa, Y. and Soto, S. M. 2022. Clinical *Escherichia coli*: From Biofilm Formation to New Antibiofilm Strategies. *Microorganisms*, 10(6): 1903.
- Barc, M.-C., Charrin-Sarnel, C., Rochet, V., Bourlioux, F., Sandré, C., Boureau, H., Doré, J. and Collignon, A. 2008. Molecular analysis of the digestive microbiota in a gnotobiotic mouse model during antibiotic treatment: Influence of *Saccharomyces boulardii*. *Anaerobe*, 14(4): 229–233.
- Barnhart, M. M. and Chapman, M. R. 2006. Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 131–147.
- Basavaraju, M. and Gunashree, B. S. 2023. *Escherichia coli* : An Overview of Main Characteristics. In *Escherichia coli - Old and New Insights*. IntechOpen.
- Belas, R. 2014. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in Microbiology*, 22(9): 517–527.
- Beloin, C., Roux, A. and Ghigo, J. M. 2008. *Escherichia coli* Biofilms. *Bacterial Biofilms*. Springer Heidelberg.
- Berger, C. N., Sodha, S. V, Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P. and Frankel, G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9): 2385–2397.
- Berger, M., Aijaz, I., Berger, P., Dobrindt, U. and Koudelka, G. 2019. Transcriptional and Translational Inhibitors Block SOS Response and Shiga Toxin Expression in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 9(1): 18777.
- Beutin, L. and Martin, A. 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *Journal of Food Protection*, 75(2): 408–418.
- Biran, D. and Ron, E. Z. 2018. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 416, 149–161.

- Birk, T., Kristensen, K., Harboe, A., Hansen, T. B., Ingmer, H., De Jonge, R., Takumi, K. and Aabo, S. 2012. Dietary proteins extend the survival of *Salmonella* Dublin in a gastric acid environment. *Journal of Food Protection*, 75(2): 353–358.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. and Piddock, L. J. V. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(1): 42–51.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Blanco, J., de Carvalho, V. M., Onuma, D. L. and Pestana de Castro, A. F. 2004. Typing of intimin (eae) genes in attaching and effacing *Escherichia coli* strains from monkeys. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3): 1382–1383.
- Blount, Z. D. 2015. The unexhausted potential of *E. coli*. *ELife*, 4(1): 103.
- Boonyasiri, A., Tangkoskul, T., Seenama, C., Saiyarin, J., Tiengrim, S. and Thamlikitkul, V. 2014. Prevalence of antibiotic resistant bacteria in healthy adults, foods, food animals, and the environment in selected areas in Thailand. *Pathogens and Global Health*, 108(5): 235–245.
- Bryce, A., Hay, A. D., Lane, I. F., Thornton, H. V, Wootton, M. and Costelloe, C. 2016. Global prevalence of antibiotic resistance in paediatric urinary tract infections caused by *Escherichia coli* and association with routine use of antibiotics in primary care: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 352(2): i939.
- Bush, K. and Bradford, P. A. 2016. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8): 25247.
- Buts, J.-P. 2009. Twenty-five years of research on *Saccharomyces boulardii* trophic effects: updates and perspectives. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(1): 15–18.
- Buxton, R. 2005. Blood agar plates and hemolysis protocols. *American Society for Microbiology*, 15(8): 1-9.
- Campbell, N. A. and Reece, J. B. 2002. *International Edition Biology*. Pearson Education, Inc. San Francisco.
- Caprioli, A., Scavia, G. and Morabito, S. 2015. Public health microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Enterohemorrhagic Escherichia Coli and Other Shiga Toxin-Producing E. Coli*, 245–259.

- Cavalieri, S. J., Bohach, G. A. and Snyder, I. S. 1984. *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiological Reviews*, 48(4): 326–343.
- CDC, C. for D. C. and P. 2012. Notes from the Field: *Escherichia coli* O157: H7 Gastroenteritis Associated with a State Fair-North Carolina, 2011. *MMWR: Morbidity and Mortality Weekly Report*, 60.
- Chaucheyras-Durand, F., Faqir, F., Ameilbonne, A., Rozand, C. and Martin, C. 2010. Fates of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in ruminant digestive contents in the absence and presence of probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3): 640–647.
- Cheng, S., Chen, M., Zhang, G., Yu, Z., Liu, D., Xiong, Y., Wei, H. and Lai, W. 2017. Strategy for accurate detection of *Escherichia coli* O157: H7 in ground pork using a lateral flow immunoassay. *Sensors*, 17(4): 753.
- Cho, S., Hiott, L. M., Barrett, J. B., McMillan, E. A., House, S. L., Humayoun, S. B., Adams, E. S., Jackson, C. R. and Frye, J. G. 2018. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* isolated from the Upper Oconee Watershed in Northeast Georgia. *PLoS One*, 13(5): e0197005.
- Chokshi, A., Sifri, Z., Cennimo, D. and Horng, H. 2019. Global Contributors to Antibiotic Resistance. *Journal of Global Infectious Diseases*, 11(1): 36–42.
- Clark, B. F. C., Kjeldgaard, M., Barciszewski, J. and Sprinzl, M. 1994. Recognition of aminoacyl-tRNAs by protein elongation factors. *TRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*, 423–442.
- Conrady, D. G., Flagler, M. J., Friedmann, D. R., Vander Wielen, B. D., Kovall, R. A., Weiss, A. A. and Herr, A. B. 2010. Molecular basis of differential B-pentamer stability of Shiga toxins 1 and 2. *PloS One*, 5(12): e15153.
- Coote, J. G. 1992. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 8(2): 137–161.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M. and Finlay, B. B. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4): 822–880.

