



2024

MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS (İÖ)

MİKROBİYOLOJİ

ABDULLAH SERBEST



T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI (İÖ)
YL-2024-0004

İSHALLİ KÖPEKLERDEN ELDE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI*
İZOLATLARININ PATOTİPİK VE FİLOGENETİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ABDULLAH SERBEST
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

AYDIN 2024

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (İÖ)
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**İSHALLİ KÖPEKLERDEN ELDE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI*
İZOLATLARININ PATOTİPİK VE FİLOGENETİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

ABDULLAH SERBEST
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-23037 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2024

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı (İÖ) çerçevesinde Abdullah SERBEST tarafından hazırlanan “İshalli köpeklerden elde edilen *Escherichia coli* izolatlarının patotipik ve filogenetik özelliklerinin incelenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22/01/2024

Üye (T.D.) : Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Ayşe KILIÇ Fırat Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Uğur PARIN Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görevli tüm öğretim üyelerine ve özellikle Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araş. Gör. Yiğit SEFEROĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince gösterdiği sabır, özveri ve destekleri için aileme ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1. Kommensal <i>E. coli</i>	4
2.1.2. Diyarejenik <i>E. coli</i>	5
2.1.2.1. Enteropatojenik <i>E. coli</i> (EPEC)	9
2.1.2.2. Enterohemorajik <i>E. coli</i> (EHEC)	11
2.1.2.3. Enterotoksijenik <i>E. coli</i> (ETEC)	13
2.1.2.4. Enteroinvaziv <i>E. coli</i> (EIEC)	15
2.1.2.5. Enteroagregatif <i>E. coli</i> (EAEC)	16
2.1.2.6. Diffuzaderent <i>E. coli</i> (DAEC)	18
2.1.2.7. Adherent Invaziv <i>Escherichia coli</i> (AIEC)	19
2.1.3. <i>E. coli</i> Filotiplendirmesi	20
2.1.4. <i>E. coli</i> 'ye Karşı Antimikrobiyal Direnç ve Hayvan Sağlığı Üzerindeki Etkisi	23

2.1.4.1. Antibiyotik Direncinin Mekanizmaları ve <i>E. coli</i> 'de Antibiyotik Direnci.....	23
2.1.4.2. <i>E. coli</i> 'nin Hayvan Sağlığı Üzerindeki Zararlı Etkileri.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Gereç	26
3.1.1. Cihazlar	26
3.1.2. Hayvan Materyali	26
3.1.3. Referans Suşlar.....	27
3.1.4. Besiyerleri.....	27
3.1.4.1. Kanlı Agar.....	27
3.1.4.2. Eosin Methylene Blue Agar.....	28
3.1.4.3. MacConkey Agar.....	28
3.1.4.4. Nutrient Agar.....	28
3.1.4.5. Nutrient Broth.....	28
3.1.4.6. Brain Heart Infusion Broth.....	28
3.1.5. Ayıraç ve Boyalar.....	29
3.1.5.1. Gram Boyama Seti.....	29
3.1.5.2. Oksidaz Ayıracı.....	29
3.1.5.3. Hidrojen Peroksit.....	29
3.1.6. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	29
3.1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	30
3.1.7.1. Kullanılan Boya ve Solusyonlar.....	30
3.1.7.1.1. 10x Tris Borik Asit EDTA Buffer.....	30
3.1.7.1.2. 0,5x TBE.....	30
3.1.7.1.3. Yükleme Tamponu.....	31
3.1.7.1.4. 5x FIREPol® Master Mix.....	31
3.1.7.1.5. Primerler.....	32

3.1.7.1.6. Agaroz Jel.....	33
3.1.7.1.7. Elektroforez.....	33
3.1.7.1.8. Görüntüleme.....	33
3.1.7.1.9. Marker.....	33
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Bakteri İzolasyon ve İdentifikasyonu	34
3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	34
3.2.3. DNA İzolasyonu, Miktar Tayinleri ve Saflık Kontrolleri.....	35
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	36
3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme	37
4. BULGULAR	38
4.1. Bakteri İzolasyon ve İdentifikasyonu	38
4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	38
4.2.1. Patotiplendirme.....	38
4.2.2. Filotiplendirme.....	40
4.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	42
4.3.1. Çoklu Antibiyotik Direnci.....	41
4.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	45
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	58
EKLER	76
Ek 1 (ADÜ-HADYEK)	76
BİLİMSEL ETİK BEYANI	77
ÖZ GEÇMİŞ	78

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a-EPEC	: Atipik EPEC
AIEC	: Adherent İnvaziv
AMP	: Ampisilin
AMR	: Antimikrobiyal Direnç
AN	: Amikasin
APEC	: Avian Patojenik <i>E. coli</i>
ATM	: Aztreonam
AXC	: Amoksisilin Klavulanat
<i>bfp</i>	: Tip-IV pili
CAZ	: Seftazidim
CD	: Crohn's Hastalığı
CF	: Kolonizasyon Faktörü
CFTR	: Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
CIP	: Siprofloksasin
COL	: Kolistin
CRO	: Seftriakson
CXM	: Sefuroksim
DAEC	: Diffüz Olarak Yapışan
DEC	: İntestinal Patojenik <i>E. coli</i>
EAEC	: Enteroagregatif
EHEC	: Enterohemorajik
EIEC	: Enteroinvasiv

EMB	: Eosin Methylene Blue Agar
EPEC	: Enteropatojenik
ETEC	: Enterotoksijenik
ETP	: Ertapenem
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
ExPEC	: Ekstraintestinal Patojenik
FEP	: Sefepim
<i>fimH</i>	: Tip 1 Fimbriya
GM	: Gentamisin
IPM	: İmipenem
İBD	: İltihaplı Bağırsak Hastalığı
<i>lfa/efal</i>	: Lenfosit İnhibe Edici Faktör
LT	: Isıya Duyarlı Toksinler
MDR	: Çoklu Antibiyotik Direnci
MEM	: Meropenem
MLST	: Çok Lokuslu Dizi Tipi
MPEC	: Meme Patojenik <i>E. coli</i>
NET	: Netilmisin
NMEC	: Neonatal Menejit <i>E. coli</i>
PAI	: Kromozomal Patojenisite Adası
PIP	: Piperasilin
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEPEC	: Sepsis ile İlişkili <i>E. coli</i>
ST	: Isıya Dayanıklı Toksinler
SXT	: Trimetoprim Sülfametoksazol
T3SS	: Tip Üç Sekresyon Sistemi

t-EPEC : Tipik EPEC
TGC : Tigesiklin
TZP : Piperasilin Tazobaktam

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	İshal ve sağlıklı köpeklerden elde edilen <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotiklere dirençlilik durumları.....	44
Şekil 2.	İshal ve sağlıklı köpeklerden elde edilen <i>E. coli</i> izolatlarının MDR durumlarının dağılımı.....	45

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	a. Farklı <i>E. coli</i> suşları arasındaki fenotipik ve filogenetik ilişkiler	
	b. <i>E. coli</i> grupları ve ilişkili patotipleri.....	4
Resim 2.	a. EMB agarda karakteristik yeşil metalik parlaklık gösteren ve	
	b. MacConkey agar'da laktoz fermentasyonu pozitif <i>E. coli</i> izolatları.....	38
Resim 3.	Patotip ile ilişkili virülans gen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	40
Resim 4.	Yeni Clermont filotipleme yöntemi ile dörtlü PZR profilleri.....	41

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	Enterik <i>E. coli</i> patotiplerinin virölans faktör genleri.....	5
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan primerler.....	32
Tablo 3.	Mastermixin hazırlanma oranları.....	36
Tablo 4.	İshal ve sağlıklı köpeklerden elde edilen <i>E. coli</i> izolatlarının patotipleri.....	39
Tablo 5.	İshal ve sağlıklı köpeklerden elde edilen <i>E. coli</i> izolatlarının filotipleri.....	41
Tablo 6.	<i>E. coli</i> izolatlarının taşıdıkları virölans genleri ve filotipleri.....	42
Tablo 7.	<i>E. coli</i> izolatlarının antimikrobiyal dirençleri.....	43
Tablo 8.	İshal ve sağlıklı köpeklerden elde edilen <i>E. coli</i> izolatlarının çoklu antibiyotik direnç durumları.....	45
Tablo 9.	Klinik durum ile izolatların antibiyotiklere direnç durumları arasındaki ilişki.....	46
Tablo 10.	Klinik durum ile izolatların çoklu antibiyotik direnç durumları arasındaki ilişki.....	47
Tablo 11.	Klinik durum ile izolatların patotipleri arasındaki ilişki.....	47
Tablo 12.	Klinik durum ile izolatların filotipleri arasındaki ilişki.....	48

ÖZET

İSHALLİ KÖPEKLERDEN ELDE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* İZOLATLARININ PATOTİPİK VE FİLOGENETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Serbest A. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Mikrobiyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2024.

Amaç: Bu çalışmada evcil köpeklerden elde edilen intestinal patojenik *Escherichia coli* (DEC) izolatlarının patotiplerinin, filotiplerinin ve antimikrobiyal direnç durumlarının değerlendirilmesi ve arasındaki ilişkilerinin analiz edilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, 40 ishal ve 40 ishal olmayan evcil köpekten alınan rektal sürüntü örneklerinden elde edilen 200 *E. coli* izolatu materyal olarak kullanıldı. *E. coli* izolasyonları klasik konvansiyonel yöntemler ile gerçekleştirildikten sonra identifikasyonlar BD Phoenix 100 sistemi kullanılarak yapıldı. Genotipik olarak da polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile doğrulandı. İzolatların patotipleri grupları multipleks PZR ile belirlendi. Antibiyotik duyarlılık testlerinde BD Phoenix 100 otomatize sistem kullanıldı.

Bulgular: Patotiplendirme çalışmaları tüm *E. coli* izolatlarının EHEC (%47,2), EPEC (%34,5), ETEC (%12,8), EIEC (%5,5) patotiplerinde bulunduğunu; filotiplendirme çalışmaları ise izolatların filogrup B2 ve C (%23,7), D (%20,0), B1 (%12,7), E (%9,0), F (%3,6) ve A (%1,8) filotiplerinde yer aldığını gösterdi. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları izolatların tüm %78,2'sinin çoklu antibiyotik direncine (MDR) sahip olduğunu ortaya koydu. Köpeklerin klinik durumu ile ampisilin, amoksisilin klavulonat, siprofloksasin ve tigesiklin direnci arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki tespit edilirken; izolatların çoklu antibiyotik direnç durumları, patotipleri ve filotipleri arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki saptanmadı.

Sonuç: Köpek izolatlarında DEC patotiplerine özgü virülans genlerinin varlığı ishal olan köpekler kadar sağlıklı görünümlü evcil köpeklerin insan enfeksiyonlarının potansiyel bir kaynağı olabileceğini ve çok farklı filogrupların varlığı *E. coli* popülasyon çeşitliliğini ortaya koyarken; çoklu antibiyotik direnci taşıyan izolatların yüksek oranı enfeksiyonların tedavisi ve kontrolü için antibiyotik seçiminin özenle yapılması gerekliliğini belirtmektedir.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli*, Filotip, İshal, Köpek, Patotip.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PATHOTYPIC AND PHYLOGENETIC CHARACTERISTICS OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES OBTAINED FROM DOGS WITH DIARRHEA

Serbest A. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Microbiology Program, Master Thesis, Aydın, 2024.

Objective: This study aimed to evaluate the pathotypes, phylogroups, and antimicrobial resistance profiles of intestinal pathogenic *Escherichia coli* (DEC) isolates obtained from pet dogs and analyze their relationships.

Material and Methods: In this study, 200 *E. coli* isolates obtained from rectal swab samples taken from 40 diarrheal and 40 non-diarrheal domestic dogs were used as material. After *E. coli* isolations were carried out using classical conventional methods, identifications were made using the BD Phoenix 100 system. It was confirmed genotypically by polymerase chain reaction (PCR). The pathotype groups of the isolates were determined by multiplex PCR. BD Phoenix 100 automated system was used in antibiotic susceptibility tests.

Results: The pathotyping studies revealed that all *E. coli* isolates were found to be in EHEC (47.2%), EPEC (34.5%), ETEC (12.8%), and EIEC (5.5%) pathotypes, while the phylogenetic studies showed that the isolates belonged to phylogroups B2 and C (23.7%), D (20.0%), B1 (12.7%), E (9.0%), F (3.6%), and A (1.8%). Antimicrobial susceptibility testing results indicated that 78.2% of the all isolates exhibited multidrug resistance (MDR). Significant statistical associations were found between the clinical status of dogs and resistance to ampicillin, amoxicillin-clavulanate, ciprofloxacin, and tigecycline. However, no significant statistical relationships were observed between the isolates' MDR, pathotypes, phylogroups.

Conclusion: The presence of virulence genes specific to DEC pathotypes in canine isolates suggests that not only diarrheic dogs but also apparently healthy domestic dogs could potentially serve as a source of human infections. Additionally, the existence of various phylogroups highlights the diversity within the *E. coli* population, and the high prevalence of isolates carrying multiple antibiotic resistances underscores the necessity for careful antibiotic selection in the treatment and control of these infections.

Keywords: Diarrhea, Dogs, *Escherichia coli*, Pathotype, Phylogroup.

1. GİRİŞ

Escherichia coli, *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesi olarak, insanların ve hayvanların normal kommensal biyotasının önemli bir parçasıdır. Ancak, bazı *E. coli* suşları, hem insanlarda hem de hayvanlarda birçok klinik ishal vakasıyla ilişkilidir (Majowicz ve diğerleri, 2014). Bu suşların patojenitesinden sorumlu çok farklı virülans genleri taşıdığı bilinmektedir (Torkan ve diğerleri, 2016). Bu bağlamda, yedi farklı *E. coli* patotipi belirlenmiştir: enteropatogenik (EPEC), enterohemorajik (EHEC), enterotoksijenik (ETEC), enteroinvasiv (EIEC), enteroagregatif (EAEC), diffüz olarak yapışan (DAEC), adherent invaziv (AIEC) (Donnenberg, 2013).

E. coli suşları, filogenetik özellikleri ve genetik alt yapılarına göre farklı sınıflandırmalara tabi tutulabilir. Farklı filogenetik gruplara ait *E. coli* suşlarının farklı fenotipik ve genotipik özellikler gösterdiği belirlenmiştir (Tenaillon ve diğerleri, 2010). Clermont ve arkadaşları (2013), dört geni (*arpA*, *chuA*, *yjaA* ve *TspE4.C2*) analiz ederek, *E. coli* izolatlarını sekiz filogruba (A, B1, B2, C, D, E, F ve clade I) ayırmıştır (Clermont ve diğerleri, 2013). Filogenetik analizler, virulent ekstraintestinal *E. coli* suşlarının çoğunlukla B2 ve D grubuyla, kommensal suşların ise genellikle A veya B1 filogruları ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Clermont ve diğerleri, 2013).

Evcil hayvanlar tarafından dışkıyla atılan *E. coli*, patojenik ajanların zoonotik bulaşmasında önemli bir kaynak oluşturur (Puño-Sarmiento ve diğerleri, 2013). İshal olan hayvanlar, sık ve kontrolsüz olarak dışkıladıklarından dolayı, ishal olmayan hayvanlardan daha fazla *E. coli* yayılmasına katkıda bulunurlar. Patojenik ve patojenik olmayan *E. coli* suşları, antimikrobiyal direnç genlerinin potansiyel rezervuarları olarak kabul edilir ve köpek dışkılarındaki varlıkları, halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturur (Majowicz ve diğerleri, 2014). Bu durum, köpek sahipleri, bakıcıları, çocuklar ve veteriner hekimler gibi bu hayvanlarla doğrudan temas halinde olan kişileri daha yüksek risk altına sokar.

Evcil hayvanlar, insanların yaşamında önemli bir yer tutmakta ve evcil hayvanlarla birlikte yaşayan insan sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle, evcil hayvanların potansiyel zoonotik hastalık taşıyıcısı olması, halk sağlığı için önemli bir konudur. Ayrıca bakterilerde gelişen antimikrobiyal direnç, tıbbi tedavi seçeneklerini kısıtlamakta ve hastalıkların yönetimini zorlaştırmaktadır. Antimikrobiyal dirençli *E. coli* suşlarının

hayvanlarda bulunması, evcil hayvan sahiplerinin ve veterinerlerin dikkatli olması gereken bir konudur.

Sıkı düzenlemelere sahip olmayan ülkelerde, evcil hayvanlarda antimikrobiyal ilaçların keyfi kullanımını yaygın bir sorundur. Bu uygulama, antimikrobiyal dirençli *E. coli* suşlarının artışına yol açmaktadır (Ewers ve diğerleri, 2012). Özellikle köpeklerde, β -laktamlar, fluorokinolonlar, sülfonamidler gibi antimikrobiyal ajanlarla tedavi, önemli bir halk sağlığı sorununa dönüşmektedir (Vega-Manriquez ve diğerleri, 2020).

Evcil hayvanlarda çoklu ilaca dirençli bakterilerin ortaya çıkması, enfeksiyonların tedavisi için antimikrobiyal ilaçların potansiyel kullanımını daraltması nedeniyle endişe verici bir durumdur. Antimikrobiyal direnç sürekli olarak evrim geçirdiğinden, antimikrobiyal direnç (AMR) düzenli olarak izleyen çalışmalar, tedavi kararlarını yönlendirmek ve güncel kontrol stratejileri geliştirmek için önemlidir. Genel olarak, antibiyotik direncindeki farklılık, antimikrobiyal ajanların seçimini karmaşıklaştırır, kültür ve duyarlılık testi yapma ihtiyacını artırır. Ayrıca, evcil hayvanlardaki hastalık oluşturan mikroorganizmaların insanlardakilerden farklı olma eğiliminde olmasına rağmen, antibiyotik direnç genlerinin insanlar ve evcil hayvanlar arasında geçiş yapma potansiyeli vardır (Cao ve diğerleri, 2022). Özellikle köpeklerden izole edilen *E. coli*'lerdeki antibiyotik direnç genlerinin insanlara geçme potansiyeli olduğu ve çoklu dirençli *E. coli* suşlarının köpeklerle sahipleri arasında paylaşıldığını öne sürülmektedir (Carvalho ve diğerleri, 2016). Türkiye'de pet hayvanlarının klinik örneklerden izole edilen *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal direnç durumları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır.