- Culyba, M. J., Mo, C. Y. and Kohli, R. M. 2015. Targets for combating the evolution of acquired antibiotic resistance. *Biochemistry*, 54(23): 3573–3582.
- David, E. E., Yameen, M. A., Igwenyi, I. O., Okafor, A. C., Obeten, U. N., Obasi, D. O., Ezeilo, U. R. and David, C. N. 2020. The frequency of virulent genes and antimicrobial resistance patterns of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of children presenting with diarrhea in a tertiary hospital in Abakaliki, Nigeria.
- Deborah Chen, H. and Frankel, G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1): 83–98.
- Dell’Orco, F., Gusmara, C., Loiacono, M., Gugliotta, T., Albonico, F., Mortarino, M. and Zecconi, A. 2019. Evaluation of virulence factors profiles and antimicrobials resistance of *Escherichia coli* isolated from bulk tank milk and raw milk filters. *Research in Veterinary Science*, 123, 77–83.
- Desmarchelier, P. M., Bilge, S. S., Fegan, N., Mills, L., Vary, J. C. and Tarr, P. I. 1998. A PCR specific for *Escherichia coli* O157 based on the *rfb* locus encoding O157 lipopolysaccharide. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(6): 1801–1804.
- Division, N. I. of I. D. and T. and I. D. C. 2011a. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in Japan as of April 2011. *IASR*, 32(5): 125–126.
- Division, N. I. of I. D. and T. and I. D. C. 2011b. Labour and Welfare Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection 2010. *Infec Dis Weekly Rep.*, 13, 11–19.
- Division, N. I. of I. D. and T. and I. D. C. 2012. Labour and Welfare Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in Japan as of April 2012. *Infec Agen Surv Rep.*, 33, 115–116.
- Dodds, D. R. 2017. Antibiotic resistance: A current epilogue. *Biochemical Pharmacology*, 134, 139–146.
- Doughari, J. H., Ndakidemi, P. A., Human, I. S. and Bennade, S. 2009. Shiga toxins (verocytotoxins). *Afr. J. Microbiol. Res*, 3(11): 681-693.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E. and Relman, D. A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728): 1635–1638.

- EFSA. 2015. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 3: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2015. *EFSA Journal*, 13(12).
- Elsayed Gawad, W., Mohamed Helmy, O., Mostafa Tawakkol, W. and Mohamed Hashem, A. 2018. Antimicrobial Resistance, Biofilm Formation, and Phylogenetic Grouping of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates in Egypt: The Role of Efflux Pump-Mediated Resistance. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 11(2).
- Endo, Y. 2014. Enzymology of the Ribosome-inactivating Proteins. *Ribosome-inactivating Proteins: Ricin and Related Proteins*, 151–160.
- Erickson, M. C. and Doyle, M. P. 2012. Plant food safety issues: linking production agriculture with One Health. *Improving Food Safety Through a One Health Approach: Workshop Summary*.
- Esumeh, F. I., Isibor, J. O. and Egbagbe, I. D. S. 2011. Screening for *Escherichia coli* O157: H7 in diarrheic patients in Benin City, Nigeria.
- Farfan, M. J. and Torres, A. G. 2012. Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infection and Immunity*, 80(3): 903–913. <https://doi.org/10.1128/IAI.05907-11>
- Fattahi, S., Kafil, H. S., Nahai, M. R., Asgharzadeh, M., Nori, R. and Aghazadeh, M. 2015. Relationship of biofilm formation and different virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Northwest Iran. *GMS Hygiene and Infection Control*, 10, Doc11. <https://doi.org/10.3205/dgkh000254>
- Fitzgerald, D. M., Bonocora, R. P. and Wade, J. T. 2014. Comprehensive mapping of the *Escherichia coli* flagellar regulatory network. *PLoS Genetics*, 10(10): e1004649.
- Flemming, H. and Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Publ. Gr.* 8, 623–633.
- Foligné, B., Dewulf, J., Vandekerckove, P., Pignède, G. and Pot, B. 2010. Probiotic yeasts: anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 16(17): 2134–2145.
- Foster, T. J. 2017. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3): 430–449.
- François, M., Hanslik, T., Dervaux, B., Le Strat, Y., Souty, C., Vaux, S., Maugat, S., Rondet, C., Sarazin, M. and Heym, B. 2016. The economic burden of urinary tract