İshal hem insanlarda hem de hayvanlarda çok kompleks bir etiyolojiye sahip önemli sorundur. *E. coli*'nin, hayvanlardan insanlara bulaşarak ishal oluşturabilme kabiliyeti, bu bakterinin izlenmesini ve araştırılmasını önemli kılmaktadır. İshalli hastalardan izole edildiğinde, bu bakterilerin kaynak(lar)ının belirlenmesi hastalığın önlenmesinde önemli bir adımdır. Bu çalışmada evcil köpeklerden elde edilen intestinal patojenik *E. coli* izolatlarının patotiplerinin, filotiplerinin ve antimikrobiyal direnç durumlarının değerlendirilmesi ve aralarındaki ilişkilerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak, bu tez çalışması, hem veteriner hekimlik hem de halk sağlığı açısından önemli bir konuya odaklanarak, köpekler ve insanlar arasındaki potansiyel bakteriyel bulaşma riskini anlamamıza, mücadele etmemize olanak sağlayacak; elde edilen sonuçlar, veterinerlerin kararlarını yönlendirmek ve antimikrobiyal direnci izlemeye başlamak için değerli bir rehber olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Escherichia coli*

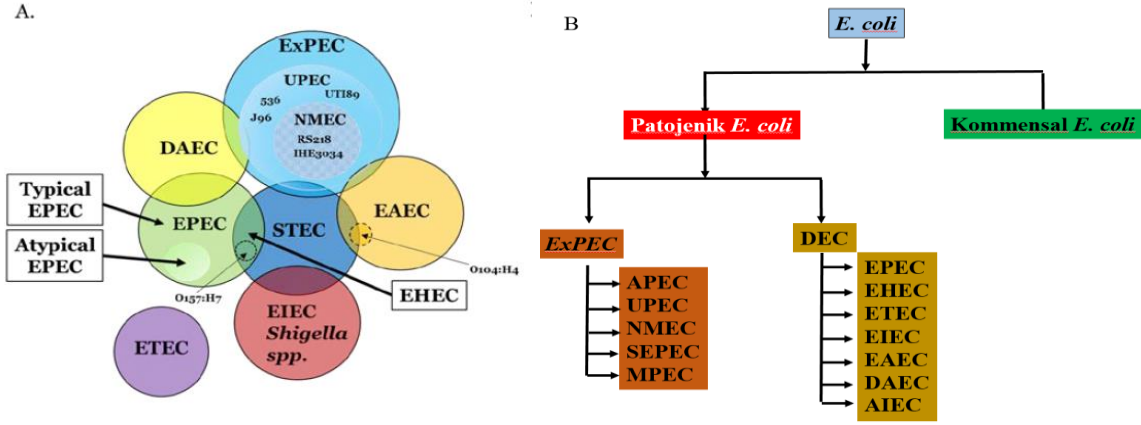
Escherichia coli *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesi olup; memeli hayvanların kalın bağırsağında yaşadığı için adını da buradan alır. İlk kez 1885 yılında Theodore von Escherich tarafından bebek dışkılarından izole edilmiş ve “*Bacterium coli commune*” adlandırılmış (Escobar-Paramo ve diğerleri, 2003); daha sonra Alman pediatri uzmanı Theodor Escherich tarafından araştırılan ve bebek bağırsaklarını kolonize eden bakterilerin karakteristikleri üzerine çalıştığı için, *Escherichia coli* olarak isimlendirilmiştir (Shulman ve diğerleri, 2007).

E. coli fakültatif, anaerobik, çomak şekilli olan bu bakteri 44°C inkube edildiği zaman laktozu asit ve gaz oluşturarak fermente etmektedir. Gram-negatif, sporsuz, yaklaşık olarak 1,1–1,5 µm çapında ve 1,0–6,0 µm uzunluğundadır. *E. coli* genellikle flagellası yardımıyla hareketlidir (Kaper ve diğerleri, 2004). *E. coli*, hızlı bir şekilde çoğalabilmesi, görece basit beslenme gereksinimlerine sahip olması ve genetik açıdan kolayca manipüle edilebilmesi gibi nedenlerle ana Gram-negatif prokaryotik model sistemi haline gelmiştir. Dahası, farklı bölgelere kolonize etme yeteneği, genetik olarak da çeşitlilik göstermesi, birçok biyolojik çevrede hem kommensal hem de patojen bakteri olarak davranma yeteneği, bu türü bakteri evrimi ve adaptasyonunun incelenmesi için mükemmel bir aday yapmaktadır (Leimbach ve diğerleri, 2013).

E. coli doğumdan birkaç saat sonra, bebeklerin mide-bağırsak sisteminde kolonize olur. Normalde canlı vücudunda herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadan flora bakterisi olarak kommensal olarak yaşayabilir. Bununla birlikte, bağışıklığı baskılanmış konakçılarda gastrointestinal bariyerleri aşarak enfeksiyonlara yol açabilir (Kaper ve diğerleri, 2004). Ciddi enterik hastalıklara yol açabilen *E. coli* insan sindirim sisteminin sık görülen bir patojendir; bununla birlikte hayvansal gıdalar da da sıklıkla bulunmaktadır (Tenailon ve diğerleri, 2010).

Bazı *E. coli* suşları ekstraintestinal ve intestinal klinik özelliklerle ilgili spesifik virülans özelliklerinin kazanılması ile farklı organizmalarda hayatta kalabilme yeteneği kazanmışlardır (Kaper ve diğerleri, 2004). Günümüzde patojen *E. coli* suşları ishal oluşturan ve ekstraintestinal hastalıklara neden olan *E. coli* patotipleri olarak sınıflandırılmaktadır (Resim 1). Virülans faktörlerine, klinik görünüm ve hastalığın seyrine göre intestinal *E. coli*'ler yedi

önemli patotipte ayrılmaktadır: enteropatojenik (EPEC), enterohemorajik (EHEC), enterotoksijenik (ETEC), enteroinvasiv (EIEC), enteroagregatif (EAEC), diffüz olarak yapışan (DAEC), adherent invaziv (AIEC) ve (Donnenberg, 2013). DEC'ler A, B1 ve D filogenetik gruplarında bulunmaktadır (Smith ve diğerleri, 2007).



Resim 1. A. Farklı *E. coli* suşları arasındaki fenotipik ve filogenetik ilişkiler (Zlatkov, 2019) B. *E. coli* grupları ve ilişki patotipleri Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC), avian patojenik *E. coli* (APEC), üropatojenik *E. coli* (UPEC), neonatal menenjit *E. coli* (NMEC), sepsis ile ilişkili *E. coli* (SEPEC), meme patojenik *E. coli* (MPEC), diyarejenik *E. coli* (DEC), enteropatojen *E. coli* (EPEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroinvasiv *E. coli* (EIEC), enteroajregatif *E. coli* (EAEC), diffüz olarak yapışan *E. coli* (DAEC), adherent invaziv *E. coli* (AIEC).

2.1.1. Kommensal *E. coli*

E. coli suşlarının büyük bir kısmı kommensal olarak adlandırılan nonpatojenik suşlar olduğu bilinmektedir. İnsanlar da dâhil olmak üzere pek çok memelinin gastrointestinal florasında kommensal *E. coli* suşları kolonize olmuştur (Blyton ve diğerleri, 2013). Bu dokularda *E. coli*'nin varlığı sindirim ve enterik patojenlere karşı savunma mekanizmaları ile ilgilidir. *E. coli* tarafından gerçekleştirilen en önemli savunma mekanizması vitamin K üretilmesi ve zararlı patojenlerin kolonizasyonunun engellenmesi yolu ile diğer patojenlerle yapılan yarışmadır (Schierack ve diğerleri, 2009). Bu patotip tarafından neden olunan hastalık yalnızca bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde kolon mukoz tabakasının kolonizasyonu sebebi ile bildirilmiştir (Kaper ve diğerleri, 2004). *E. coli* A ve B1 virülans faktörü bulunmayan insan orijinli en önemli filogenetik gruplardır (Picard ve diğerleri, 1999).

2.1.2. Diyarejenik *E. coli*

Her *E. coli* patotipi, karakteristik patojenik mekanizmalara ve belirli gen kümesi tarafından kodlanan özel bir virülans faktörü profiline sahiptir. Patojenite ile ilişkilendirilen genler, adezyon, invazyon, bağlanma, demir edinimi, hareketlilik ve toksin aktivitesi gibi aktiviteleri kodlayabilir. Dört ana *E. coli* patotipi virülans sınıfı ayırt edebiliriz: kolonizasyon, uyumluluk (rekabet gücü), toksinler ve etki molekülleri; her biri belirli bir işlev ve aktiviteye sahip birkaç özel virülans faktöründen oluşur (Tablo 1). Ayrıca, farklı enterik ve ekstraintestinal *E. coli* patotipleri aynı virülans faktörlerini ve stratejileri paylaşır (Maini, 2013). Son yıllarda, bağırsak ve ekstraintestinal bozukluklarla ilişkilendirilen enterik *E. coli* patotiplerine bağlı birçok virülans faktörü tanımlanmıştır (Gomes ve diğerleri, 2016).

Tablo 1. Enterik *E. coli* patotiplerinin virülans faktör genleri: kolonizasyon, uyumluluk, toksinler ve etki molekülleri (Pakbin ve diğerleri, 2021).

Sınıf	Virülans Faktörü	Aktivite/Fonksiyon	Patotip
Kolonizasyon	<i>bfp</i>	adhezyon	EPEC
	<i>eae</i>	enterositlere yapışma ve düzeltme oluşturma	EPEC, EHEC
	<i>tir</i>	translokasyonlu intimin reseptörü	EPEC, EHEC
	<i>lifA</i>	enterositlere ilk yapışma	EPEC
	<i>csgA</i>	kurli fimbriya	EPEC, EHEC
	<i>fimA</i>	tip I fimbriya	EPEC, EHEC, DAEC
	<i>fimH</i>	tip I fimbriya	EPEC, AIEC
	<i>bcsA</i>	selülöz yapı	EPEC
	<i>eha</i>	biofilm oluşumu	EHEC
	<i>saa</i>	biofilm oluşumu	EHEC
	<i>sab</i>	biofilm oluşumu	EHEC
	<i>toxB</i>	biofilm ve yapışma oluşturma	EHEC
	<i>nleB</i>	biofilm oluşumu	EHEC
	<i>nleE</i>	biofilm oluşumu	EHEC
	<i>nleH</i>	biofilm oluşumu	EHEC
	<i>bleG</i>	biofilm oluşumu	EHEC
	<i>lfp</i>	uzun kutupsal fimbriya, ilk yapışma	EHEC
	CFA/ I	kolonizasyon faktörü	EPEC
	CFA/II	kolonizasyon faktörü	EPEC

	CFA/IV	kolonizasyon faktörü	ETEC
	CS1-6	kolonizasyon (coli yüzey antijeni)	ETEC
	<i>etpA</i>	ilk yapışma	ETEC
	<i>aggR</i>	yapışma ve adezyon	EAEC
	<i>aggA</i>	agregatif adezyon fimbriyası	EAEC
	<i>aafA</i>	agregatif adezyon fimbriyası	EAEC
	<i>agg3A</i>	agregatif adezyon fimbriyası	EAEC
	<i>agg4A</i>	agregatif adezyon fimbriyası	EAEC
	<i>agg5A</i>	agregatif adezyon fimbriyası	EAEC
	<i>aap</i>	Dispersin, EAEC'nin dağılması	EAEC
	<i>afaA-E</i>	Afa/Dr adezinleri, IL-8 salınımı	DAEC
	<i>draA-E</i>	sitoplazma iskeletinin yeniden düzenlenmesi mikrovillusların yok edilmesi, Afa/Dr adezinleri, IL-8 salınımı, MICA'nın ifadesi	DAEC
	<i>daaA-E</i>	sitoplazma iskeletinin yeniden düzenlenmesi, mikrovillusların yok edilmesi, Afa/Dr adezinleri, IL-8 salınımı, MICA'nın ifadesi.	DAEC
	<i>pop</i>	tip I pili adezin	DAEC
Uyumluluk (rekabet gücü)	<i>sdiA</i>	quorum sensing sinyal iletimi	EPEC
	<i>iutA</i>	aerobaktin sentezi	EIEC
	<i>iucB</i>	kompleks sidrofor demir reseptörü	EIEC
	<i>yjaA</i>	polipeptid stres yanıt proteini	AIEC
	<i>fyuA</i>	ferrik yersiniabaktin alımı	AIEC
	<i>kpsMT II</i>	kapsül sentezi	AIEC
Toksinler	<i>stx1</i>	shiga toksini, nükleolinin yüzeyde lokalizasyonu ve sitotoksik etki	EHEC
	<i>stx2</i>	shiga toksini, nükleolinin yüzeyde lokalizasyonu ve sitotoksik etki	EHEC
	<i>estA</i>	ST I toksini, sulu ve sekretuar ishal, kemokin ve sitokin salınımı	ETEC
	<i>estB</i>	ST II toksini, sulu ve sekretuar ishal, kemokin ve sitokin salınımı	ETEC
	LT I	sulu ishal	ETEC
	LT II	sulu ishal	ETEC
	<i>eatA</i>	Serin proteaz otoiletlenleri (SPATE)	ETEC, EIEC
	<i>astA</i>	enteroagregatif ısıya dayanıklı toksin, sekretuar ishal	ETEC,EAEC,DAEC

	ShET1	shigella enterotoksin, 1 sekretuar intestinal aktivite	ETEC
	ShET2	shigella enterotoksin 2, sekretuar intestinal aktivite	ETEC
	<i>pet</i>	SPATE, plazmidle kodlanan toksin, epitelyal hücre ekstrüzyonu induksiyonu, konak hücre içine giriş	EAEC, DAEC
	<i>pic</i>	SPATE, ShET1 ifadesi, epitelyal hücre ekstrüzyonu induksiyonu, mukolitik aktivite,	EIEC, EAEC
	<i>sigA</i>	SPATE, sitotoksin, bağırsak sıvısının birikmesi	EIEC,EAEC, DAEC
	<i>sat</i>	SPATE, salgılanan otoiletken toksin, sıkı bağlantıyı bozma, otomasiyi aracılık etme	EAEC, DAEC
	<i>sepA</i>	shigella ekstrasellüler enterotoksin, sitotoksin, IgA proteaz benzeri homolog	EAEC
	<i>hlyE</i>	alpha hemolizin toksini	EAEC
Etki molekülleri	<i>espA</i>	T3SS'nin taşıyıcı yapıları, <i>E. coli</i> yaygın pili	EPEC, ETEC
	<i>espB</i>	T3SS'nin taşıyıcı yapıları, fagositoz inhibisyonu	EPEC
	<i>espC</i>	T3SS'nin taşıyıcı yapılarının parçalanması	EPEC
	<i>espD</i>	T3SS'nin taşıyıcı yapıları	EPEC
	<i>espF</i>	Mitokondriyal ölüm, sıkı bağlantı bozulması, immün kaçınma, konak hücre ölümü	EPEC, EHEC
	<i>espH</i>	Fagositoz inhibisyonu	EPEC
	<i>espJ</i>	Fagositoz inhibisyonu, biyofilm oluşumu	EPEC, EHEC
	<i>espP</i>	T3SS'nin taşıyıcı yapılarının parçalanması	EPEC, DAEC
	<i>espT</i>	Konak hücre ölümü	EHEC
	MAP	Mitokondriyal membran işlevselliğini bozar, konak hücre ölümü	EPEC
	<i>nleA</i>	İnflamazom aktivasyonu, sıkı bağlantı bozulması, sitokin salınımını inhibe etme	EPEC
	<i>etp</i>	Otoiletken protein	ETEC
	<i>tolC</i>	ST toksinlerinin salınımı	ETEC
	<i>nleF</i>	Konak hücre ölümü, inflamazom aktivasyonu	EPEC, EHEC
	<i>cif</i>	Hücre döngüsü bozulması, apoptoz gecikmesi	EPEC
	<i>ipaA</i>	Tip III etken, sitoskeletonu yeniden düzenleme, hücre ölümü engelleme	EIEC
	<i>ipaB</i>	Tip III etken, adezyon, fagosomdan kaçış, hücre devir hızı	EIEC
	<i>ipaC</i>	Tip III etken, adezyon, aktin polimerizasyonu, fagosomdan kaçış,	EIEC

<i>ipaD</i>	Tip III etken, adezyon, fagosomdan kaçış	EIEC
<i>ipaH</i>	Enflamatuvar yanıtları zayıflatma, invazyon	EIEC, AIEC
<i>ipaJ</i>	Konak hücre trafiği zararını inhibe etme, inflamazomları inhibe etme	EIEC
<i>ipgB1</i>	Sitoskeletonu yeniden düzenleme, ruffle oluşumu	EIEC
<i>ipgD</i>	Sitoskeletonu yeniden düzenleme	EIEC
<i>virA</i>	Sitoskeletonu yeniden düzenleme, hücre ölümü engelleme, otofaji inhibisyonu	EIEC
<i>virB</i>	Virülans faktörü gen sentezi	EIEC
<i>virF</i>	Virülans faktörü gen ifadesi	EIEC
<i>virG</i>	Aktin nükleasyonu	EIEC
<i>ospB</i>	Enflamatuvar yanıtları zayıflatma	EIEC
<i>ospE</i>	Hücresinin ayrılması	EIEC
<i>ospF</i>	Enflamatuvar yanıtları zayıflatma	EIEC
<i>ospG</i>	Enflamatuvar yanıtları zayıflatma	EIEC
<i>ospI</i>	Enflamatuvar yanıtları zayıflatma	EIEC
<i>ospZ</i>	Enflamatuvar yanıtları zayıflatma	EIEC, EIEC
<i>icsB</i>	Otofaji inhibisyonu	EIEC
<i>aaiA-Y</i>	Tip VI salgılama sistemi	EAEC
<i>ibeA</i>	İnvazyon proteini <i>ibeA</i>	AIEC

2.1.2.1. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)

EPEC, ilk kez 1945 yılında İngiltere'de tanımlanan ve çocukların altı ay altındaki yüksek morbidite ve mortalite oranlarıyla karakterize olan ishal hastalıklarının ve salgınların başlıca nedenidir. Gelişmiş ülkelerdeki EPEC oranı son yıllarda azalmıştır. Ancak, gelişmekte olan ülkelerdeki bebekler ve yetişkinler için önemli bir halk sağlığı sorunudur (Ochoa ve diğerleri, 2008). EPEC'nin bazı patogenezi mekanizmaları, tavşan-EPEC, farelerde *Citrobacter rodentium*, EHEC ve *Escherichia albertii* gibi patojenlerle paylaşılan birleştirme ve düzeltilme (A/E) virülans faktörleri gibi ortaktır (Gaytán ve diğerleri, 2016). Özellikle süt ve kıyma gibi gıdalar, EPEC'nin insanlara ve hayvanlara bulaşmasının bir aracıdır ve bağırsak enfeksiyonlarına yol açar (Kaper ve diğerleri, 2004).