- infections in women visiting general practices in France: a cross-sectional survey. *BMC Health Services Research*, 16, 1–10.
- Gajdács, M. and Albericio, F. 2019. Antibiotic resistance: From the bench to patients. *Antibiotics*, 8(3): 890-895.
- Gaytán, M. O., Martínez-Santos, V. I., Soto, E. and González-Pedrajo, B. 2016. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 129.
- Getaneh, D. K., Hordofa, L. O., Ayana, D. A., Tessema, T. S. and Regassa, L. D. 2021. Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 and associated factors in under-five children in Eastern Ethiopia. *Plos One*, 16(1): e0246024.
- Ghazali, M. F., Chai, M. H., Sukiman, M. Z., Mohamad, N. M. and Zainal Ariffin, S. M. 2020. Prevalence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* (CREC) within farm animals in Malaysia. *International Journal of Infectious Diseases*, 101, 534–535.
- Ghigo, J.-M. 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412(6845): 442–445.
- Girard, M. C., Sacerdoti, F., Rivera, F. P., Repetto, H. A., Ibarra, C. and Amaral, M. M. 2015. Prevention of renal damage caused by Shiga toxin type 2: Action of Miglustat on human endothelial and epithelial cells. *Toxicon*, 105, 27–33.
- Goller, C. C. and Romeo, T. 2008. Environmental influences on biofilm development. *Bacterial Biofilms*, 37–66.
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S. and Martinez, M. B. 2016a. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47 Suppl 1(1): 3–30.
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S. and Martinez, M. B. 2016b. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30.
- Gozde, E. and Emek, D. 2019. *Escherichia coli* and food safety. *The Universe of Escherichia Coli*. Doi: Doi, 10.
- Gregory, T. R. 2008. Understanding Evolutionary Trees. *Evolution: Education and Outreach*, 1(2): 121–137.
- Grossman, T. H. 2016. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4): a025387.

- Guslandi, M., Giollo, P. and Testoni, P. A. 2003. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15(6): 697–698.
- Hall, C. W. and Mah, T.-F. 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3): 276–301.
- Hasan, H. K., Yassin, N. A. and Eassa, S. H. 2020. Bacteriological and molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes from children in Duhok City, Iraq. *Science Journal of University of Zakho*, 8(2): 52–57.
- Hassan, M. H., Flayih, M. T., Yaseen, N. Y. and Suleiman, A. A. 2015. Detection the Virulence Factor (Cytotoxic necrosis factor1) Produce from Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates. *Iraqi Journal of Science*, 1920–1924.
- Hatoum, I. J., Stylopoulos, N., Vanhoose, A. M., Boyd, K. L., Yin, D. P., Ellacott, K. L. J., Ma, L. L., Blaszczyk, K., Keogh, J. M., Cone, R. D., Farooqi, I. S. and Kaplan, L. M. 2012. Melanocortin-4 receptor signaling is required for weight loss after gastric bypass surgery. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(6): E1023-31.
- He, K., Hu, Y., Shi, J.-C., Zhu, Y.-Q. and Mao, X.-M. 2018. Prevalence, risk factors and microorganisms of urinary tract infections in patients with type 2 diabetes mellitus: a retrospective study in China. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 403–408.
- Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. J. and Piddock, L. J. V. 2016. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014): 176–187.
- Hu, B., Khara, P. and Christie, P. J. 2019. Structural bases for F plasmid conjugation and F pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(28): 14222–14227.
- Ibrahim, I. A. J., Al-Shwaikh, R. M. and Ismaeil, M. I. 2014. Virulence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from Tigris River and children diarrhea. *Infection and Drug Resistance*, 317–322.
- Ibrahim, M., Khalid, H. M. and Mer, W. M. S. 2021. The prevalence of uropathogenic *Escherichia coli* strains among outpatients with urinary tract infection in Zakho

- Hospitals-Zakho City, Duhok Province/Iraq. *Al-Qadisiyah Journal of Pure Science*, 26(5): 26–40.
- Idalia, V.-M. N. and Bernardo, F. 2017. *Escherichia coli* as a Model Organism and Its Application in Biotechnology. In *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. InTech.
- Iredell, J., Brown, J. and Tagg, K. 2016. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *Bmj*, 352.
- Islam, M. Z., Christensen, J. P. and Biswas, P. K. 2015. Sorbitol non-fermenting shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle on smallholdings. *Epidemiology and Infection*, 143(1): 94–103.
- Jaber, A. M. and Aal Owaif, H. A. 2020. Detection Of Genes Involved In Biofilms Formation By *Escherichia Coli* Isolated From Patients Suffering Of Urinary Tract Infections. *Plant Archives*, 20(2): 5987–5992.
- Jasim, S. 2019. Molecular detection of *Escherichia coli* local isolate from pregnant Iraqi women. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.31044.27528>
- Johannes, L. and Römer, W. 2010. Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(2): 105–116.
- Kakoullis, L., Papachristodoulou, E., Chra, P. and Panos, G. 2019. Shiga toxin-induced haemolytic uraemic syndrome and the role of antibiotics: a global overview. *Journal of Infection*, 79(2): 75–94.
- Kanayama, A., Yahata, Y., Arima, Y., Takahashi, T., Saitoh, T., Kanou, K., Kawabata, K., Sunagawa, T., Matsui, T. and Oishi, K. 2015. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* outbreaks related to childcare facilities in Japan, 2010-2013. *BMC Infectious Diseases*, 15, 539.
- Kaneda, H., Shimizu, M. and Yachie, A. 2017. Successful Treatment of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*-Induced Acute Encephalopathy and Hemolytic-Uremic Syndrome With Polymyxin-B Direct Hemoperfusion. *Therapeutic Apheresis and Dialysis: Official Peer-Reviewed Journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy*, 21(4): 419–421.
- Kaper, J. B. and O'Brien, A. D. 2014. Overview and historical perspectives. *Microbiology Spectrum*, 2(6): 10–1128.

- Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2): 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Khudor, M., H. Issa, A. and L. Jassim, F. 2012. Detection of *rfbO157* and *fliCH7* Genes in *Escherichia coli* Isolated from Human and Sheep in Basrah Province. *Rafidain Journal of Science*, 23(1): 19–33.
- Kim, J. M., Garcia-Alcala, M., Balleza, E. and Cluzel, P. 2020. Stochastic transcriptional pulses orchestrate flagellar biosynthesis in *Escherichia coli*. *Science Advances*, 6(6): eaax0947.
- Köhler, C.-D. and Dobrindt, U. 2011. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 301(8): 642–647.
- Koo, H. B. and Seo, J. 2019. Antimicrobial peptides under clinical investigation. *Peptide Science*, 111(5): 875.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M. and Hultgren, S. J. 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(4): a010306.
- Kudinha, T. 2017. The pathogenesis of *Escherichia coli* urinary tract infection. *Escherichia Coli—Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. InTech, 45–61.
- Laganenka, L., Colin, R. and Sourjik, V. 2016. Chemotaxis towards autoinducer 2 mediates autoaggregation in *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 7(1): 12984.
- Lai, Y., Rosenshine, I., Leong, J. M. and Frankel, G. 2013. Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 15(11): 1796–1808.
- LaPointe, P., Wei, X. and Gariépy, J. 2005. A role for the protease-sensitive loop region of Shiga-like toxin 1 in the retrotranslocation of its A1 domain from the endoplasmic reticulum lumen. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(24): 23310–23318.
- Legros, N., Pohlentz, G., Steil, D. and Müthing, J. 2018. Shiga toxin-glycosphingolipid interaction: Status quo of research with focus on primary human brain and kidney endothelial cells. *International Journal of Medical Microbiology*, 308(8): 1073–1084.

- Leimbach, A., Hacker, J. and Dobrindt, U. 2013. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Between Pathogenicity and Commensalism*, 3–32.
- Lerminiaux, N. A. and Cameron, A. D. S. 2019. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1): 34–44.
- Lewis, S. B., Cook, V., Tighe, R. and Schüller, S. 2015. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* colonization of human colonic epithelium in vitro and ex vivo. *Infection and Immunity*, 83(3): 942–949.
- Li, H. and Gänzle, M. 2016. Some Like It Hot: Heat Resistance of *Escherichia coli* in Food. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1763.
- Lim, J. Y., Yoon, J. W. and Hovde, C. J. 2010. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1): 5.
- Lin, J., Nishino, K., Roberts, M. C., Tolmasky, M., Aminov, R. I. and Zhang, L. 2015. Mechanisms of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 6, 123658.
- Lindsey, R. L., Pouseele, H., Chen, J. C., Strockbine, N. A. and Carleton, H. A. 2016. Implementation of Whole Genome Sequencing (WGS) for Identification and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) in the United States. *Frontiers in Microbiology*, 7, 766.
- Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A. V, Guo, X., Cao, H., Wang, Q., Reeves, P. R., Knirel, Y. A., Wang, L. and Widmalm, G. 2020. Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6): 655–683.
- Liu, D. 2015. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 1133–1146). Elsevier.
- Liu, F., Huang, J. and Sadler, J. E. 2011. Shiga toxin (Stx)1B and Stx2B induce von Willebrand factor secretion from human umbilical vein endothelial cells through different signaling pathways. *Blood*, 118(12): 3392–3398.
- Loconsole, D., Giordano, M., Laforgia, N., Torres, D., Santangelo, L., Carbone, V., Parisi, A., Quarto, M., Scavia, G., Chironna, M. and Bloody Diarrhea Apulia Working Group. 2020. Case-management protocol for bloody diarrhea as a model to reduce the clinical impact of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Experience from Southern Italy. *European Journal of Clinical Microbiology and*

- Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology, 39(3): 539–547.
- Lupindua, A. M. 2018. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in Africa in review. *Southern African Journal of Infectious Diseases*, 33(1): 24–30.
- Lüthje, P. and Brauner, A. 2014. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Advances in Microbial Physiology*, 65, 337–372.
- MacGowan, A. and Macnaughton, E. 2017. Antibiotic resistance. *Medicine*, 45(10): 622–628.
- Makia, R. S., Fadhil, A. M. A. and Ismail, M. C. 2013. Biofilm production as a virulence factor in Uropathogenic bacteria and yeasts. *Journal of Biotechnology Research Center*, 7(1): 29–34.
- Makvana, S. and Krilov, L. R. 2015. *Escherichia coli* infections. *Pediatrics in Review*, 36(4): 167–170.
- Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D. and Pitout, J. D. D. 2019. Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(3): 10–1128.
- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E. and Okoh, A. 2018. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules*, 23(4): 795.
- Marc, C., Vrignaud, B., Levieux, K., Robine, A., Guen, C. G.-L. and Launay, E. 2016. Inappropriate prescription of antibiotics in pediatric practice: Analysis of the prescriptions in primary care. *Journal of Child Health Care*, 20(4): 530–536.
- Martelli, A., Cortecchia, V. and Ventriglia, L. 1989. Aztreonam in the treatment of urinary tract infections: a multicenter trial. *Chemotherapy*, 35(1): 8–14.
- Martínez, J. L., Coque, T. M. and Baquero, F. 2015. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nature Reviews Microbiology*, 13(2): 116–123.
- Martínez-Martínez, L., Fernández, F. and Perea, E. J. 1999. Relationship between haemolysis production and resistance to fluoroquinolones among clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43(2): 277–279.
- Masood, A., Adeel, B., Syed, S., Ali, M. Q., Hanif, A., Naqvi, S. Z. H. and Iqbal, H. A., Mahmood, A., Masood, F. and Tahir, I. 2023. Detection and Molecular

- Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated From Children With Diarrhea In Tertiary Care Hospital Of Lahore, Pakistan. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, 30(18): 2143–2153.
- May, T. and Okabe, S. 2008. *Escherichia coli* harboring a natural IncF conjugative F plasmid develops complex mature biofilms by stimulating synthesis of colanic acid and curli. *Journal of Bacteriology*, 190(22): 7479–7490.
- Melton-Celsa, A. R. 2014. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiology Spectrum*, 2(4): 10–1128.
- Mendoza-Palomar, N., Balasch-Carulla, M., González-Di Lauro, S., Céspedes, M. C. andreu, A., Frick, M. A., Linde, M. Á. and Soler-Palacin, P. 2017. *Escherichia coli* early-onset sepsis: trends over two decades. *European Journal of Pediatrics*, 176(9): 1227–1234.
- Michelacci, V. 2013. Identification and functional analysis of virulence determinants of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC).
- Minardi, D., d’Anzeo, G., Cantoro, D., Conti, A. and Muzzonigro, G. 2011. Urinary tract infections in women: etiology and treatment options. *International Journal of General Medicine*, 333–343.
- Mittal, S., Sharma, M. and Chaudhary, U. 2015. Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens and Global Health*, 109(1): 26–29.
- Moharana, S. S., Panda, R. K., Dash, M., Chayani, N., Bokade, P., Pati, S. and Bhattacharya, D. 2019. Etiology of childhood diarrhoea among under five children and molecular analysis of antibiotic resistance in isolated enteric bacterial pathogens from a tertiary care hospital, Eastern Odisha, India. *BMC Infectious Diseases*, 19, 1–9.
- Mohr, K. I. 2016. History of antibiotics research. How to Overcome the Antibiotic Crisis: Facts, Challenges, Technologies and Future Perspectives, 16(7): 237-272.
- Mohsin, M., Hussain, A., Butt, M. A., Bashir, S., Tariq, A., Babar, S., Ali, A., Haque, A., Sarwar, Y. and Haque, A. 2007. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal patients in Faisalabad region of Pakistan as determined by multiplex PCR. *Journal of Infection in Developing Countries*, 1(2): 164–169.
- Möndel, M., Schroeder, B. O., Zimmermann, K., Huber, H., Nuding, S., Beisner, J., Fellermann, K., Stange, E. F. and Wehkamp, J. 2009. Probiotic *E. coli* treatment