Histopatolojik olarak, EPEC, A/E patojenleri arasında yer alır. EPEC'nin temel virülans faktörü kodlayan genleri, sırasıyla 41 açık okuma çerçevesi (ORF) ve patojenik plazmid-LEE ve EPEC adezyon faktörü (EAF) olarak adlandırılan 35,6 kb'lık bir kromozomal patojenisite adası (PAI) üzerinde yer alır (Hernandes ve diğerleri, 2009). LEE gen ifadesi, LEE tarafından kodlanan düzenleyici gen tarafından modüle edilir ve bu genler LEE'nin ilk kısmında yer alır. EPEC'nin diğer bir PAI'si *EspC* adası olarak adlandırılır ve aynı isimle kodlanan bir serin proteaz otoiletken enterotoksin geni kodlar ve bu, EPEC tarafından salınan tek toksindir ve epitelyal hücre nekrozu ile sonuçlanabilir (Ochoa ve diğerleri, 2008). EAF plazmidinin varlık / yokluğuna göre, EPEC, tam virülans genlerine sahip tipik (t-EPEC) ve bundle tip IV pili (*bfp*) için EAF taşıyan operon içermeyen atipik EPEC olmak üzere sınıflandırılır (Serapio-Palacios ve Finlay, 2020). Tipik ve atipik patojenlerdeki en belirgin EPEC virülans faktörleri, her ikisinde de LEE üzerinde yer alır. Bu PAI, *EspA*, *EspB* ve *EspD* (EPEC salınan protein) translokasyon proteinleri, etkileyici proteinler (*Map*, *EspF*, *EspG*, *EspH*, *EspZ*), yakın adezyonda rol alan proteinler ve düzenleyici elementleri içeren tip üç sekresyon sistemi (T3SS) olarak adlandırılan bir yapıdır (Xu ve diğerleri, 2017). Bağırsak mikrobiyomunun yüzey molekülleri, çevredeki oksijen seviyeleri ve hormonlar, LEE aktive edici transkripsiyon sinyalleşmesini düzenler. A/E reaksiyonu, dış zar intimin ile translokasyonlu intimin reseptörü arasındaki etkileşimle başlar ve bunlar sırasıyla *eae* ve *tir* genleri tarafından kodlanır (Zheng ve diğerleri, 2021). Stabil bir bağlanma ve etkileyici enjeksiyonu ile T3SS ifadesinden önce, EPEC konak hücrelerin yüzeyine (ilk bağlanma) pil benzeri yapılar kullanarak yapışır (Platenkamp ve Mellies, 2018). Tip-IV pili (*bfp*) a-EPEC'de ve lenfosit inhibe edici faktör (*lifA/efaI*) t-EPEC'de, yerel mikrokolonilerin oluşumunu takiben ince bağırsakta bulunan enterositlere ilk bağlanmayı sağlar. T3SS, bakteri membranına halka yapıları ile gömülü bir merkezi kanalı olan şırıngayı ve konak hücreye bağlı olan iğnenin üstünde supramoleküler bir yapıyı içeren moleküler nano ölçekte karmaşık bir enjeksiyon makinadır (Pollock, 2019). *EspA*, *espB* ve *espD* proteinleri, T3SS'nin farklı translokasyon yapılarını oluşturur ve bu proteinler *espP* ve *espC* tarafından kesilir (Pinaud ve diğerleri, 2018). Tir'in translokasyonundan sonra, intimin ile etkileşim sonucu güçlü bir bağlanma oluşur. Tir'in translokasyonlu proteini, konak hücresinde tirozin kinaz tarafından fosforile edilir. Tir'in fosforilasyonu, Nck proteiniyi çeker ve nöral Wiskott-Aldrich sendromu proteininin (N-WASP) aktive olmasına, aktinle ilişkili protein (ARP) 2/3'ün uyarılmasına ve aktin polimerizasyon ve yeniden düzenlemeye aracılık etmesine yol açar, bu da pedestal oluşumuna yol açar. Bu sitoplazma düzenlemesi bağışıklık düzenlemesine ve ishale katkıda bulunur. Kalın bir biyofilm oluşumu da EPEC patogenezi için kritik bir rol oynar (Slater ve

diğerleri, 2018). Biyofilm oluşumunun aktive edilmesi, baskılayıcı bölünme inhibitörü (*SdiA*) gen tarafından kodlanan iletişim mekanizması (quorum sensing) tarafından aracılık edilir. Ancak, biyofilm oluşumu için bakterilerin bu karakteristik curli fimbriyaları, tip-I fimbriyaları ve sırasıyla EPEC'de *csgA*, *fimA* ve *bcsA* genleri tarafından kodlanan selüloz yapıları destekleyen yapılar talep etmektedir (Ruano-Gallego ve diğerleri, 2021).

EPEC patogenezindeki bir sonraki adım, LEE ve Nle etkileycilerinin ve proteinlerinin T3SS aracılığıyla konak hücre sine translokasyonudur. Bu etkileycilerden bazıları konak hücre sine çok yönlü işlevlerle etkiler. Bağlanma ve aktin pedestal oluşumuna ek olarak, Tir, EPEC patogenezi sırasında bağışıklık kaçınma mekanizması olarak NF-kB sinyalini inhibe eder (Deborah Chen ve Frankel 2005). Mitokondri ile ilişkili protein (MAP), GTPaz GEF aktivitesini sağlayan Trp-xxx-Glu motifini paylaşır. GEF, Cdc42 faktörünü indükler ve bakteri bağlanma bölgesinde filopodi oluşumuna katkıda bulunur. MAP ayrıca mitokondriyal membran işlevselliğini bozar, konak hücre nin ölümüne katkıda bulunur. Bir diğer belirgin etkileyici NleA (*espI*) ise birçok rolü olan, NLRP3 inflamazomu aktivasyonuna devam ederek, sıkı bağlantı bozulmasına ve konak hücre sine sitokin salgılama inhibisyonuna yol açar (Donnenberg ve diğerleri, 2013). EspF, mitokondriyal ölümü indükleyen, sıkı bağlantı bütünlüğünü bozan ve fagositoz inhibisyonuna katkıda bulunan çok fonksiyonlu bir etkileyicidir, bu da EPEC'nin patogenezi sırasında bağışıklık kaçınmasına katkıda bulunur. EspB, H ve J genleri de fagositozu inhibe etmek için proteinler ifade eder (Hartland ve Leong, 2013). Başka bir çok fonksiyonlu olmayan LEE etkileyicisi de *nleF*'dir, caspase-4'e bağlanarak inflamazomu aktive eder ve hücre sel bağışıklık yanıtını zayıflatır. EspF, *espT*, MAP, *nleF* ve döngü inhibe eden faktör (Cif), hücre döngüsünün ilerlemesini bloke ederek konak hücre ölümünü indükler. Bu etkileycilerin işlevlerinin belirlenmesine rağmen, EPEC ve diğer A/E patojenleri tarafından salgılanan birçok Nle ve *esp* proteininin çok ve tek etkileri henüz karakterize edilmemiştir (Tablo 1) (Croxen ve Finlay , 2010).

Bu patotip toplum ve hastane ortamında en sık rastlanılan ve tüm dünyada çocukları en çok enfekte eden en önemli patotiptir. EPEC'lerin en önemli özelliklerinden birisi bağlanma ve yok etme (A/E) lezyonlarındaki etkileridir. Bu lezyonlar *E. coli*'lerin konak hücre membranına bağlanma sonucunda hücre yüzeyine zarar vermesi ve mikrovillusların yapısının bozulmasına yol açmasına bağlı olarak görülür. İntimin, bir dış membran proteindir ve bakterinin intestinal hücrelere bağlanmasını sağlamaktadır (Ochoa ve diğerleri, 2008).

2.1.2.2. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC)

EHEC, insanlarda ishale, kanlı ishale yol açan hemorajik kolit (HC) ve hemolitik üremik sendrom (HUS) neden olan ve gelişmiş ülkelerde birçok gıda kaynaklı salgına karıştığı bilinen bir patojendir. Bu patojenin ana rezervuarı sığırların bağırsak yoludur. EHEC ilk kez 1982 yılında kanlı ishal ve gastrointestinal bozuklukları olan bir hastadan izole edilmiş ve dünya çapında bir pandemiye neden olmuştur (Welinder-Olsson ve Kaijser, 2005). Gıda kaynaklı A/E patojenleri olarak, EHEC genellikle kontamine gıda ve su yoluyla insanlara bulaşır (van Hoek ve diğerleri, 2019). EHEC serotiplerinin salgınları genellikle dışkı-yolla, kişiden kişiye bulaşma, hayvan teması ve az pişirilmiş et ürünleri, pastörize edilmemiş elma suyu, çiğ süt veya çiğ sebzelerin (örneğin marul ve filiz fasulye) çapraz bulaşma yoluyla tüketilmesi gibi yollarla meydana gelir. Son zamanlarda, çiğ un da EHEC salgınlarının bir kaynağı olarak belirlenmiştir (Pakbin ve diğerleri, 2021).

EHEC salgınlarında önemli bir rol oynayan en önemli serotip hala Japonya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da ciddi bir sağlık endişesi olarak kabul edilen O157: H7'dir. EHEC serotipi O104: H4, 2011 yılında Almanya'da filiz tüketimiyle gastrointestinal enfeksiyon ve HUS salgınından ilk kez izole edilmiştir. Oradan dünya çapında yayılmıştır. Ancak bu serotipin genom dizilemesi, hem EHEC hem de enteroagregatif *E. coli* (EAEC) patotiplerine ait olduğunu ortaya çıkarmış ve yeni bir ortaya çıkan *E. coli* patotipi olan enteroagregatif hemorajik *E. coli* (EAHEC) olarak adlandırılmıştır (van Hoek ve diğerleri, 2019).

Shiga benzeri toksin (SLT), aynı zamanda verotoksin olarak da adlandırılan ve *stx* genleri tarafından kodlanan, EHEC serotiplerinde ana virülans faktörüdür. Shiga benzeri toksin üreten *E. coli* grubuna aittir ve EHEC enfeksiyonları sırasında oluşan belirli hastalık semptomlarına (örneğin HUS ve böbrek yetmezliği) yol açan patolojik bulgulardan sorumludur (Pakbin ve diğerleri, 2020). SLT, *stx1* ve *stx2* olmak üzere iki alt gruptan ve farklı alt tiplerden oluşur. *Stx2a*, *stx2c* ve *stx2d* pozitif EHEC izolatları, diğer *stx*-alt grupları ve alt tiplere göre HC ve HUS ile güçlü bir ilişki gösterir (Ferdous ve diğerleri, 2016). Shiga toksini AB5 toksinidir. Alt ünite A, bir disülfid bağının indirgenmesiyle A1 ve A2 fragmentlara bölünür ve A1 fragmentı sitoplazmaya salınır. A1 fragmentı, 60S ribozomun 28S rRNAsının 4324. konumunu enzimatik olarak deadenilasyon yaparak protein sentezini engelleyerek hücre ölümüne neden olan sitotoksik etkisini gerçekleştirir (Melton-Celsa, 2014). Ayrıca, ribotoksik stresi tetiklemenin yanı sıra, *stx*'in A1 fragmentı sitokin üretimini uyarır ve

apoptotik hücre yollarını aktive eder. Protein çevirisinin inhibe edilmesi ve bağışıklık yanıtı düzenlemesi, shiga toksininin A alt biriminin patogenezi için başlıca sorumludur. A alt birimi fragmentları hedef hücreye girmek ve sitotoksik etki yapmak için homopentamerik B alt birimlerine kovalent olmayan bağ yapmaları gerekmektedir. Shiga toksinlerinin B alt birimleri, insanlarda böbrek epitelyum hücreleri ve intestinal Paneth hücreleri yüzeyinde bulunan özel reseptör molekülü olan glisfingolipit globotriosilseramidin (Gb3 veya CD77) karbonhidrat kısmına özgül olarak bağlanır. Reseptör bağlanması ve Gb3-stx kompleksi oluşumu sonrasında bağlı toksinler kümeleşir, membran içeriği alır ve hücrenin plazma membranında endositoz çukurları oluşturur (Mauro ve Koudelka, 2011). Bu içe kıvrılmalar plazma membranından ayrılarak hücre içi toksin taşıyıcıları oluşturur. Endositoz taşıyıcılarının hücre içi taşınması, stx'in Gb3-stx kompleksinden çıkarak sitotoksik etkisini gerçekleştirmeden önce erken endozomdan Golgi ve endoplazmik retikulum'a hareket etmesiyle gerçekleştirilir. *Stx* toksinleri, nötrofil transmigrasyonu, mikropinositoz ve Gb3-bağımsız transsitoz yoluyla hedef olmayan (Gb3-negatif) hücelere taşınır. Gb3-negatif hücrelerde stx toksinleri yalnızca bir inflamatuvar yanıtı tetikler ve protein sentezini engellemez (Smith ve diğerleri, 2014). EHEC serotipleri tarafından stx toksinlerinin salınması için belirli bir sekresyon sistemi eksiktir. Shiga toksinleri, bakteriyofaj aracılı lizis yoluyla salınırken, antibiyotik tedavisi veya DNA hasarı gibi belirli tetikleyiciler, litik faz genlerinin transkripsiyonunu baskılar. Bu, STEC bakteriyel hücresinin lizisine ve shiga toksinlerinin ekstraselüler çevreye salınmasına katkıda bulunur (Melton-Celsa ve diğerleri, 2011).

EHEC serotipleri, LEE patojenlik adası tarafından kodlanan yapışma ve bağlanma virülans faktörlerini içeren STEC suşlarının bir alt grubudur. Yapışma proteinleri, EHEC'in cansız ve biyolojik yüzeyler üzerinde kolonizasyon ve biyofilm oluşumuyla ilişkilidir (Schwidder ve diğerleri, 2019). EHEC'in bağırsak epitelyal hücelere yapışmasının ilk adımı başlangıçta bağlanmadır. Son çalışmalar, patojen ile konak hücre arasındaki başlangıç temasının ve bağlanmanın, patojenin uzun kutuplu fimbriyaları (*lfp* geni) ve konak hücredeki fibronektin, kolajen IV ve laminin gibi hücre dışı membran proteinleri arasındaki etkileşimlerle sağlandığını göstermiştir (Huang ve diğerleri, 2021). Bu etkileşimler sıkı bir bağlantı oluşturur ve A/E etkisi, konak hücre membranındaki reseptör proteinleri (Tir - T3SS ile enjekte edilir, nüklein ve β 1-integrinler) ve intimin (*eae* geni tarafından kodlanır) arasındaki etkileşimler yoluyla meydana gelir. EHEC'in A/E patojenik mekanizması EPEC ile farklıdır. Pedestal oluşumu ve aktin yeniden düzenlenmesi Nck bağımsız bir mekanizma aracılığıyla gerçekleşir. Hücre aktin sitoskeleton yeniden düzenlemesi, Tir-intimin kompleksi,

bir insülin reseptörü alt tipinin homolog proteini tarafından *EspF* proteini ile bağlandığında indüklenir (Barnett Foster, 2013). *EspF* tarafından indüklenen etkileşimler aracılığıyla N-WASP ve ARP2/3, aktin montajı için aktive edilir. Curli (*csg* genleri tarafından kodlanır), yapışma ve kolonizasyon faktörleri olarak tanınır. *E. coli* ortak pilusu (ECP) ve Hemorajik *E. coli* ortak pilusu (HCP), konak hücre yüzeyi ile etkileşime girerek kolonizasyon, mikrokoloniler ve biyofilm oluşumunu sağlar (Barnett Foster, 2013). Tip 1, F9 ve *E. coli* laminin bağlayan fimbriyum gibi bazı proteinler de konak hücreye yapışmada rol oynar. EHEC tarafından salınan *Eha*, *Saa* ve *Sab* gibi otoiletler, biyofilm oluşumuna ve yapışmaya katkıda bulunur (García-Heredia ve diğerleri, 2016). Ayrıca, pO157 plazmidten kaynaklanan *ToxB* adı verilen bir gen, O157: H7 serotipi ve diğer EHEC suşlarında yapışmada rol alabilir (Karpman ve Ståhl, 2014). EHEC serotipleri, EPEC'ten iki kat daha fazla etkileyiciyi T3SS aracılığıyla konak hücrelerine salgılar. A/E, kolonizasyon ve biyofilm oluşumu tarafından indüklenen konak inflamatuvar yanıtları, Gİ bozukluklarının semptomlarına katkıda bulunur. NleF, bir non-LEE, konak inflamatuvar yanıtını engelleyerek ve hücre ölümünü inhibe ederek önemli bir virülans faktörü olarak kabul edilir (Tablo 1) (Warr ve diğerleri, 2021).

2.1.2.3. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)

E. coli patotipi olan ETEC, insanın ince bağırsağında enterotoksin salın ve gelişmekte olan ülkelerde seyahat edenlerin ve çocukların ishalinin başlıca nedenidir. ETEC'nin enfeksiyon ve mortalite oranları en yüksek olan grup iki yaşın altındaki çocuklardır. Dünya Sağlık Örgütü raporlarına göre, ETEC yılda 157.000'den fazla insan isheline neden olan ve ölüme yol açan vakalara sebep olmaktadır (Buuck ve diğerleri, 2016). ETEC enfeksiyonunun ana belirtileri hafiften şiddetliye ishal ve karın ağrısıdır. Kusma, bulantı, ateş ve baş ağrısı gibi diğer semptomlar nadiren gözlenmiştir (Fleckenstein ve diğerleri, 2019). ETEC aynı zamanda sığır, kümes hayvanları ve yavru domuzlarda akut ishal hastalığına yol açan hayvan patojenleridir (Bin ve diğerleri, 2018). Genel olarak, ETEC'nin insanlarda ishale neden olan iki ana virülans faktörü kolonizasyon faktörleri ve enterotoksinlerdir (Crofts ve diğerleri, 2018).

ETEC öncelikle yüzey yapıları aracılığıyla ince bağırsak epitelyal hücrelere yapışır ve ardından enterotoksinleri salgılar. Kolonizasyon, ETEC'nin patogeneiz mekanizmasının ilk adımında temel bir rol oynar. ETEC, çeşitli plazmid kodlu kolonizasyon faktörü (CF) genleri

ile ince bağırsak epitelyal hücrelere bağlanır; bunlar, fimbrial, fimbrial olmayan ve fibriller yapıları kodlar (Bhakat ve diğerleri, 2020). Birçok CF arasında, CFA/I, CFA/II ve CFA/IV, ETEC'nin kolonizasyonunu aracıl原因 başlıca faktörlerdir ve klinik örneklerden izole edilen ETEC'lerde yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Diğer protein yapıları arasında *E. coli* yüzey antijenleri (CS) olarak CS1-CS6, tip 1 fimbriyum (*fimH*), *E. coli* ortak pilusları (*ecpA*) (Hazen ve diğerleri, 2017), *Etp* protein grubu gibi otoiletçiler ve SAPTE ailesinin bir üyesi olan *EatA* yer alır. Flajellalar, ETEC'nin ilk bağlanması, adezyonu ve konak bağırsak epitelyal hücrelerine kolonizasyonu için gereklidir (Rasko ve diğerleri, 2019). ETEC tarafından salgılanan EtpA, N-asetilgalaktozamin içeren bir glikoproteindir. N-asetilgalaktozamin aynı zamanda A kan grubu glikanlarının üzerinde şeker bileşeni olarak da bulunur. Bu nedenle, ETEC A kan grubuna sahip insanlarda daha şiddetli ishal hastalığına neden olur (Kumar ve diğerleri, 2018).

ETEC'nin en belirgin ve etkili virülans faktörü, enterotoksinlerin salgılanmasıdır. ETEC tarafından salgılanan iki tür enterotoksin, ısıya dayanıklı toksinler (ST'ler) ve ısıya duyarlı toksinler (LT'ler), insanlarda ve hayvanlarda salgılamaya katkıda bulunarak bağırsakta net su, tuz ve sıvı kaybına neden olarak sekreteruar ishale yol açar. ETEC suşları LT'ler, ST'ler veya her iki toksinin bir kombinasyonunu ifade edebilir (Mirhoseini ve diğerleri, 2018). Enterotoksinleri kodlayan genler hem plazmidlerde hem de kromozomda (profajlar) yer alır ve bu genler farklı *E. coli* patotipleri arasında aktarılabilmektedir. 72 amino asitlik bir protein (toksin prekürsörü olarak) sentezlenir ve bunun 19-18 amino asitlik bir bölümü, ısıya dayanıklı toksinin aktif formu olarak salınır. Bu toksinler STI ve STII olarak adlandırılır ve sırasıyla *estA* ve *estB* genleri tarafından kodlanır ve plazmidlerde bulunur (Turunen ve diğerleri, 2020). Bu toksinlerin yapısı, guanilat siklaz C reseptörüne bağlanarak intrasellüler siklik guanozin monofosfat (cGMP) seviyesini artırarak memeli peptitlerinin biyolojik işlevini taklit eder. cGMP konsantrasyonundaki artış, kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) kanalını fosforile eden protein kinazı etkinleştirir. Aktive olan CFTR kanalı iyon değişimini ve sodyum emilimini inhibe eder, bu da bağırsak lümenine su ve tuzun salınmasına ve dolayısıyla net sıvı kaybına katkıda bulunur, böylece sulu ve sekreteruar ishale yol açar (Wang ve diğerleri, 2019).

2.1.2.4. Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC)

Şiddetli mukozal ve kanlı ishal, karın krampları ve ateş, farklı *Shigella* türleri ve invaziv gıda kaynaklı patojenler olan EIEC tarafından neden olan şigelozun tipik klinik özellikleridir (Kaper ve diğerleri, 2004). *Shigella* ilk olarak *Bacillus dysenteriae* olarak biliniyordu ve Kiyoshi Shiga tarafından 1897 yılında Japonya'da keşfedildi. Bir salgın sırasında 91.000'den fazla vaka ve %20 ölümle sonuçlanmıştı (Lagerqvist ve diğerleri, 2017). Elli yıl sonra, EIEC keşfedildi ve *Shigella* ile gözlenen aynı genetik, patojenik ve biyokimyasal özelliklere sahip olduğu belirlendi. Bu nedenle, aynı patovar içinde kategorize edilebilirler. Bununla birlikte, *Shigella* türlerinin klinik önemi konusunda önemli bir ayırım hala korunmaktadır (Escobar-Paramo ve diğerleri, 2003). EIEC ve *Shigella*, laktoz fermantasyonu yapamaz, hareketsizdir ve lizin dekarboksilaz negatiftir. Bu özellikler, *Shigella* türlerini ve EIEC'yi diğer bakterilerden ayırt etmek için kullanılır (van den Beld ve diğerleri, 2019). EIEC, yapışma veya flagella faktörleri olmayan bir zorunlu hücre içi patojendir ve diğer *E. coli* patovarylarından farklılık gösterir (Van den Beld ve Reubsaet, 2012). EIEC suşları genellikle sulu ishale neden olur ve invaziv iltihabi kolit oluşturabilir (Kaper ve diğerleri, 2004).

EIEC/*Shigella* enfeksiyonu, patojenin kolon epitel hücrelerine nüfuz etmesiyle başlar, mikrokot hücrelerinden geçerek transsitosis mekanizmasıyla altta yatan submukozaya ulaşır (Hendriks ve diğerleri, 2020). İltihaplanma tarafından neden olan sıkı bağlantıların bozulması ve hasarı, EIEC'nin altta yatan submukozaya erişimini kolaylaştırır (Pasqua ve diğerleri, 2017). EIEC makrofajlar tarafından alınır, burada endositoz vezikülünü lizer ve fagosomdan kaçır. Ölen makrofajlardan salındıktan sonra, EIEC kolonositlerin bazolateral yüzeyine invaze olur, hücre içinde hayatta kalır ve çoğalır, sitoplazma içinde yönlü olarak hareket eder ve bitişik epitel hücresine uzanır (Kaper ve diğerleri, 2004). Bu patojenin virülansı, T3SS kompleksi, şaperonlar, transkripsiyonel düzenleyiciler, translokasyon maddeleri ve 25'ten fazla etkileyici protein de dahil olmak üzere 220 kb'lık plazmid tarafından kodlanan virülans faktörlerine dayanır (Donnenberg, 2013). Enfeksiyon için şiddetle gereklidir ve makrofajların apoptozu ve hücre hayatta kalması için T3SS iğnesi, virülans plazmidinin *mxi-spa* lokusunda kodlanmıştır (Mainil, 2013). Enfeksiyondan önce, EIEC'nin epitelyal hücrelere yapışması, *IpaBCD* kompleksinin ve *IpaB* geninin kodladığı proteinlerin sırasıyla $\alpha 1\beta 5$ integrin ve hialuronan CD44 reseptörlerine bağlanmasıyla gerçekleşir. Zar kabartma ve epitelyal hücre sitoplazma yeniden düzenlemesi, patojen alımını sağlamak için *IpaA*, *IpaC*, *IpgB1*, *IpgD* ve *virA* tarafından aracılık edilir (Cowley ve diğerleri, 2018). *IpaH7.8*, *IpaB*, *IpaD* ve *IpaC*

ayrıca fagosomdan kaçışta rol oynamıştır (Belotserkovsky ve Sansonetti , 2018). *VirG*, N-WASP edinimi sağlayarak aktin polimerizasyonunu kolaylaştırır ve bakteri yüzeyinde tek kutuplu aktin kuyruğu oluşumunu sağlayarak aktini nükleer. *IpaC* ayrıca SRC ailesi protein kinazlarını aktive ederek ARP2/3 kompleksini bakteri temas noktasında çekirdeklemeye ve bakteri girişi için kaba oluşturmaya neden olur. *IpgB1*, RhoG'un taklitçisi olarak da RAC1'in aktivasyonunu sağlayarak kabartma oluşumunu teşvik eder. Aktin mikrofilamentleri ve polimerizasyonu, patojenin konak hücre sitoplazmasında yönlendirilmiş hareket için gereken itici kuvvetleri sağlar (Pasqua ve diğerleri, 2017). EIEC, *OspE* ve *IpaB* gibi protein etkileyicileri kullanarak enfeksiyonun erken aşamalarında konak hücre bütünlüğünü ve hayatta kalmasını sağlayarak bağırsak epitelyal hücre ayrılmasını ve dönüşümünü engeller. *VirA*, *IpaA* ve *IpgD* gibi bazı etkileyiciler, mikrotübüller ve aktini destabilize ederek konak hücrelerde ölümü engelleyerek kolonizasyonu teşvik eder (Donnenberg, 2013).

2.1.2.5. Enteroagregatif *E. coli* (EAEC)

EAEC, özellikle çocuklarda akut ve kalıcı ishal ile gelişme geriliğiyle ilişkilendirilen gıda kaynaklı patojen olarak kabul edilmektedir (Kaper ve diğerleri, 2004). Ayrıca, EAEC gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki seyahat edenlerin ishalinin ikinci başlıca nedeni olarak ETEC'ten sonra gelmekte ve HIV/AIDS hastalarında enterik enfeksiyonların ana nedenlerinden biridir (Donnenberg, 2013). EAEC enfeksiyonunun diğer semptomları arasında kusma, bulantı, iştahsızlık ve tenesmus yer almaktadır (Croxen ve diğerleri, 2013). EAEC/STEC (serotip O104: H4) hibrit bir suşu, 2011 yılında Almanya'da büyük bir salgına neden oldu ve 4300'den fazla ishal vakası ve 50 ölümlerle sonuçlandı (Rogawski ve diğerleri, 2017). Birçok çalışma, EAEC'nin etkili bağırsak iltihabı ve enterik kolonizasyon potansiyeline sahip olduğunu ve diğer patojenik bakteri virülans stratejilerinin etkilerini yoğunlaştırabileceğini göstermiştir (Clements ve diğerleri, 2012). EAEC genellikle kan veya mukusla bazen eşlik eden sulu ishale neden olur. EAEC, ince ve kalın bağırsakların mukozasına yerleşerek kolonda hafiften şiddetliye kadar iltihaplanmaya katkıda bulunur (Jenkins, 2018). Geleneksel olarak, EAEC, Hep-2 hücrelerine "üst üste yığılmış tuğla" deseninde yapışma ile karakterize edilir. EAEC'nin heterojenitesi nedeniyle, bu patojenin patogenezi mekanizmaları oldukça karmaşıktır. EAEC patogenezinde üç adım yer alır: bağlılık birleşik tüyler aracılığıyla bağırsak epitelyumuna bağlanma, biyofilm oluşturma ve toksin

salgılama, mukozal iltihap ve sitotoksik hasarlar (Croxen ve diğerleri, 2010).

EAEC'nin virülans faktörleri, pAA adlı bir virülans plazmid ailesi ve kromozom üzerinde dağılmış patojenite adalarında kodlanmaktadır (Kaper ve diğerleri, 2004). *AggR*, EAEC'nin ana virülans faktörü düzenleyicisidir. Bakteriyel bir transkripsiyonel düzenleyici ailesi olan *AraC*'nin bir üyesidir ve pAA plazmidinde bulunur ve plazmid taşıyan ve kromozomal virülans faktörlerinin ifadesini kontrol eder (Guerrieri ve diğerleri, 2019). Epidemiyolojik çalışmalar, *AggR* geninin varlığı ile ishal hastalıkları ve EAEC suşları ile enfekte hastalarda fekal sitokin konsantrasyonları arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir (Yasir ve diğerleri, 2019). Bu nedenle, EAEC suşları, *AggR* tarafından düzenlenen tipik ve *AggR* regulonunu taşımayan atipik EAEC olmak üzere ikiye ayrılır. EAEC patogenezinin ilk aşaması, bağırsak mukozal hücrelere tutunma ve yapışmadır. EAEC'nin bir araya getirici yapışması, AAF genleri tarafından kodlanan bir araya getirici yapışma tüyleri (AAF) ile ilişkilidir (Dias ve diğerleri, 2020). Dahası, EAEC'nin epitelyal hücrelere ilk bağlanması AAF'ler tarafından kolaylaştırılır. AAF'lerin beş çeşidi tanımlanmış olup *aggA*, *aafA*, *agg3A*, *agg4A* ve *agg5A* tarafından sırasıyla kodlanmışlardır ve hepsi pAA üzerinde bulunur. AAF genleri yalnızca EAEC patotiplerinde saptanmıştır (Jenkins, 2018). AAF'ler aracılığıyla yapılan yapışma ve flagellin, sitokin tepkilerini de uyarır AAF'lerin izoelektrik noktası diğer adezinlere göre oldukça yüksektir. Bağırsak boyunca, AAF'ler yüksek pozitif yük taşır (Alvestegui ve diğerleri, 2019). Gram negatif bakterilerin yüzeyindeki lipopolisakkaridin negatif yükü göz önüne alındığında, AAF'lerin hücre yüzeyinden uzanan bir uzantısı, lipopolisakkaridler tarafından verilen negatif yükü maskeleyen *aap* geni tarafından kodlanan bir proteinin salınımı ile sağlanır ve bu protein aşırı birikimi dengeleyerek EAEC'nin mukozal epitelyal hücreler arasında yayılmasını sağlar (Moraes ve diğerleri, 2020). Biyofilm oluşumu, EAEC'nin başka bir patojenik mekanizması olup, patojenik olmayan *E. coli* tarafından aracılık edilen biyofilm oluşumundan tamamen farklıdır. Kromozomda tanımlanan bir patojenite adasında bulunan ve *AggR* tarafından aktive edilen *aaiA-Y* genleri tarafından kodlanan bir tip-VI salgılama sistemi (T6SS), EAEC'de biyofilm oluşumunu sağlar. Ancak, *aaiA* ve *aaiC* genleri tipik EAEC suşlarında daha yaygın olarak bulunur (Jenkins, 2018).

EAEC patogenezinin son aşaması, toksin salınımıdır ve bu, büyümüş kript açıklıkları, mikrovillus vezikülasyonu ve epitelyal hücre ekstrüzyonu gibi birçok etkiye neden olur (Croxen ve diğerleri, 2013). Bu varsayımsal toksinler, *pet*, *pic*, *sigA*, *sepA*, *sat* ve *astA* genleri tarafından sırasıyla kodlanan plazmid tarafından kodlanan bir toksin, intestinal kolonizasyona

katılan bir protein, Shigella ekstraselüler enterotoksin, salgılanan bir ototransporter toksin ve enteroagregatif ısıya dayanıklı toksin içerir ve pAA'da yer alır (Jenkins, 2018). EAEC biyofilm tabakalarını kalın bir mukus tabakası saran ve bakteriler, mukolitik aktiviteye sahip SPATE pic toksininin salınımıyla bu tabakayı geçer (Jenkins, 2018). Shigella ekstraselüler enterotoksinleri (ShET1), sitotoksin, enterotoksin ve IgA proteaz benzeri homologlar olup bağırsakta dögüsel GMP (cGMP) ve cAMP aracılı sekresyonu indükler. Bu toksin aynı zamanda EAEC/STEC melez suşlarında da bulunmuştur (Croxen ve diğerleri, 2013).

2.1.2.6. Diffuzaderent *E. coli* (DAEC)

DAEC, Hep-2 ve HeLa hücrelerinde yaygın bir desene sahip olarak tanımlanan heterojen bir *E. coli* patotipidir (Croxen ve diğerleri, 2013). DAEC, 1,5 ile 5 yaş arasındaki çocuklarda ishale, yetişkinlerde idrar yolu enfeksiyonuna ve gebelik komplikasyonlarına neden olabilir; aynı zamanda yetişkinlerde ve çocuklarda bağırsak kommensal mikroflorasının bir parçasıdır (Le Bouguéneç ve diğerleri, 2006). DAEC tarafından oluşturulan sulu ishal, küçük çocuklarda daha kalıcı hale gelebilir. Yetişkinler, Crohn hastalığı, çölyak ve iltihabi bağırsak hastalıkları da dahil olmak üzere bazı kronik iltihabi bağırsak hastalıklarına katkıda bulunan DAEC suşlarının asemptomatik taşıyıcısı olabilir (Mansan-Almeida ve diğerleri, 2013). DAEC suşlarının filogenetik grup B2'ye ait olduğu gösterilmiştir ve bu filogenetik grup, insan kommensal *E. coli* suşları arasında baskın bir konumdadır (Croxen ve diğerleri, 2010; Croxen ve diğerleri, 2013). Bu suşun dışkılarından ve duodenal kültürlerden izole edilmesine rağmen, yetişkin hastalardan hiçbirinde ishal gelişmedi (Croxen ve diğerleri, 2013). DAEC patogenezinin başlangıcı, patojenin belirli konak hücrelere bağlanmasıyla başlar. DAEC suşlarının idrar yolu ve bağırsak epitelyal hücrelere bağlanması, sırasıyla mikronütrisyon ve peristalsis tarafından temizlenmeye direnmelerine izin verir. Bağlanma aynı zamanda DAEC'in konak hücreyle etkileşime girmesine, toksinleri salıvermesine ve iletebilmesine ve konak hücrelerinde sinyalleşme olaylarını tetiklemesine olanak tanır. DAEC, Afa/Dr adezinleri tarafından aracılık edilen non-klasik desenlerle konak hücrelere bağlanır ve yapışır (Walczuk ve diğerleri, 2019).

DAEC suşlarının patogenezi genellikle Afa/Dr adezinleri aracılığıyla gerçekleşse de, bu patotip tarafından bazı SPATE toksinleri salgılanır (Javadi ve diğerleri, 2020). Afa/Dr DAEC suşları, iki ana sınıf SPATE toksini salıverir: sınıf I, sitotoksik aktiviteye sahip olanlar, bunlar

arasında *sat*, *pet*, *EspP* ve *sigA* genleri tarafından kodlanan sırasıyla salgılanan bir otojen-iletken toksin, plazmid-kodlanan bir toksin, bir ekstraselüler serin proteaz ve *sigA* toksinleri yer alır; sınıf II ise sitotoksik olmayanlar olup *pic* geni tarafından kodlanan bağırsak kolonizasyonunda rol alan bir proteini içerir (Croxen ve diğerleri, 2013) Ayrıca, *pap*, *fim* ve *astA* genleri tarafından kodlanan, DAEC suşlarında yakın zamanda tespit edilen diğer virülans faktörleri arasında tip-I piluslar, pilus adezinleri ve enteroagregatif ısıya dayanıklı toksinler de bulunmaktadır (Tablo 1) (Martinez-Medina, 2021).

2.1.2.7. Adherent Invaziv *Escherichia coli* (AIEC)

AIEC, özellikle iltihaplı bağırsak hastalığı (İBH) ve Crohn's hastalığı (CD) gibi idiyopatik iltihabi hastalıkların en önemli nedenlerinden birisidir ve temel olarak insan ince bağırsağını etkiler (Palmela ve diğerleri, 2018). Bununla birlikte, bu patotip aynı zamanda sağlıklı bireylerin bağırsak mikrobiyotasının bir parçası olarak bulunabilir ve herhangi bir hastalığa neden olmaz (Shaler ve diğerleri, 2019). İdiyopatik İBH'nin tek belirgin nedeni olarak tanımlanmamıştır (Caruso ve diğerleri, 2020). AIEC'nin yanı sıra, *Campylobacter* türleri, *Mycobacterium paratuberculosis* ve *Sitomegalovirus* gibi diğer bağırsak patojenlerinin de İBH ve CD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Caruso ve diğerleri, 2020). AIEC patotipi, bağırsak epitelyal hücre tabakasına yapışabilen ve makrofajlar ve epitelyal hücreler içinde çoğalan bir enterik patojendir. AIEC suşlarında diğer *E. coli* patotiplerinde bulunan özel virülans faktörleri belirlenmemiştir (Lee ve diğerleri, 2019). AIEC patogenezinde üç aşama vardır: yapışma, invazyon ve epitelyal konak hücrelerde çoğalma. İlk olarak, AIEC ince bağırsakta epitelyal konak hücrelere CAECAM6 aracılığıyla yapışma gerektirir. AIEC suşları, epitelyal konak hücrelere yapıştıktan sonra dış membran vezikülleri, dış membran proteinleri ve uzun kutupsal fimbriyalar gibi birkaç virülans faktörü ifade eder ve makrofajlar içinde enfekte olmak ve çoğalmak için kullanır (Lee ve diğerleri, 2019).