- mediates antimicrobial human beta-defensin synthesis and fecal excretion in humans. *Mucosal Immunology*, 2(2): 166–172.
- Muniesa, M., Hammerl, J. A., Hertwig, S., Appel, B. and Brüssow, H. 2012. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4: a new challenge for microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12): 4065–4073.
- Muniesa, M., Jofre, J., García-Aljaro, C. and Blanch, A. R. 2006. Occurrence of *Escherichia coli* O157: H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the environment. *Environmental Science and Technology*, 40(23): 7141–7149.
- Munita, J. M. and Arias, C. A. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Nadell, C. D. and Bassler, B. L. 2011. A fitness trade-off between local competition and dispersal in *Vibrio cholerae* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(34): 14181–14185.
- Nainu, F., Masyita, A., Bahar, M. A., Raihan, M., Prova, S. R., Mitra, S., Emran, T. Bin, and Simal-Gandara, J. 2021. Pharmaceutical Prospects of Bee Products: Special Focus on Anticancer, Antibacterial, Antiviral, and Antiparasitic Properties. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*: 10(7): 46-47.
- Nasir, N. A., Ali, S. H. M., AL-Ess, H. Q. M. A., Hussein, W. A., Al-Janabi, M. K. W., Mohammed, K. I. A. and Mosa, J. M. 2020. *Escherichia Coli* O157: H7 Investigation In Children With Diarrhea: An Iraqi Cross-Sectional Study. *Euromediterranean Biomedical Journal*, 15(8): 19-24.
- National Association of State Public Health Veterinarians, I. (NASPHV): and Centers for Disease Control. 2011. Compendium of measures to prevent disease associated with animals in public settings, 2011: National Association of State Public Health Veterinarians, Inc. *MMWR. Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports / Centers for Disease Control*, 60(RR-04): 1–24.
- Nepal, G. and Bhatta, S. 2018. Self-medication with antibiotics in WHO Southeast Asian Region: a systematic review. *Cureus*, 10(4).
- Nessa, K., Ahmed, D., Islam, J., Kabir, F. L. and Hossain, M. A. 2007. Usefulness of a multiplex PCR for detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in a diagnostic microbiology laboratory setting. *Bangladesh J Med Microbiol*, 1(2): 38–42.

- O'Brien, A. D., Melton, A. R., Schmitt, C. K., McKee, M. L., Batts, M. L. and Griffin, D. E. 1993. Profile of *Escherichia coli* O157:H7 pathogen responsible for hamburger-borne outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in Washington. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(10): 2799–2801.
- Odoki, M., Almustapha Aliero, A., Tibyangye, J., Nyabayo Maniga, J., Wampande, E., Drago Kato, C., Agwu, E. and Bazira, J. 2019. Prevalence of bacterial urinary tract infections and associated factors among patients attending hospitals in Bushenyi district, Uganda. *International Journal of Microbiology*, 2019.
- Page, M. G. P. 2011. Beta-lactam antibiotics. In *Antibiotic discovery and development* (pp. 79–117). Springer.
- Pagel, M. 1994. Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 255(1342): 37–45.
- Pakbin, B., Brück, W. M. and Rossen, J. W. A. 2021. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18): 104.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J. and Cheng, Z. 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1): 177–192.
- Peng, J., Yang, J. and Jin, Q. 2009. The molecular evolutionary history of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 9(1): 147–152.
- Peterson, E. and Kaur, P. 2018. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2928.
- Pianciola, L., D'Astek, B. A., Mazzeo, M., Chinen, I., Masana, M. and Rivas, M. 2016. Genetic features of human and bovine *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated in Argentina. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 306(2): 123–130.

- Piérard, D., De Greve, H., Haesebrouck, F. and Mainil, J. 2012. O157:H7 and O104:H4 Vero/Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreaks: respective role of cattle and humans. *Veterinary Research*, 43(1): 13. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-13>
- Pormohammad, A., Pouriran, R., Azimi, H. and Goudarzi, M. 2019. Prevalence of integron classes in Gram-negative clinical isolated bacteria in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(2): 118–127.
- Probert, W. S., Miller, G. M. and Ledin, K. E. 2017. Contaminated stream water as source for *Escherichia coli* O157 illness in children. *Emerging Infectious Diseases*, 23(7): 1216.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E. and Sintim, H. O. 2015. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4): 493–512.
- Reygaert, W. C. 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3): 482–501.
- Ribeiro da Cunha, B., Fonseca, L. P. and Calado, C. R. C. 2019. Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go? *Antibiotics* (Basel, Switzerland): 8(2): 12.
- Richard, H. and Foster, J. W. 2004. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *Journal of Bacteriology*, 186(18): 6032–6041.
- Richard, H. T. and Foster, J. W. 2003. Acid resistance in *Escherichia coli*. *Advances in Applied Microbiology*, 52, 167–186. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(03\)01007-4](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(03)01007-4)
- Rivas, M., Caletti, M. G., Chinen, I., Refi, S. M., Roldán, C. D., Chillemi, G., Fiorilli, G., Bertolotti, A., Aguerre, L. and Sosa Estani, S. 2003. Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 9(9): 1184–1186.
- Rodrigues, A. C., Cara, D. C., Fretez, S. H., Cunha, F. Q., Vieira, E. C., Nicoli, J. R. and Vieira, L. Q. 2000. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *Journal of Applied Microbiology*, 89(3): 404–414.