Bağırsak mukozası ile patojenik etkileşimde rol oynayan birkaç virülans faktörü ve ilgili kodlama genleri belirlenmiştir. CD, İBH ve ülseratif kolit hastalarından izole edilen AIEC suşlarında yapışma, invazyon ve sağkalım ile ilgili genleri kodlayan virülans faktörleri ekspresyon düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Abdelhalim ve diğerleri, 2020). Bağırsak hastalığı olan hastalardan izole edilen AIEC suşlarında bulunan virülans faktörleri arasında tip-1 fimbriyenin yapışkan altünitesi, polipeptit stres yanıt proteini, invazyon proteini

ibeA, invazyon plazmid antijeni ve demir yersiniabaktin alımı ve kapsül sentezi ile ilişkili virülans faktörleri yer almaktadır ve bunlar sırasıyla *fimH*, *yjaA*, *ibeA*, *ipaH*, *fyuA* ve *kpsMT II* genleri tarafından kodlanır (Beata ve diğerleri, 2021). AIEC suşları, İBH ve CD hastalarının tedavisi için yeni bir terapötik hedef olarak düşünülmüştür (Chervy ve diğerleri, 2020). Ancak, patogenezinin bazı yönleri bilinmemektedir ve özellikle virülans faktörü kodlama genlerini belirlemek için daha fazla genomik araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Tablo 1) (Palmela ve diğerleri, 2018).

İshal ve ishal olmayan köpeklerden izole edilen aEPEC'in fenotipik ve genotipik belirteçleri, insan hastalığından elde edilen izolatlarda bulunanlarla benzer olduğu bildirilmiştir (de Almeida ve diğerleri, 2012). Benzer şekilde, bazı köpek aEPEC suşlarının insan patojen suşlarında yaygın olarak bulunan virülans genlerini paylaştığı gösterilmiştir. Köpeklerden ve çocuklardan izole edilen aynı serotipteki suşlar, virülans genlerini paylaşmakta ve filogenetik olarak yakın olmaktadır, bu da potansiyel bir zoonotik riski işaret etmektedir (Arais ve diğerleri, 2018). Genel olarak, yapılan çalışmalar, köpeklerdeki enteropatojen *E. coli* izolatlarının insanlara bulaşma potansiyeline sahip olabileceğini ve potansiyel riskleri tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu önermektedir.

2.1.3. *E. coli* Filotiplendirmesi

E. coli türünde genetik alt yapının varlığı 1980'lerin başlarında ortaya çıkarıldı. Sonraki çalışmalar, türde yaygın bir alt yapının varlığını doğrulamıştır. *E. coli*'deki bu alt yapının anlaşılması ile birlikte, farklı filo gruplarına ait suşların izolasyon kaynaklarına göre rastgele dağılmadığı fark edildi. Özellikle, ekstraintestinal enfeksiyona neden olan suşların, filo grupları B2 veya D üyeleri olma olasılığı, A veya B1'den daha yüksekti (Picard ve diğerleri, 1999; Johnson ve Stell, 2000). Bu gözlemlerin klinik önemi, izolatların bir filo grubuna ataması için basit bir yöntemin değerli olacağını düşündürdü. Bu, *chuA* ve *yjaA* genlerini tespit etmek için bir polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) testi ve daha sonra bir lipaz esteraz geni olarak karakterize edilen DNA parçası TspE4.C2'yi tespit etmek için bir PZR testi geliştirilmesine ve doğrulanmasına yol açtı (Gordon ve diğerleri, 2008).

Bu üç geninin varlığına göre, bir *E. coli* suşu A, B1, B2 veya D filo grubundan birine atanabilirdi (Clermont ve diğerleri, 2000). Bu tripleks PZR filo grup ataması, bir *E. coli*

izolatını filo grubuna atamak için basit ve ucuz bir yöntem olarak yaygın bir şekilde kullanılmış ve çeşitli filo gruplarına ait suşların fenotipik ve genotipik özelliklerinde, ekolojik nişlerinde, yaşam tarih özelliklerinde ve hastalık oluşturma yeteneklerinde farklı olduklarını gösteren daha fazla kanıt sağlamıştır (Tenaillon ve diğerleri, 2010).

Çeşitli konakçılardan ve yaşam alanlarından elde edilen *E. coli* türleri için 2000 yılından bu yana çok lokuslu dizi tipi (MLST) verilerinin hızla genişleyen bir kaynağı oldu. MLST verileri, filo grup ataması için tripleks PZR yönteminin kullanılabilirliğini daha etkili bir şekilde doğrulamayı mümkün kıldı (Gordon ve diğerleri, 2008). Bu doğrulama çalışması, filo grup atamalarının %80-85'inin doğru olduğunu gösterdi. Bununla birlikte, belirli tripleks PZR genotipleri (A0, D1, D2) ile ilişkili suşların önemli bir kısmının yanlış atandığını da gösterdi.

Geniş MLST veri setleri ve daha az ölçüde artan genom verileri, *E. coli*'deki alt yapının boyutu hakkındaki anlayışımızı iyileştirmiştir. Önceden küçük bir dizi ataması olan filo grup E'nin varlığı artık iyi tanınmaktadır ve en iyi bilinen üyesi O157:H7'dir (Tenaillon ve diğerleri, 2010). Ayrıca, filo grup B2'nin kardeş grubunu oluşturan filo grup F de artık belgelenmiştir (Clermont ve diğerleri, 2011). Daha yakın zamanda, filo grup B1'e yakın ancak farklı bir grup olan filo grup C de bildirilmiştir (Clermont ve diğerleri, 2011). genetik olarak farklı ancak fenotipik olarak ayırt edilemeyen *Escherichia*'nın birkaç yeni türünü bildirmiştir (Walk ve diğerleri, 2009),

E. coli izolatlarının filogruplarının belirlenebilmesi için geliştirilen, PZR tabanlı bir yöntem olan dörtlü PZR yöntemi ile *E. coli* izolatları sekiz filogrupta (A, B1, B2, C, D, E, F ve clade I) sınıflandırmışlardır. Bu yöntem, dört *E. coli* genini hedef almıştır: a. *E. coli* K-12'nin genomunda tanımlanmış varsayımsal proteini kodlayan *yjaA* geni, b. *E. coli* O157:H7'de dış zar geni olan *chuA* geni, c. Lipaz esteraz'ı kodlayan bir gen içinde yer alan bir DNA sekansı olan *TspE4.C2* (Doumith ve diğerleri, 2012). d. Son saptanana gen olan *arpA* geni. Bu genin dahil edilmesinin iki sebebi vardır: İlk olarak, DNA kalitesi için dahili bir kontrol görevi görür, çünkü eklenmesiyle tüm *E. coli* ve clade I suşlarının dörtlü PZR kullanılarak en az bir PZR ürünü vermesi beklenir. İkincisi, *arpA*'nın dahil edilmesi filo grubu F'ye ait suşları mümkün kılar, daha önce D suşları (*chuA* +, *yjaA* -, *TspE4.C2*) olarak yanlış tanımlanmış, çünkü *arpA* B2 ve F filogruplarına ait suşlar dışında tüm *E. coli* suşlarında bulunur (Clermont ve diğerleri, 2004).

E. coli izolatlarının filotiplendirilmeleri elde edilen izolatın kaynağı ve patojenitesi hakkında da fikir verdiği için oldukça faydalıdır. Son olarak, dört gen (*arpA*, *chuA*, *yjaA* ve

TspE4.C2) incelenerek *E. coli* izolatlarını sekiz filogrupta (A, B1, B2, C, D, E, F ve clade I) sınıflandırmıştır (Clermont ve diğerleri, 2013). Buna filotiplendirmeye göre: A filogrubu kuşlar, sürüngenler, balıklar ve bazı memeliler tarafından taşınır. B1 filogrubu genellikle çevreseldir. Bu tip *E. coli*'nin insan sağlığı açısından riski düşüktür. B2 filogrubu ağırlıklı olarak insanlar tarafından taşınır. Bu tip *E. coli*'nin insan sağlığı üzerindeki riski yüksektir. Haklarında çok az şey bilinen filogrup C ve filogrup F'nin, ekstraintestinal patojenik suşları içeren Clade 1 suşlarının aksine, insan sağlığı üzerindeki riskinin düşük olduğu bilinmektedir. D filogrubu, insanlar ve omnivorlar (domuzlar); E filogrubu, otçullar ve sığırlarda ilişkilidir. Bu iki filotip insan sağlığı üzerinde orta düzeyde risklidir. Yapılan filogenetik analizler virülant ekstraintestinal *E. coli* suşlarının büyük oranda B2 grubuna, kommensal suşların çoğunlukla A veya grup B1 filogrurları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Mastitise neden olan *E. coli* büyük bir tür içi çeşitliliğe sahiptir ve farklı filogenetik gruplarda (çoğunlukla A, B1, B2 veya D) sınıflandırılmıştır. Sığır mastitisine neden olan *E. coli* suşlarının çoğunluğunun filogrup A ve B1'e ait olduğu bildirilmiştir (Bag ve diğerleri, 2021). Klinik mastitise neden olan C, E ve F gruplarının sıklığına (Tomazi ve diğerleri, 2018) ve köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatlarının filogrurlarına ilişkin bilgiler azdır (Vega-Manriquez ve diğerleri, 2020).

E. coli filotiplendirme için yeni genişletilmiş dördümlü PZR yöntemi orijinal üçlü yöntemden daha karmaşık olsa da, doğal yaşam alanlarında *E. coli*'nin genetik yapısını şekillendiren ev sahibi ve çevresel faktörler hakkında daha iyi bir anlayış sağlayacağı bildirilmektedir (Clermont ve diğerleri, 2013).

2.1.4. *E. coli*'ye Karşı Antimikrobiyal Direnç ve Hayvan Sağlığı Üzerindeki Etkisi

Patojen bakteriler arasında çoklu ilaç direnci, antibiyotik tedavisinin değerini tehlikeye atan, veteriner hekimleri zor duruma sokan bir sorundur. Keşfinden bu yana, birçok antibiyotik hayvanlardaki bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde etkili olmuştur. *E. coli*, bir bakteri olarak, toplulukta antibiyotik direnç genlerinin rezervuarlarından biridir (Arbab ve diğerleri, 2022).

Antibiyotik direnci, bir mikrobik enfeksiyona karşı konakçının ilaca duyarlı tepkisini ifade eder ve bu, giderek artan bir sorun haline gelmiştir. Mikroplarda antibiyotik direnci, özellikle üçüncü dünya ülkelerinde olmak üzere tüm dünyada büyük bir sağlık sorunudur (Afzal, 2017). Antibiyotiklerin aşırı kullanımı, bazı bakteri popülasyonlarında direnç veya

hatta çoklu direnç özelliklerinin ortaya çıkmasından sorumlu olan bir seçici baskı oluşturur (Chen ve Jiang, 2014). Antimikrobiyal dirence yol açan bu durum, dünya genelinde sağlık sistemlerinin enfeksiyonlarla mücadelesini zorlaştırır, maliyetleri önemli ölçüde arttırır ve kaynaklara büyük bir yük getirir (French, 2005). Bu nedenle, AMR ortaya çıkması, hastalar, doktorlar, sağlık sistemleri ve ilaç üreticileri üzerindeki etkisi nedeniyle ciddi bir endişe haline gelmiştir (McGowan Jr, 2001).

2.1.4.1. Antibiyotik Direncinin Mekanizmaları *E. coli*'de Antibiyotik Direnci

Antibiyotik direncinin dört temel mekanizması olabilir: Bunlar, ilacın alınımını kısıtlama, ilacın hedefini değiştirme, ilacı etkisiz hale getirme ve ilacın aktif olarak hücre dışına atılmasıdır. Bu mekanizmalar bakterinin kromozomunda bulunabilir ve tüm tür üyelerinde doğal olarak mevcut olabilir (içsel direnç), veya diğer bakterilerden, genellikle bir plazmit (edinilmiş) yoluyla elde edilebilir. İçsel direnç genleri sürekli olarak ifade edilebilir (genellikle düşük seviyelerde) veya antimikrobiyal ilaçların varlığı tarafından uyarılabilir. Gram-negatif bakteriler, bu dört mekanizmayı geniş ölçüde kullanır ve direnç elemanlarının yatay transferini yapabilirler (Arbab ve diğerleri, 2022).

E. coli, yaygın bir bakteri türüdür ve geniş bir çeşitlilikte suş içerir, aynı zamanda yüksek derecede patojenik olabilir (Tareen ve diğerleri, 2022). Antibiyotik direnci, bazı bakteri alt-popülasyonlarının bir veya daha fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği bir fenomendir ve birden çok antibiyotiğe dirençli patojenlere çoklu antibiyotik dirençli (MDR) veya süper bakteri adı verilir (Chowdhary ve diğerleri, 2014). Dirençli bakteriyel suşların evrimi, mikroorganizmalar kendilerini hatalı bir şekilde replike ettiğinde veya direnç özellikleri yatay gen transfer mekanizmaları aracılığıyla suşlar arasında değiştirildiğinde gerçekleşen doğal bir olaydır. Antibiyotiklere bakteriyel direnç, hayvan sağlığı için giderek daha fazla bir endişe haline gelmektedir. Şu anda kullanılan antibiyotik ajanlar, süper dirençli suşlar nedeniyle birçok bakteriyel enfeksiyonu sonlandırmada başarısız olmaktadır (Arbab ve diğerleri, 2021d). Antimikrobiyal ilaçların kullanımı ve yanlış kullanımı, dirençli suşların ortaya çıkmasını hızlandırır. Zayıf enfeksiyon kontrol uygulamaları, yetersiz hijyen koşulları ve uygun olmayan gıda işleme, AMR'nin daha da yayılmasını teşvik eder (WHO, 2004). Dahası, AMR senaryosu sadece insan patojenlerle sınırlı değildir, veteriner patojenlerde de yaygındır.

Bildirildiğine göre, geniş spektrumlu β -laktamaz ve metallo- β -laktamaz üreten suşlar hayvanlarda yaygındır ve çevrelerinde bulunmaktadır (Singh ve diğerleri, 2012).

Sıkça, antibiyotikler insanları tedavi etmek için kullanıldığı gibi, gıda üreten hayvanlar için de kullanılır. Antimikrobiyal ilaçların yanlış kullanımının pek çok bakterinin direnç geliştirmesine ve zararlı bakteriyel enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaya neden olabileceği bilinmektedir (Arbab ve diğerleri, 2022).

E. coli enfeksiyonlarında AMR dünya çapında bildirilmiştir. *E. coli*'nin β -laktamazlara karşı direnç mekanizmaları sık sık β -laktam ilaçlara karşı dirençli bakterilere yol açar (Arbab ve diğerleri, 2021c). Başlangıçta, *E. coli*'de kromozomik olarak kodlanan β -laktamazlar ve genin ampC'si bulunur (ampisiline dirençli olarak adlandırılır). Antimikrobiyal ilaçlara karşı artan direnç, dünya çapında en ciddi endişelerden biridir. Birçok gelişmekte olan ülke için antibiyotiklerin etkinliği, çoğu patojenik bakteri ve neredeyse tüm fırsatçı enfeksiyonların bakteriler tarafından neden olduğu AMR sorunu ile bir problem halindedir.

E. coli izolatlarında belirli gen tiplerine dayalı yaygın direnç tipi hayvanlar arasında yaygındır. *bla*TEM geni ampisiline, geniş spektrumlu ilaç tipi tetrasiklin ve streptomisine ve trimetoprim tipine direnç verirken, bu ana listedeki genlere ek olarak aynı direnç fenotipini kodlayan birkaç ek gen tespit edilmiştir: *bla*OXA-1 ampisilin, *sul2* sülfametoksazol ve trimetoprim (Szmolka ve diğerleri, 2012). Birkaç hayvan çalışması, bakteriyel enfeksiyona karşı ilaç direnci konusunda birçok örnek göstermiştir ve bu suşlar arasında ilk tanımlananlardan biri yaban hayatındaki suşlardır (Costa ve diğerleri, 2006). CTX-M, TEM ve SHV, geniş spektrumlu β -laktamaz sınıflarının varlığını göstermektedir (Jacoby ve Munoz-Price, 2005).

2.1.4.2. *E. coli*'nin Hayvan Sağlığı Üzerindeki Zararlı Etkileri

E. coli, genellikle sağlıklı bağırsaklarda bulunan bakterilerin en önemli parçasıdır. Bazı *E. coli* suşları zararsızdır, ancak bazı suşları insanlarda, kuşlarda ve hayvanlarda zararlı etkilere neden olabilir (Kaper ve diğerleri, 2004). Sığır ve geviş getiren hayvanların en önemli rezervuarı *E. coli* O157:H7'dir ve yapılan çalışmalar, insan salgını *E. coli*'nin yaklaşık %75'inin besin üreten sığırlardan kaynaklandığını göstermiştir (Callaway ve diğerleri, 2009). *E. coli*'nin diğer bulaş yolları arasında koyunlar (Gencay, 2014), keçiler (Swift ve diğerleri, 2017), ve bazı kuş türleri (Wetzel ve LeJeune, 2006) bulunmaktadır.

Çoğu *E. coli* izolatu, insanların ve hayvanların bağırsaklarında zararsız bir şekilde bulunur ve normal mikrofloranın bir parçası olarak anahtar besinlerin üretilmesine yardımcı olarak konakçılara fayda sağlar, örneğin K vitamini (Suvarna ve diğerleri, 1998). Bazı *E. coli* izolatları, bağırsak dışı bölgelerde yerleşebilir ve bağırsak dışı hastalığa neden olabilir (Sharma ve diğerleri, 2007).

E. coli'de antimikrobiyal ilaç direnci, hem insanlarda hem de hayvanlarda meydana gelmesi nedeniyle son derece önemli bir konudur. Hayvanlarda *E. coli*'de MDR, tedavisi zor enfeksiyonlara yol açabilir, ancak daha da önemlisi, çoğu antimikrobiyal ajan ailesine karşı direnç belirleyicilerinin ana ve paylaşılan bir rezervuarını oluşturur. Bakteriyel patojenlerin antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç geliştirmesi, hayvan sağlığı için büyük bir sorun haline gelmiştir. Antimikrobiyal ilaç direnci, konakçının yaşamı boyunca *E. coli* suşunun uyum sağlayan bağırsak yolunu tekrar tekrar zorlamaktadır. Ulusal, bölgesel ve küresel düzeyde AMR ve MDR patojenler için izleme, biyovigilans ve yanıt ve hayvan sağlığı risklerini kontrol etmeye yönelik önleme stratejileri, hayvan sağlığını korumak için yardımcı olabilir (Arbab ve diğerleri, 2022).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

Çalışma kapsamında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında bulunan mikrosantrifüj (Hettich Micro 200R, Almanya), mikroskop (Olympus), kuru blok ısıtıcı (Allsheng MK 200-1, Çin), vorteks (Velp Scientifica, İtalya), mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye), hassas terazi (Shimadzu, Japonya), biyogüvenlik kabini (Nüve, Türkiye), pH metre (Hanna, Çin), otoklav (Nüve, Türkiye), etüv (Nüve, Türkiye), buzdolabı (Samsung, Japonya), derin dondurucu (Samsung, Japonya), distile su cihazı (Nüve, Türkiye), nanodrop (Maestro, ABD), termal döngüleme cihazı (Boeco, USA), görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat Infinity VX2, Almanya), elektroforez tankı (VWR, USA), BD Phoenix sistemi (Becton-Dickinson, ABD) kullanıldı.

3.1.2. Hayvan Materyali

E. coli izolasyonu için gerekli olan rektal sıvı örnekleri 2023 yılı Ocak-Haziran ayları arasında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na kliniklerden getirilen materyallerden ve ayrıca özel bir klinikten sağlandı. Çalışmaya dahil edilen köpekler hepsi barınakta veya evde beslenen köpeklerdi. Birçoğu genetik olarak saf değildi ve karışık cinsler olarak kabul edildiler ve tüm köpekler yavru köpekler olup yaşları 1-6 ay arasında değişiyordu. Son iki hafta içerisinde antibiyotik tedavisi uygulanmamış, ishal semptomları gösteren 40 ve kontrol grubu olarak da ishal görülmeyen 40 olmak üzere toplamda 80 köpek çalışmaya dâhil edildi. Çalışma esnasında her köpeğin tıbbi geçmişi sorgulandı ve kayıt altına alındı. Ayrıca hasta sahiplerine evcil hayvanlarının çalışmaya dâhil edilmesine izin verdiklerini ifade eden bir bilgilendirme formu imzalatılarak izinleri alındı.

Dışkı örnekleri veteriner hekim tarafından sıvap kullanılarak doğrudan rektumdan alındı. Bunun için eküvyonlar anal sfinkterden yaklaşık bir cm içeri sokularak rotasyon hareketi yaptırıldı. Eküvyona gözle görülebilir fekal örnek alındığından emin olunduktan sonra, nem kaybını önlemek için hemen yarı katı taşıma besiyerine (Carry-Blair medium, Micropoint Diagnostics, USA) yerleştirildi. Örnek üzerine hayvanın kimlik bilgileri, örnekleme tarihi, vs. bilgileri kaydedildi. Ekim yapılmaya kadar örnekler buzdolabında (4-8°C) saklandı. Ekimlerin en kısa sürede (en fazla 72 saat) yapılması sağlandı.

Çalışma, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 18.05.2023 tarih ve 64583101/2023/76 sayılı onayı ile gerçekleştirildi.

3.1.3. Referans Suşlar

Moleküler çalışmalarda pozitif kontrol olarak *E. coli* ATCC 35150 (EHEC; *stx1*, *stx2*, *eaeA*), ATCC 35401 (ETEC; *lt*, *st*), ATCC 43893 (EIEC; *ial*) negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu; antibiyotik duyarlılık testinde ise kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

3.1.4. Besiyerleri

Toplanan örneklerden *E. coli* izolasyon ve identifikasyon amacı ile Eosin-Methylene Blue Agar (Merc, Almanya), MacConkey Agar (Merc, Almanya), izole edilen suşların pasajı için kanlı agar (Merc, Almanya), nutrient agar (Oxoid, İngiltere), nutrient buyyon (Merc, Almanya), izolatların saklanması için ise %20 gliserinli Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, İngiltere) kullanıldı.

3.1.4.1. Kanlı Agar (Merck 1.10886)

Besiyeri 40 g olacak şekilde tartıldı ve bir litre saf suda mikrodalga fırın yardımı ile eritildi. Karışımın pH'sı $7,2\pm 0,2$ olacak şekilde ayarlandı ve 121°C'de 15 dakika

otoklavlanarak sterilize edildi. 45-50°C'ye kadar soğutularak oranı %7 olacak steril insan kanı ilave edilerek petrilere döküldü.

3.1.4.2. Eosin Methylene Blue Agar (EMB) (Merck 1.01347)

Besiyeri 36 g olacak şekilde tartıldı ve bir litre saf suda mikrodalga fırın yardımı ile eritildi. Karışımın pH'sı $7,2\pm 0,2$ olacak şekilde ayarlandı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. 45-50°C'ye kadar soğutularak petrilere döküldü.

3.1.4.3. MacConkey Agar (Merck, 1.05465)

Besiyeri 50 g olacak şekilde tartıldı ve bir litre saf suda mikrodalga fırın yardımı ile eritildi. Karışımın pH'sı $7,2\pm 0,2$ olacak şekilde ayarlandı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. 45-50°C'ye kadar soğutularak petrilere döküldü.

3.1.4.4. Nutrient Agar (Oxoid, CM003)

Besiyeri 28 g olacak şekilde tartıldı ve bir litre saf suda mikrodalga fırın yardımı ile eritildi. Karışımın pH'sı $7,2\pm 0,2$ olacak şekilde ayarlandı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. 45-50°C'ye kadar soğutularak petrilere döküldü.

3.1.4.5. Nutrient Broth (Merck 1.05443)

Besiyeri 8 g tartıldıktan sonra 1 litre distile suda eritilerek pH'sı $7,0\pm 0,2$ olacak şekilde ayarlandı. Tüplere 5'er ml olacak şekilde dağıtılıp otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

3.1.4.6. Brain Hearth Infusion Broth (Oxoid-CM1135) (%20 gliserinli)

Besiyeri 3,7 g tartıldıktan sonra üzerine 80 ml distile su ve 20 ml gliserin ilave edilerek mikrodalga fırında agar eritildi. pH'sı 7,2±0,2 olacak şekilde ayarlanarak besiyeri ependorf tüplere yaklaşık bir ml olacak şekilde dağıtıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilerek kullanılmaya kadar buzdolabında (2-8°C) saklandı.

3.1.5. Ayıraç ve Boyalar

3.1.5.1. Gram Boyama Seti (Merck-111885)

İzolatların Gram boyanma morfolojilerinin belirlenebilmesi amacı kullanılan set ticari olarak temin edildi ve oda ısısında tutuldu.

3.1.5.2. Oksidaz Ayıracı (Oxoid, BR 64)

İzolatların oksidaz aktivitelerinin belirlenebilmesi amacı oksidaz test kiti kullanıldı ve kit buzdolabında (2-8°C) saklandı.

3.1.5.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) (% 3)

İzolatların katalaz aktivitelerini belirlemek için ticari olarak temin edildi.

3.1.6. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Laboratuvarda izole edilen bakterilerin in vitro hızlı identifikasyonlarında ve antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan ticari sistemlerden birisi olan 'BD Phoenix Otomatik Mikrobiyoloji Sistemi' BD Phoenix cihazı ve panellerden oluşmaktadır. Sistem bakteri

tanımlamada, bakteri üremesinin kontrolü için oksidasyon-redüksiyon indikatörü ile birlikte türbidometrik yöntemi kullanmaktadır (BD Phoenix, 2023).

E. coli izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri BD Phoenix 100 otomatize mikrobiyoloji sistemi yardımı ile NMIC/ID 400 Gram-negatif identifikasyon kartı kullanılarak gerçekleştirildi. NMIC/ID 400 paneli on antimikrobiyal aileye ait 19 antibiyotiği (Aminoglikozid: amikasin (AN), gentamisin (GM), netilmisin (NET); Karbapenem: ertapenem (ETP), imipenem (IMP), meropenem (MEM); Cephem: sefuroksim (CXM), seftazidim (CAZ), seftriakson (CRO), sefepim (FEP); Monobaktam: aztreonam (ATM); Penisilin: ampisilin (AMP), piperasilin (PIP); β Laktam: amoksisilin klavulanat (AXC), piperasilin tazobaktam (TZP); Lipopeptid: kolistin (COL); Folat: trimetoprim sülfametoksazol (SXT); Kinolon: siprofloksasin (CIP); Tetrasiklin: tigesiklin (TGC)) değerlendirmektedir.

3.1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

3.1.7.1. Kullanılan Solüsyon ve Boyalar

3.1.7.1.1. 10x Tris Borik Asit EDTA Buffer (TBE) (Stok Solüsyonu)

Tris Base [tris (hydroxymethyl)aminomethane]	108 g
Borik Asit.....	55 g
EDTA.....	7,5 g

Hazırlanan toz 800 ml distile suda eritildikten sonra toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı. pH 8,0'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dk otoklav edildi. Solüsyon oda ısısında muhafaza edildi.

3.1.7.1.2. 0,5x TBE (Kullanma Solüsyonu)

10X TBE.....	50 ml
Distile su.....	950 ml

Hazırlanan kullanma solüsyonu, agaroz hazırlamada ve elektroforez tankı içerisinde kullanıldı.

3.1.7.1.3. Yükleme Tamponu (Loading Buffer) (6X) (ThermoFisher R0611)

Agaroz jele örnek yüklemek amacı ile karışım toplam 6 µl (1 µl yükleme tamponu 5 µl ampikon) olacak şekilde kullanıldı. Ticari olarak temin ederek buzdolabında saklandı.

3.1.7.1.4. 5x FIREPol® Master Mix (12,5 mM MgCl₂)

PCR için gerekli tüm reaktifleri içeren önceden karıştırılmış, kullanıma hazır bir çözeltilidir. Reaktif bileşimi: FIREPol® DNA polimerazı, 5x Reaksiyon Tamponu B (0,4 M Tris-HCl, 0,1 M (NH₄)₂SO₄, %0,1 ağırlık/volume Tween-20), 12,5 mM MgCl₂ (1x PCR çözeltilisi – 2,5 mM MgCl₂), 1 mM dNTP (1x PCR çözeltilisi – 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP ve 200 µM dTTP).

3.1.7.1.5. Primerler

İshale neden olan *E. coli* patotiplerinin belirlenebilmesi amacı ile *stx1*, *stx2*, *eaeA* (EHEC) (Paton ve Paton 1998); *lt* ve *st* (ETEC) (Stacy-Phipps ve diğerleri 1995); *eaeA* ve *bfp* (EPEC) (Stacy-Phipps ve diğerleri 1995); *iaI* (EIEC) (Lopez ve diğerleri, 2003) hedef genleri incelendi.

E. coli izolatlarının filogrup dağılımı ise *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*, *arpA*, (Clermont ve diğerleri, 2013) genleri hedef alınarak multipleks PZR yöntemi kullanılarak belirlendi. Yine filogrup belirlenirken grup C ve grup E (Lescat ve diğerleri, 2013) belirlenebilmesinde *trpA* (Clermont ve diğerleri, 2008) ve *arpA* genleri hedef alınmaktadır. Filotiplendirme çalışmalarında toplamda yedi kodlayıcı hedef gen kullanılarak *E. coli* sekiz filogrupta (A, B1, B2, C, D, E, F, clade I) sınıflandırmaktadır (Clermont ve diğerleri, 2013).

Çalışmada kullanılan tüm primerler Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan primerler.

	Primer	Hedef Gen	Dizi (5'-3')	Amplikon büyüklüğü (bp)	T _m
	EHEC	<i>stx1</i>	CTGGATTTAATGTCGCATAGTG AGAACGCCCACTGAGATCATC	150	58,0 61,0
	EHEC	<i>stx2</i>	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	63,0 60,0
	ETEC	<i>lt</i>	GGCGACAGATTATACCGTG CGGTCTCTATATTCCCTGTT	450	60,0 56,0
	ETEC	<i>st</i>	ATTTTTCTTTCTGTATTGTCTT CACCCGGTACAAGCAGGATT	190	51,0 60,0
	EPEC	<i>eae</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	63,0 63,0
	EPEC	<i>bfp</i>	GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT GGAATCAGACGCAGACTGGTA GT	300	61,0 65,0
	EIEC	<i>ial</i>	GGTATGATGATGATGAGTCCA GGAGGCCAACAATTATTTCC	650	57,0 56,0
Dörtlü PZR	<i>chuA.1b</i> <i>chuA.2</i>	<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288	60,5 60,5
Dörtlü PZR	<i>yjaA.1b</i> <i>yjaA.2b</i>	<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTGAGGAG AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211	58,4 58,4
Dörtlü PZR	<i>TspE4C2.1b</i> <i>TspE4C2.2b</i>	<i>TspE4.C2</i>	CACTATTCGTAAGGTCATCC AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC	152	56,4 62,5
Dörtlü PZR	<i>AceK F</i> <i>ArpA1 R</i>	<i>arpA</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC TCTCCCCATACCGTACGCTA	400	60,5 60,5
Grup E	<i>ArpAgpE F</i> <i>ArpAgpE R</i>	<i>arpA</i>	GATTCCATCTTGTCAAATATGCC GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	301	60,1 58,4
Grup C	<i>trpAgpC.1</i> <i>trpAgpC.2</i>	<i>trpA</i>	AGTTTTATGCCAGTGCGAG TCTGCGCCGGTCACGCCCC	219	58,4 68,1
İnternal Kontrol	<i>trpBA.F</i> <i>trpBA.R</i>	<i>trpA</i>	CGGCGATAAAGACATCTTCAC GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	489	59,4 68,7

3.1.7.1.6. Agaroz Jel

Yüz ml 0,5X TBE buffer içerisinde iki gr agaroz tartılarak karıştırıldı ve mikrodalga fırında 3 dk kaynatıldı. Karışım 45-50°C'ye kadar soğutularak üzerine 6 µl Safe View (ABM, Canada) DNA boyası ilave edildi. Karışım elektroforez tablasına tarakları özenle yerleştirildikten sonra döküldü. Jelin katılaşması için 30 dakika beklendi. Süre sonunda taraklar jele zarar dikkatli bir şekilde çıkartıldı.

3.1.7.1.7. Elektroforez

Jel elektroforez tablasında bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Tankının içerisine 0,5x TBE tampon solüsyonu jelin üstüne gelecek kadar ilave edildi. Polimeraz zincir reaksiyonları sonrasında elde edilen amplifikasyon ürünlerinden 6 µl alınarak, 1 µl 6X loading dye boyası ile karıştırılarak ampikonların jele yükleme işlemi gerçekleştirildi. Elektroforez işlemi 100 voltta 45 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.1.7.1.8. Görüntüleme

Jeldeki örnekler bilgisayarlı UV transillüminatör kutusu içine yerleştirilerek görüntülendi. Görüntüleme işleminden sonra ampikon uzunlukları Tablo 2'de bildirildiği şekilde değerlendirildi. Amplifiye edilen ürün beklenen boyutta bir bant oluşturduğunda (Tablo 2), incelenen geni taşıdığı varsayıldı.

3.1.7.1.9. Marker

Oluşan bantların büyüklerini görüntüleyebilmek için 100 bp'lik Fermentas® (USA) marka 1000 bp arasında işaretli DNA ladder kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteri İzolasyon ve İdentifikasyonu

E. coli izolasyonu için izolasyonu için diferansiyel ve selektif agarlardan olan EMB ve MacConkey agar kullanıldı. Aseptik koşullarda alınan rektal sıvı örneklerinin EMB agara ekimleri yapıldı. Aerobik koşullarda 37°C'de 18-24 saat boyunca inkübasyonun ardından, EMB agar üzerinde yeşilimsi metal parlak renkli beş koloni seçildi ve MacConkey agara pasajlandı. Aerobik koşullarda 37°C'de 18-24 saat boyunca inkübasyonun ardından laktozu fermente eden pembe kolonilerden virülans genlerin saptama ihtimalini arttırmak için her petriden en az üç koloni almaya özen gösterildi. Koloniler saflaştırma amacı ile kanlı agara pasajlandı. Ardından Gram boyama ve standart biyokimyasal testler (oksidaz, katalaz, indol) testleri yapıldı. Gram negatif çomak morfolojisinde olan, bir gün içerisinde laktozu fermente eden, oksidaz negatif, katalaz ve indol testleri pozitif izolatlar *E. coli* şüpheli olarak kabul edildi (Koneman ve diğerleri, 1997). İzolatlar bakteriyel tanımlama, antibiyotik duyarlılık testleri ve moleküler testler yapılncaya kadar -20°C'de %15 gliserol içeren BHIB içerisinde saklandı.

İzolatların bakteriyel tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri BD Phoenix 100 otomatize mikrobiyoloji sistemi kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi

E. coli izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri BD Phoenix 100 otomatize mikrobiyoloji sistemi yardımı ile NMIC/ID 400 Gram-negatif identifikasyon kartı kullanılarak gerçekleştirildi. Antibiyotik duyarlılık testinde kalite kontrol suşu olarak da *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi kriterlerine göre değerlendirildi (EUCAST, 2022).

NMIC/ID 400 panelleri kullanılarak test aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

Kanlı agar besiyerinde inkübe edilen saf kolonilerden tek düşen kolonilerden birisi alınarak kanlı agara pasajlandı.

En fazla 24 saatlik kültürden ID Broth'a (Katalog No: 246001) 0,5-0,6 arası Mc Farland bulanıklığa yetecek şekilde bakteri alınarak süspansiyonun bulanıklık ayarı Phoneix Spec cihazı ile yapıldı ve broth vorteks ile karıştırılarak homojenize edildi.

Daha sonra oda ısısına getirilen AST indikatör solüsyonu AST broth tüpü (8 ml) içine, bir damla olacak şekilde, tüpün kenarlarına değmemesine dikkat edilerek eklendi. Tüpün kapağı kapatıldıktan sonra tüp hafifçe çalkalanarak solüsyon karıştırıldı.

ID Broth tüp içindeki homojen bakteri süspansiyonundan otomatik pipet ve steril ucu yardımıyla 25 µl alınıp AST broth tüpü içine eklendi. Tüpün kapağı kapatıldı, AST tüpü birkaç kez ters-düz edilerek hafifçe çalkalanarak karıştırıldı.

Kullanılacak paneller ambalajından çıkarıldı, identifikasyon ve antimikrobiyal duyarlılık testi için hazırlanan bakteri süspansiyonları panel inokülasyon istasyonu üzerine yerleştirildi.

ID tüp ve AST tüpü içindeki bakteri süspansiyonu, panelin sırasıyla ID ve AST tarafındaki tarafındaki kuyucuklara dikkatlice boşaltıldı. Tüplerin boşaltılmış olduğu delikler, plastik bir kapak kullanılarak kapatıldı.

Paneller en geç 30 dakika içerisinde cihaza yerleştirildi ve bu süre esnasında paneller panel taşıyıcısı üzerinde vertikal pozisyonda tutuldu.

Ana ekran açılarak kayıt tuşuna basıldı. Panelin barkodu barkod okuyucusuna okutulurken, örneğin kayıt numarası klavye ve barkod okuyucusuyla kaydedildi. Sonuçlar 18-24 saatlik inkübasyondan sonra cihazın çalışma menüsünden değerlendirildi.