- Rowell, S., King, C., Jenkins, C., Dallman, T. J., Decraene, V., Lamden, K., Howard, A., Featherstone, C. A. and Cleary, P. 2016. An outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroup O157 linked to a lamb-feeding event. *Epidemiology and Infection*, 144(12): 2494–2500.
- Rumbaugh, K. P. and Sauer, K. 2020. Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10): 571–586.
- Salinas, N., Povolotsky, T. L., Landau, M. and Kolodkin-Gal, I. 2020. Emerging roles of functional bacterial amyloids in gene regulation, toxicity, and immunomodulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(1): 10–1128.
- Salmani, H., Azarnezhad, A., Fayazi, M. R. and Hosseini, A. 2016. Pathotypic and phylogenetic study of diarrheagenic *Escherichia coli* and uropathogenic *E. coli* using multiplex polymerase chain reaction. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(2): 58.
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G. and Choroszy-Krol, I. 2019a. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*, 11, 10.
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G. and Choroszy-Krol, I. 2019b. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*, 11(1): 10.
- Sartz, L., De Jong, B., Hjertqvist, M., Plym-Forsell, L., Alsterlund, R., Löfdahl, S., Osterman, B., Ståhl, A., Eriksson, E., Hansson, H.-B. and Karpman, D. 2008. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiology and Infection*, 136(3): 370–380.
- Scaletsky, I. C. A., Souza, T. B., Aranda, K. R. S. and Okeke, I. N. 2010. Genetic elements associated with antimicrobial resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Brazil. *BMC Microbiology*, 10, 25. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-25>
- Scallan, E., Mahon, B. E., Hoekstra, R. M. and Griffin, P. M. 2013. Estimates of illnesses, hospitalizations and deaths caused by major bacterial enteric pathogens in young

- children in the United States. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(3): 217–221.
- Scheutz, F. 2014. Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 2(3): 866.
- Scheutz, F. 2015. Taxonomy Meets Public Health: The case of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Enterohemorrhagic Escherichia Coli and Other Shiga Toxin-Producing E. Coli*, 15–36.
- Schwidder, M., Heinisch, L. and Schmidt, H. 2019. Genetics, Toxicity, and Distribution of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hemolysin. *Toxins*, 11(9): 502. <https://doi.org/10.3390/toxins11090502>
- Seifi, K., Kazemian, H., Heidari, H., Rezagholizadeh, F., Saeed, Y., Shirvani, F. and Hourii, H. 2016. Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(1): e30682.
- Singh, S., Datta, S., Narayanan, K. B. and Rajnish, K. N. 2021. Bacterial exopolysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, 1–19.
- Sreeja, M. K., Gowrishankar, N. L., Adisha, S. and Divya, K. C. 2017. Antibiotic resistance-reasons and the most common resistant pathogens-A review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10(6): 1886–1890.
- Stefaniuk, E., Suchocka, U., Bosacka, K. and Hryniewicz, W. 2016. Etiology and antibiotic susceptibility of bacterial pathogens responsible for community-acquired urinary tract infections in Poland. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 35(8): 1363–1369.
- Stevens, M. P. and Frankel, G. M. 2014. The Locus of Enterocyte Effacement and Associated Virulence Factors of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 2(4): EHEC-0007-2013.
- Strachan, N. J., Fenlon, D. R. and Ogden, I. D. 2001. Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiology Letters*, 203(1): 69–73.

- Sturbelle, R. T., de Avila, L. F. da C., Roos, T. B., Borchardt, J. L., Dellagostin, O. A. and Leite, F. P. L. 2015. The role of quorum sensing in *Escherichia coli* (ETEC) virulence factors. *Veterinary Microbiology*, 180(3–4): 245–252.
- Sulis, G., Daniels, B., Kwan, A., Gandra, S., Daftary, A., Das, J. and Pai, M. 2020. Antibiotic overuse in the primary health care setting: a secondary data analysis of standardised patient studies from India, China and Kenya. *BMJ Global Health*, 5(9): e003393.
- Tabasi, M., Karam, M. R. A., Habibi, M., Yekaninejad, M. S. and Bouzari, S. 2015. Phenotypic assays to determine virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolates and their correlation with antibiotic resistance pattern. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 6(4): 261–268.
- Tarchouna, M., Ferjani, A., Ben-Selma, W. and Boukadida, J. 2013. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(6): e450–e453.
- Tarr, P. I., Schoening, L. M., Yea, Y. L., Ward, T. R., Jelacic, S. and Whittam, T. S. 2000. Acquisition of the *rfb-gnd* cluster in evolution of *Escherichia coli* O55 and O157. *Journal of Bacteriology*, 182(21): 6183–6191.
- Terajima, J, Izumiya, H., Iyoda, S., Tamura, K. and Watanabe, H. 1999. Detection of a multi-prefectural *E coli* O157:H7 outbreak caused by contaminated Ikura-Sushi ingestion. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 52(2): 52–53.
- Terajima, Jun, Izumiya, H., Hara-Kudo, Y. and Ohnishi, M. 2017. Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* and Foodborne Disease: A Review. *Food Safety (Tokyo, Japan)*: 5(2): 35–53.
- Terciolo, C., Dapigny, M. and Andre, F. 2019. Beneficial effects of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on clinical disorders associated with intestinal barrier disruption. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 12, 67–82.
- Tiago, F. C. P., Porto, B. A. A., Ribeiro, N. S., Moreira, L. M. C., Arantes, R. M. E., Vieira, A. T., Teixeira, M. M., Generoso, S. V, Nascimento, V. N., Martins, F. S. and Nicoli, J. R. 2015. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG A-905 in experimental model of inflammatory bowel disease. *Beneficial Microbes*, 6(6): 807–815.

- Torso, L. M., Voorhees, R. E., Forest, S. A., Gordon, A. Z., Silvestri, S. A., Kissler, B., Schlackman, J., Sandt, C. H., Toma, P., Bachert, J., Mertz, K. J. and Harrison, L. H. 2015. *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak Associated with Restaurant Beef Grinding. *Journal of Food Protection*, 78(7): 1272–1279.
- Trofa, A. F., Ueno-Olsen, H., Oiwa, R. and Yoshikawa, M. 1999. Dr. Kiyoshi Shiga: discoverer of the dysentery bacillus. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 29(5): 1303–1306.
- Tuem, K. B., Gebre, A. K., Atey, T. M., Bitew, H., Yimer, E. M. and Berhe, D. F. 2018. Drug Resistance Patterns of *Escherichia coli* in Ethiopia: A Meta-Analysis. *BioMed Research International*, 2018, 4536905.
- Tyler, J. S., Mills, M. J. and Friedman, D. I. 2004. The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. *Journal of Bacteriology*, 186(22): 7670–7679.
- Vally, H., Hall, G., Dyda, A., Raupach, J., Knope, K., Combs, B. and Desmarchelier, P. 2012. Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in Australia, 2000–2010. *BMC Public Health*, 12, 1–12.
- Van Dijk, W. C., Verbrugh, H. A., van der Tol, M. E., Peters, R. and Verhoef, J. 1979. Role of *Escherichia coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonization. *Infection and Immunity*, 25(2): 603–609.
- Varma, J. K., Greene, K. D., Reller, M. E., DeLong, S. M., Trottier, J., Nowicki, S. F., DiOrio, M., Koch, E. M., Bannerman, T. L. and York, S. T. 2003. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *Jama*, 290(20): 2709–2712.
- Vélez, M. V., Colello, R., Etcheverría, A. I., Vidal, R. M., Montero, D. A., Acuña, P., Guillén Fretes, R. M., Toro, M. and Padola, N. L. 2020. Distribution of Locus of Adhesion and Autoaggregation and *hes* Gene in STEC Strains from Countries of Latin America. *Current Microbiology*, 77(9): 2111–2117.
- Ventura, M., Turrone, F., Motherway, M. O., MacSharry, J. and van Sinderen, D. 2012. Host–microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. *Trends in Microbiology*, 20(10): 467–476.
- Verderosa, A. D., Totsika, M. and Fairfull-Smith, K. E. 2019. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Frontiers in Chemistry*, 7, 824.

- Verma, A., Bolton, F. J., Fiefield, D., Lamb, P., Woloschin, E., Smith, N. and McCann, R. 2007. An outbreak of *E. coli* O157 associated with a swimming pool: an unusual vehicle of transmission. *Epidemiology and Infection*, 135(6): 989–992.
- Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M. and Lejeune, P. 1998. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. *Journal of Bacteriology*, 180(9): 2442–2449.
- Von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., Mills, N. D., Majumder, S. and Wolffs, P. F. G. 2016. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 174871.
- Wachtel, M. R., Whitehand, L. C. and Mandrell, R. E. 2002. Association of *Escherichia coli* O157: H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *Journal of Food Protection*, 65(1): 18–25.
- Wagenlehner, F. M. E., Hoyme, U., Kaase, M., Fünfstück, R., Naber, K. G. and Schmiemann, G. 2011. Uncomplicated urinary tract infections. *Deutsches Ärzteblatt International*, 108(24): 415.
- Wagner, P. L., Neely, M. N., Zhang, X., Acheson, D. W., Waldor, M. K. and Friedman, D. I. 2001. Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *Journal of Bacteriology*, 183(6): 2081–2085.
- Waldor, M. K. and Friedman, D. I. 2005. Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4): 459–465.
- Wiksw, M. E., Hall, A. J. and Centers for Disease Control. 2012. Outbreaks of acute gastroenteritis transmitted by person-to-person contact--United States, 2009-2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries*, 61(9): 1–12.
- World Health Organization. 2002. The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life. World Health Organization, 248 page, Geneva.
- Zhao, R., Feng, J., Liu, J., Fu, W., Li, X. and Li, B. 2019. Deciphering of microbial community and antibiotic resistance genes in activated sludge reactors under high selective pressure of different antibiotics. *Water Research*, 151, 388–402.
- Zhu, C., Setty, P. and Boedeker, E. C. 2017. Development of live attenuated bacterial vaccines targeting *Escherichia coli* heat-labile and heat-stable enterotoxins. *Veterinary Microbiology*, 202, 72–78.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Talal Hasan Jaber ALFKAWI

Eğitim

Doktora	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020-2024
Yüksek Lisans	Tikrit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2017-2019
Lisans	Kerkük Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Teknik Tıbbi Laboratuvarlar Bölümü	2003-2007