Çoklu antibiyotik direnci, üç veya daha fazla antibiyotik sınıfında en az bir antibiyotiğe direnç olarak (Magiorakos ve diğerleri, 2012) değerlendirildi.

3.2.3. DNA İzolasyonu, Miktar Tayinleri ve Saflık Kontrolleri

DNA ekstraksiyonu sonikasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (Maniatis ve Sambrook, 1989). Bunun için, *E. coli* stok kültürlerinden EMB Agara pasajlandı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Bir koloni bakteri kültüründen alınarak 3 ml Nutrient Broth'a ekim yapıldı 37°C'de 18-24 saat inkübasyonun ardından tüpler üç dk 12000 rpmde santrifüj edildi süpernatant atılarak tortu 1 ml steril deiyonize su ile sulandırıldı (~10⁸/ml). Süspansiyon

vortekslendi, 40 Hz'de 7 dakika sonikatörde (IsoLab, Türkiye) tutularak bakteri hücre duvarının parçalanarak DNA'sı açığa çıkarılmış oldu. Süspansiyon 5 dk 12000 rpm de santrifüj edilerek, üst sıvı her PZR reaksiyonunda 3 µl template DNA olarak kullanıldı.

Ekstraksiyonu yapılan genomik DNA'lar miktar tayinleri ve saflık kontrolleri için nanodrop cihazı ile 260 nm ve 280 nm'deki absorbanları hesaplandı. OD260/OD280 oranının 1,6-2,0 arasında olması DNA'nın saf olduğunu gösterdi. OD260/OD280 oranı Bu aralıktan aşağıda olması RNA kontaminasyonu ve yukarıda olması ise protein kontaminasyonu olduğunu göstermektedir (Turner ve ark, 2004).

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İzolatların çalışma materyali olarak kullanılabilmesi için öncelikle *E. coli* olup olmadıkları moleküler olarak internal kontrol olarak spesifik primerler (*trpA*) kullanılarak gerçekleştirilen PZR ile doğrulandı. Hem fenotipik hem de genotipik olarak *E. coli* oldukları doğrulanan izolatlar çalışma materyali olarak kullanıldı. Patotiplendirme amacı ile öncelikle virülans gen profilleri ve sonrasında filotiplendirme amacı ile hedef genler PZR ile incelendi.

Tüm PZR reaksiyonlarında mastermiks 25 µl toplam hacimde, 5x master miks enzimi tampon çözeltisi için son konsantrasyon 1x, 10 pmol/µl konsantrasyonda her bir primer için için son konsantrasyon 0,4 pmol, DNA son konsantrasyon 50 ng/µl olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler, konsantrasyonları ve kullanılan miktarları Tablo 3'de belirtilmiştir.

Tablo 3. Mastermiks hazırlanma oranları.

Malzeme (Konsantrasyon)	İstenen Son Konsantrasyon	1 örnek (µl)
Buffer (5x)	1 X	5
Primer-F (10 pmol)	0,4 pmol	1
Primer-R (10 pmol)	0,4 pmol	1
DNA	50 ng/µl	3
dH ₂ O	Son miktara tamamlanır	15

Mastermikslar hazırlandıktan sonra PZR tüpleri, örnek adedi kadar numaralandırıldı ve her örnek için 22 µl master mikslar konuldu. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 3'er µl ilave edildi ve tüplerin ağızları sıkıca kapatıldıktan sonra termal döngüleme cihazlarına yüklendi ve cihaz programlandı. DNA amplifikasyonu için cihaz 95°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben; 30 siklus 95°C'de 30 sn denatürasyon, 55°C (*stx1*, *stx2*, *eaeA*, *bfp*, *lt*, *st*, *ial*) ve 56°C (*chuA*, *yjaA*, *TspE4C2*, *ArpA* *trpA*) 30 sn bağlanma, 72°C 60 sn uzama ve 72 °C'de 10 dk son uzama ile gerçekleştirildi.

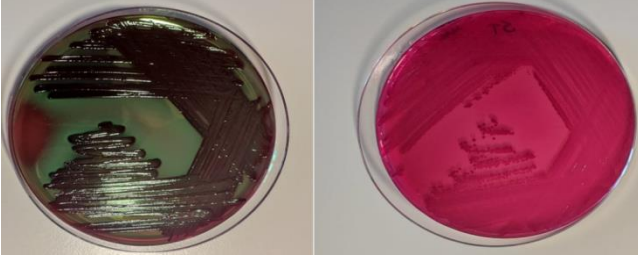
3.2.6. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) sürüm 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) paket programı kullanıldı. Frekans verilerini karşılaştırmak için Pearson Ki-kare (χ^2) testi (Fisher Kesin χ^2 Testi) kullanıldı. χ^2 testi kullanılarak örnek alınana köpeklerin klinik durumu (ishal veya sağlıklı) ile *E. coli* izolatlarının antibiyotiklere direnç durumları, çoklu antibiyotik direnç durumları, patotipleri ve filotipleri arasındaki ilişki incelendi. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, $p < 0,05$ olan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Bakteri İzolasyon ve İdentifikasyon

Bu çalışma sürecinde toplam 80 köpektan (40 klinik vaka (ishal olan) ile 40 kontrol örneği (ishal olmayan)) rektal sürüntü örneği alındı. EMB agarlarda metalik yeşil refle veren, MacConkey agarda laktoz fermentasyonu pozitif olan 55 (%68,7; 55/80) köpeğe ait (29 ishal (%72,5; 29/40); 26 kontrol (65,0; 26/40)) örneklere *E. coli* şüpheli koloniler elde edildi. İshal olan ve kontrol grubunda bulunan köpek örneklereinden 100'er koloni olmak üzere toplamda 200 izolat pasajlandı. İzolatlarının identifikasyonları fenotipik olarak BD Phoenix 100 otomatik mikrobiyoloji sistemi ile yapılarak ve genotipik olarak da PZR ile doğrulandı.



Resim 2. a. EMB agarda karakteristik yeşil metalik parlaklık gösteren ve **b.** MacConkey agar'da laktoz fermentasyonu pozitif *E. coli* izolatları.

E. coli olarak izole ve identifiye edilen izolatların önce patotipleri PZR ile belirlendikten sonra; patotipleri tespit edilen izolatların sırası ile filotipleri incelendi ve antibiyotik duyarlılık testleri yapıldı.

4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

4.2.1. Patotiplendirme

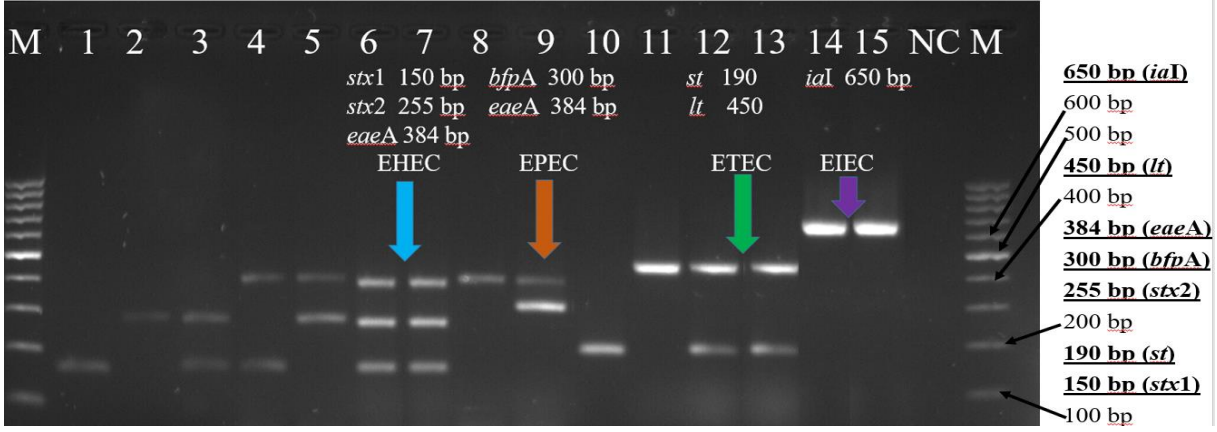
Tüm *E. coli* izolatlarının patotiplendirme amacı ile hedef virülans genlerinin varlığı PZR ile incelendi. Sonuçlar, ishalleri köpeklerden elde edilen izolatların ise %47,0'sinin (47/100) sağlıklı köpeklerden elde edilen izolatların %8,0'inin (8/100) en az bir ishal ile ilişkili gen taşıdığını gösterdi.

Toplam 55 izolattan %60,0'si (33/55) yalnızca bir geni (*stx1*, *stx2*, *eaeA*, *st*, *lt*, *ial*) amplifiye ederken, %40,0'si (22/55) virülans gen kombinasyonuna sahipti (*stx1+stx2*, *stx1+eaeA*, *stx2+eaeA*, *eaeA+bfpA*, *st+lt*) (Tablo 6, Resim 3).

İshal olan köpeklerin %51,0'i (24/47) EHEC, %34,0'ü (16/47) EPEC, 10,6'sı (5/47) ETEC, 4,3'ü (2/47) EIEC olarak tespit edilirken; sağlıklı köpeklerin ise %25,0'i (2/8) EHEC, %37,5'i (3/8) EPEC, 25,0'si (2/8) ETEC, 12,5'i (1/8) EIEC olarak tespit edildi. Tüm izolatların %47,2'si (26/55) EHEC, %34,5'i (19/55) EPEC, %12,8 (7/55) ETEC, %5,5 (3/55) EIEC olarak tespit edildi.

Tablo 4. İshal ve sağlıklı köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatlarının patotipleri.

Virülans Gen/Patotip	Klinik Durum		Toplam (n=55) (%)
	İshal (n=47) (%)	Sağlıklı (n=8) (%)	
EHEC	24 (51,0)	2 (25,0)	26 (47,2)
<i>stx1</i>	3 (6,4)	0 (0,0)	3 (5,5)
<i>stx2</i>	5 (10,6)	1 (12,5)	6 (10,9)
<i>stx1+stx2</i>	3 (6,4)	0 (0,0)	3 (5,5)
<i>stx1+eaeA</i>	5 (10,6)	1 (12,5)	6 (10,9)
<i>stx2+eaeA</i>	7 (14,5)	0 (0,0)	7 (12,7)
<i>stx1+stx2+eaeA</i>	1 (2,1)	0 (0,0)	1 (1,8)
EPEC	16 (34,0)	3 (37,5)	19 (34,5)
Atipik EPEC (<i>eaeA</i>)	12 (25,5)	3 (37,5)	15 (27,3)
Tipik EPEC (<i>eaeA+bfpA</i>)	4 (8,5)	0 (0,0)	4 (7,2)
ETEC	5 (10,6)	2 (25,0)	7 (12,8)
<i>st</i>	1 (2,1)	2 (25,0)	3 (5,5)
<i>lt</i>	3 (6,4)	0 (0,0)	3 (5,5)
<i>st+lt</i>	1 (2,1)	0 (0,0)	1 (1,8)
EIEC	2 (4,3)	1 (12,5)	3 (5,5)
<i>ial</i>	2 (4,3)	1 (12,5)	3 (5,5)



Resim 3. Patotip ile ilişkili virülans gen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. 1. *stx1* (150 bp), 2. *stx2* (255 bp) 3. *stx1+ stx2* (150 bp, 255 bp) 4. *stx1+eaeA* (150 bp, 384 bp) 5. *stx2+ eaeA* 2 (255 bp, 384 bp) 6. *stx1+ stx2+eaeA* (150 bp, 255 bp, 384 bp) 7. Pozitif Kontrol EHEC (*E. coli* ATCC 35150) 8. *eaeA* (384 bp) 9. *bfpA+eaeA* (300 bp, 384 bp) 10. *st* (190 bp) 11. *lt* (450 bp) 12. *st+lt* (190, 450 bp) 13. Pozitif Kontrol ETEC (*E. coli* ATCC 35401) 14. *iaI* (650 bp) 15. Pozitif Kontrol EIEC (*E. coli* ATCC 43890) (*ial*) NC: Negatif Kontrol (DNA'sız master miks) M: 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

4.2.2. Filotiplendirme

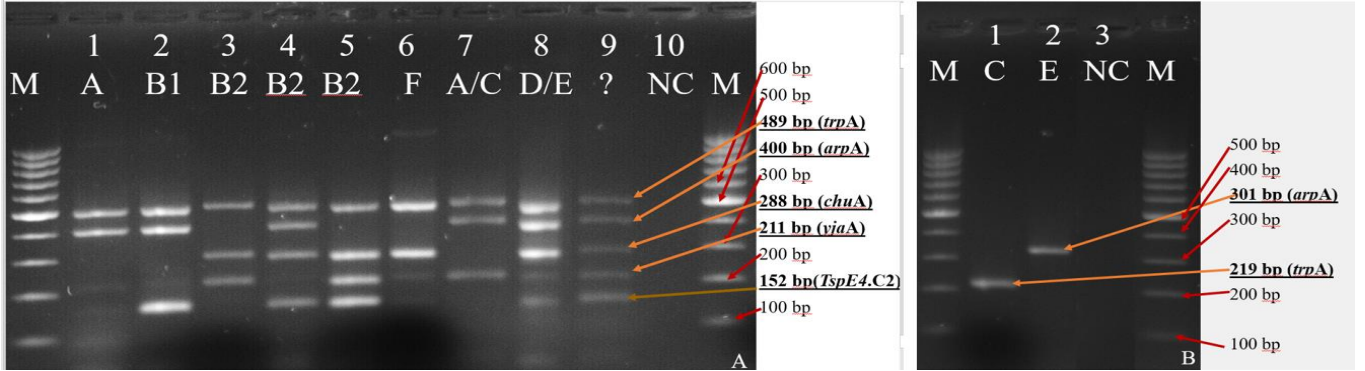
Patotipleri tespit edilen *E. coli* izolatlarının filotiplendirme amacı ile hedef genlerinin varlığı PZR ile incelendi.

İshal olan köpeklerden elde edilen izolatların %10,6'si (5/47) filotip B1, %27,8'i (13/47) filotip B2, %21,3'ü (10/47) filotip C ve filogrup D, %8,5'i (4/47) filotip E, %4,3'ü (2/47) filogrup F olarak tespit edilirken; sağlıklı köpeklerden elde edilen izolatların %12,5'inin (1/8) filogrup A, filogrup D ve filogrup E, %25,0'inin (2/8) filogrup B, %37,5'inin (3/8) filogrup C olduğu saptandı. İshalli köpeklerden elde edilen izolatların %6,4'ünün (3/47) filotipleri tespit edilemedi. Tüm izolatların ise %1,8'i (1/55) filogrup A, %12,7'si (7/55) filogrup B1, %23,7'si (13/55) filogrup B2 ve filogrup C, %20,0'si (11/55) filogrup D, %9,0'u (5/55) filogrup E, %3,6'sı (2/55) filogrup F olarak tespit edilirken; izolatların %5,5'inin (3/55) filotipi mevcut primerler ile saptanamadı (Tablo 5, Resim 4).

Tablo 5. İshal ve sağlıklı köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatlarının filotipleri.

Filogrup	Klinik Durum		Toplam (n=55)(%)
	İshal (n=47) (%)	Sağlıklı (n=8) (%)	
A	0 (0,0)	1 (12,5)	1 (1,8)
B1	5 (10,6)	2 (25,0)	7 (12,7)
B2	13 (27,6)	0 (0,0)	13 (23,7)
C	10 (21,3)	3 (37,5)	13 (23,7)
D	10 (21,3)	1 (12,5)	11 (20,0)
E	4 (8,5)	1 (12,5)	5 (9,0)
F	2 (4,3)	0 (0,0)	2 (3,6)
?	3 (6,4)	0 (0,0)	3(5,5)

?: MLST yapılması gereken filotipi belirlenemeyen izolat sayısı.



Resim 4. A. Yeni Clermont filotipleme yöntemi ile dörtlü PZR profilleri. 1. Grup A (- - - + +), 2. Grup B1 (+ - - + +), 3. Grup B2 (- + + - +) 4. Grup B2 (+ - + + +) 5. Grup B2 (+ + + - +), 6. Grup F (- - + - +) 7. Grup A/C (- + - + +), 8. Grup D/E (- - + + +), 9. Bilinmeyen Grup (+ + + + +) (152 bp, 211 bp, 288 bp, 400 bp, 489 bp), NC: DNAsız master miks M: Marker (100 bp, Fermentas). **B.** 1. Grup C (219 bp) 2. Grup E (301 bp) NC: DNAsız master miks M: Marker (100 bp, Fermentas).

Clermont'un filogenetik yöntemine göre ishallerde en çok görülen filotip B2 (%27,6; 13/47) olurken; sağlıklı baskın filogenetik grup C (%37,5; 3/8); tüm izolatlar da ise flogrup B2 ve filogrup C (%23,7; 13/55) olarak tespit edildi (Tablo 5).

İshallerde ve sağlıklı köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatlarının taşıdıkları virülans genleri ve filotipleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. *E. coli* izolatlarının taşıdıkları virülans genleri ve filotipleri.

Virülans Gen	Klinik Durum																Toplam (n=55)
	İshal (n=47)								Sağlıklı (n=8)								
	A	B1	B2	C	D	E	F	?	A	B1	B2	C	D	E	F	?	
<i>stx1</i>		1			2												3
<i>stx2</i>			2		3					1							6
<i>stx1+stx2</i>			3														3
<i>stx1+eaeA</i>			2		3								1				6
<i>stx2+eaeA</i>			5		2												7
<i>stx1+stx2+eaeA</i>			1														1
Atipik EPEC (<i>eaeA</i>)				6		2	2	2				3					15
Tipik EPEC (<i>eaeA+bfpA</i>)				4													4
<i>st</i>		1							1	1							3
<i>lt</i>		2						1									3
<i>st+lt</i>		1															1
<i>ial</i>						2								1			3
Toplam	0	5	13	10	10	4	2	3	1	2	0	3	1	1	0	0	55

?: MLST yapılması gereken filotipi belirlenemeyen izolat sayısı.

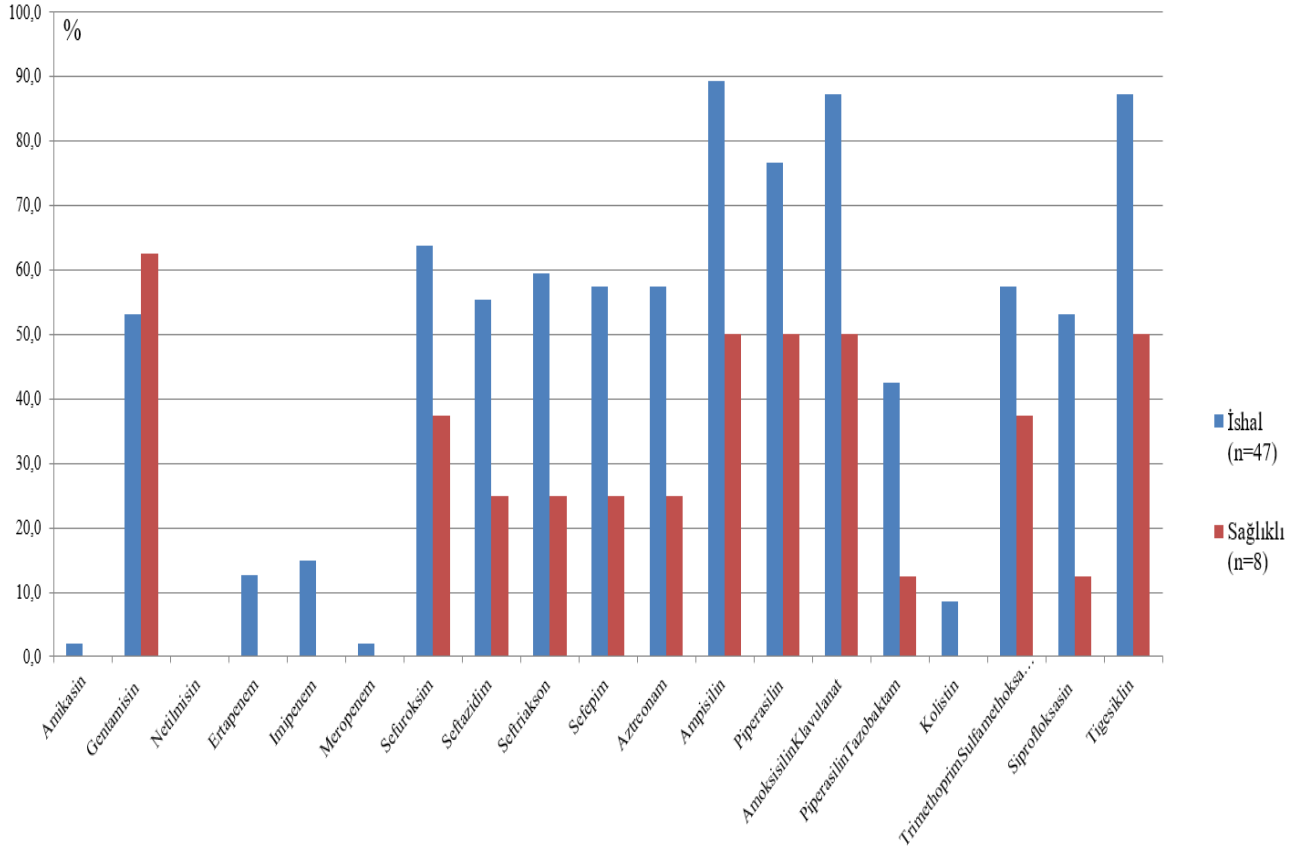
4.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Bu çalışmada ishal 40 köpekten elde edilen 47, sağlıklı 40 köpekten elde edilen 8 olmak üzere, toplamda patotipi belirlenmiş olan 55 *E. coli* izolatının, on antimikrobiyal aileye ait 19 antimikrobiyal ilaca karşı antibiyotik direnç durumları otomatize sistem kullanılarak incelendi (Tablo 7).

Tablo 7. E. coli izolatlarının antimikrobiyal dirençleri.

Antimikrobiyal Aile- Antibiyotik Adı (Kısaltma)	Klinik durum		Toplam (n=55) (%)
	İshal (n=47) (%)	Sağlıklı (n=8) (%)	
<u>Aminoglikozid</u>			
Amikasin	1 (2,1)	0 (0,0)	1 (1,8)
Gentamisin	25 (53,2)	5 (62,5)	30 (54,5)
Netilmisin	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<u>Karbapenem</u>			
Ertapenem	6 (12,8)	0 (0,0)	6 (10,9)
Imipenem	7 (14,9)	0 (0,0)	7 (12,7)
Meropenem	1 (2,1)	0 (0,0)	1 (1,8)
<u>Cephem</u>			
Sefuroksim	30 (63,8)	3 (37,5)	33 (60,0)
Seftazidim	26 (55,3)	2 (25,0)	28 (50,9)
Seftriakson	28 (59,6)	2 (25,0)	30 (54,5)
Sefepim	27 (57,4)	2 (25,0)	29 (52,7)
<u>Monobaktam</u>			
Aztreonam	27 (57,4)	2 (25,0)	29 (52,7)
<u>Penisilin</u>			
Ampisilin	42 (89,4)	4 (50,0)	46 (83,6)
Piperasilin	36 (76,6)	4 (50,0)	40 (72,7)
<u>Beta Laktam</u>			
Amoksisilin Klavulanat	41 (87,2)	4 (50,0)	45 (81,8)
Piperasilin Tazobaktam	20 (42,6)	1 (12,5)	21 (38,2)
<u>Lipopeptid</u>			
Kolistin	4 (8,5)	0 (0,0)	4 (7,3)
<u>Folat</u>			
Trimetoprim Sulfamethoksazol	27 (57,4)	3 (37,5)	30 (54,4)
<u>Kinolon</u>			
Siprofloksasin	25 (53,2)	1 (12,5)	26 (47,3)
<u>Tetrasiklin</u>			
Tigesiklin	41 (87,2)	4 (50,0)	45 (81,8)

E. coli izolatları bazı antibiyotiklere düşük (%1,8-%12,7) (amikasin, imipenem, ertapenem, meropenem, kolistin), bazı antibiyotiklere orta (%38,2, %47,3) (piperasilin tazobaktam, siprofloksasin) ve bazı antibiyotiklere ise yüksek (%50,9-%83,6) (gentamisin, sefuroksim, seftazidim, seftriakson, sefepim, aztreonam, ampisilin, piperasilin, amoksisilin klavulanat, trimetoprim sulfamethoksazol tigesiklin) düzeylerde dirençli idi. İzolatların hepsi netilmisin duyarlı idi (Tablo 7, Şekil 1).



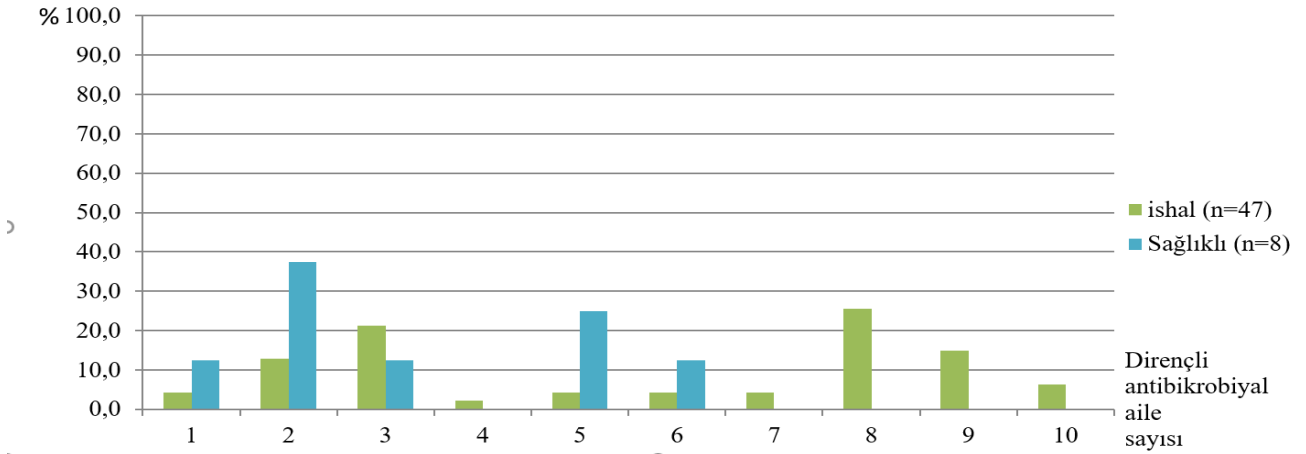
Şekil 1. İshal ve sağlıklı köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatlarının antibiyotiklere dirençlilik durumları.

4.3.1. Çoklu Antibiyotik Direnci

İshal köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatların %83.0 (39/47), sağlıklı görünümlü köpeklerin %50,0'si (4/8), tüm izolatların ise %78.2 (43/55) MDRne sahip idi. Tüm izolatların 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ve 1 antimikrobiyal aileye direnç oranı sırası ile %5,4 (3/55), %12,7 (7/55), %21,8 (12/55), %3,6 (2/55), %5,4 (3/55), %7,3 (4/55), %1,8 (1/55), %20,0 (11/55), %14,5 (9/55) ve %5,4 (3/55) olarak belirlendi. (Tablo 8, Şekil 2).

Tablo 8. İshal ve sağlıklı köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatlarının çoklu antibiyotik direnç durumları.

Dirençli antimikrobiyal aile sayısı	İshal (n=47)(%)	Sağlıklı (n=8)	Toplam (n=55)	MDR
1	2 (4,3)	1 (12,5)	3 (5,4)	12 (21,8)
2	6 (12,8)	3 (37,5)	9 (14,5)	
3	10 (21,3)	1 (20,0)	11 (20,0)	43 (78,2)
4	1 (2,1)	0 (0,0)	1 (1,8)	
5	2 (4,3)	2 (20,0)	4 (7,3)	
6	2 (4,3)	1 (12,5)	3 (5,4)	
7	2 (4,3)	0 (0,0)	2 (3,6)	
8	12 (25,5)	0 (0,0)	12 (21,8)	
9	7 (14,9)	0 (0,0)	7 (12,7)	
10	3 (6,4)	0 (0,0)	3 (5,4)	



Şekil 2. İshal ve sağlıklı köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatlarının MDR durumlarının dağılımı.

4. 4. İstatistiksel Değerlendirme

Materyal alınan köpeklerin klinik durumu ile *E. coli* izolatlarının antibiyotiklere karşı direnç durumları arasındaki ilişki Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9. Klinik durum ile izolatların antibiyotiklere direnç durumları arasındaki ilişki.

Antibiyotik	Klinik Durum		χ^2	P
	İshal (n=47)	Sağlıklı (n=8)		
Amikasin, Meropenem R+	1	0	0,170	1
Amikasin, Meropenem R-	46	8		
Gentamisin R+	25	5	0,235	0,715
Gentamisin R-	22	3		
Ertapenem R+	6	0	1,125	0,577
Ertapenem R-	41	8		
Imipenem R+	7	0	1,340	0,577
Imipenem R-	40	8		
Sefuroksim R+	30	3	1,939	0,244
Sefuroksim R-	17	5		
Seftazidim R+	26	2	2,469	0,143
Seftazidim R-	21	6		
Seftriakson R+	28	2	3,236	0,123
Seftriakson R-	19	6		
Sefepim Aztreonam R+	27	2	2,835	0,131
Sefepim Aztreonam R-	20	6		
Ampisilin R+	42	4	7,599	0,019*
Ampisilin R-	5	4		
Piperasilin R+	36	4	2,394	0,193
Piperasilin R-	11	4		
AmoksisilinKlavulanat,Tigesiklin R+	41	4	6,255	0,029*
AmoksisilinKlavulanat,Tigesiklin R-	6	4		
Piperasilin Tazobaktam R+	20	1	2,568	0,136
Piperasilin Tazobaktam R-	27	7		
Kolistin R+	4	0	0,721	1
Kolistin R-	43	8		
Trimetoprim Sulfamethoksazol R+	27	3	1,077	0,446
Trimetoprim Sulfamethoksazol R-	20	5		
Siprofloksasin R+	25	1	4,459	0,054*
Siprofloksasin R-	22	7		

Köpeklerin klinik durumu ile ampisilin (p=0,019), amoksisilin klavulonat (p=0,029), siprofloksasin (p=0,054) ve tigesiklin (p=0,019) direnci arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki tespit edilmiştir (p<0,05) (Tablo 9).

Materyal alınan köpeklerin klinik durumu ile *E. coli* izolatlarının çoklu antibiyotik direnç durumları arasındaki ilişki Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Klinik durum ile izolatların çoklu antibiyotik direnç durumları arasındaki ilişki.

Antibiyotik Direnç Fenotipi	Klinik Durum		χ^2	P
	İshal (n=47)	Sağlıklı (n=8)		
MDR+	39	4	4,280	0,059
MDR-	8	4		

Köpeklerin klinik durumu ile çoklu antibiyotik direnç durumları arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki tespit edilememiştir (Tablo 10).

Materyal alınan köpeklerin klinik durumu ile *E. coli* izolatlarının patotipleri arasındaki ilişki Tablo 11'de gösterilmiştir

Tablo 11. Klinik durum ile izolatların patotipleri arasındaki ilişki.

Patotip	Klinik Durum		χ^2	P
	İshal (n=47)	Sağlıklı (n=8)		
EHEC+	24	2	1,829	0,257
EHEC-	23	6		
EPEC+	16	3	0,035	1
EPEC-	31	5		
ETEC+	5	2	1,246	0,267
ETEC-	42	6		
EIEC+	2	1	0,885	0,382
EIEC-	45	7		

Köpeklerin klinik durumu ile *E. coli* izolatlarının patotipleri arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki tespit edilememiştir (Tablo 11).

Materyal alınan köpeklerin klinik durumu ile *E. coli* izolatlarının filotipleri arasındaki ilişki Tablo 12’de gösterilmiştir

Tablo 12. Klinik durum ile izolatların filotipleri arasındaki ilişki.

Filotip	Klinik Durum		χ^2	P
	İshal (n=47)	Sağlıklı (n=8)		
A+	0	1	5,875	0,145
A-	47	7		
B1+	5	2	1,246	0,267
B1-	42	6		
B2+	13	0	2,845	0,176
B2-	34	8		
C+	10	3	0,979	0,376
C-	37	5		
D+	10	1	0,323	1
D-	37	7		
E+	4	1	0,129	0,559
E-	43	7		
F+	2	0	0,347	1
F-	45	8		

Köpeklerin klinik durumu ile *E. coli* izolatlarının filotipleri arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki tespit edilememiştir (Tablo 12).

5. TARTIŞMA

Evcil hayvanlar, hayatımızın önemli bir parçasıdır ve insanlarla sık sık yakın temas halindedirler. Bu yakın temas sonucunda pet hayvanlarından insanlara ishal etkeni olan *E. coli* patotiplerini bulaşabileceği bilinmektedir (Younis ve diğerleri, 2015). Bu nedenle, evcil hayvanlarımızın sağlığı hem kendi sağlığımız hem de halk sağlığı için kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada, ishal olan ve sağlıklı görünümlü yavru köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatlarında DEC patotipleri ile ilişkilendirilen virülans faktörlerinin sıklığını belirledik. Daha sonra izolatların genetik kökenlerini ve özelliklerini daha iyi anlayabilmek için filotiplendirme çalışmaları yaptık. Son olarak da patotip ve filotiplerini tespit ettiğimiz izolatlarımızın hem beşeri hem de veteriner hekimlikte sıklıkla kullanılan antibiyotiklere karşı direnç durumlarını belirlememeye çalıştık. Bu bağlamda, evcil hayvanlardan kaynaklanan DEC patotiplerini, filogrupları ve antibiyotik direnç profillerini inceleyerek, hem evcil hayvanlarımızın hem de insanların sağlığı için potansiyel riskleri daha iyi anlamayı hedefledik.

İshal olan köpeklerdeki *E. coli* yaygınlığı çalışmalara göre değişkenlik göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ishal belirtileri gösteren köpeklerden elde edilen *E. coli* izolasyon oranı Mısır'da %67,7 (Zarea ve diğerleri, 2020), Nijerya'da %73,5 (Mustapha ve diğerleri, 2021) olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada *E. coli* ise izolasyon oranı diğer çalışmalara benzer şekilde yüksek oranlarda (%72,5) saptanmıştır. Bu çalışmada örnek alınan köpekler 1-6 aylık yaş grubunda olan yavru köpeklerdi. Bu durum özellikle genç yaştaki ishallerde *E. coli* izolasyonunun yüksek görüldüğünü bildiren çalışmalara uyumludur (Zarea ve diğerleri, 2020). Yapılan çalışmalardaki izolasyon oranları arasındaki farklılıklar örnek seçimi, kullanılan izolasyon yöntemleri, örnek alınan hayvanların yaşları, coğrafi faktörler ve popülasyon farklılıkları gibi bir dizi faktörün birleşimi sonucunda olabilir.

Bakterilerdeki antimikrobiyal direnç, antibiyotiklerin keşfedilmesinden bu yana sürekli evrim geçirmektedir. Bakteriyel direnci artıran birçok faktör bulunmaktadır, bunlar arasında antibiyotiklerin profilaktik veya yanlış kullanımı, hayvanlardan insanlara (veya tam tersi) geçen dirençli bakterilerin yayılması yer almaktadır (Grave ve Tanem, 2006). Bununla birlikte yerel antibiyotik kullanımı, hayvan popülasyonu ve çevresel faktörler göz önüne alındığında, farklı bölgelerde ve farklı zamanlarda farklı direnç desenleri gözlemlenebilir. Bu da özellikle

farklı ülkelerde hatta aynı ülke içerisinde farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda, farklı antibiyotik direnç durumlarının ortaya çıkmasının en önemli nedenlerinden birisidir. Bu nedenlerden dolayı sonuçlarımız, amikasinine yüksek duyarlılık açısından Mısır'da (Younis ve diğerleri, 2015; Zarea ve diğerleri, 2020) yapılan çalışma bulguları ile uyumlu olmakla birlikte diğer antibiyotiklere direnç durumları açısından oransal farklılıklar göstermektedir. (Younis ve diğerleri, 2015; Vega Manriquez ve diğerleri, 2020; Zarea ve diğerleri, 2020).

Çalışmamızda antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçları hem sağlıklı hem de ishal köpeklerden elde edilen izolatların β -laktamlara, aminoglikozidlere, tetrasiklinlere ve folat inhibitörlerine karşı dirençli olduğunu göstermiştir. Bu, dünya genelinde köpeklerden izole edilen bakterilerde antinikrobiyal direnç konusunda yapılan birçok çalışma sonuçları ile uyumludur (Younis ve diğerleri, 2015; Mustapha ve diğerleri, 2021; Karahutová ve diğerleri, 2021).

Köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatlarımızda gentamisin, sefuroksim, seftazidim, seftriakson, sefepim, aztreonam, ampisilin, piperasilin, amokisillin klavulanat, trimetoprim sulfamethoksazol tigesikline yüksek düzeyde direnç saptanmıştır. Seftazidim, seftriakson, aztreonam, tigesiklin, piperasilin insanlarda çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılan önemli ilaçlardır. Köpeklerde bu antibiyotiklere karşı direnç gelişmesi, köpeklerle insanlar arasında enfeksiyonların yayılma riskini olması açısından (Younis ve diğerleri, 2015) önemlidir. Bu nedenle, evcil hayvanlarla temas eden kişilerin enfeksiyon riskini azaltmak için dikkatli olmaları önemlidir.

Benzer şekilde *E. coli* izolatlarımızda yine beşeri hekimlikte kullanılan imipenem, ertapenem, meropenem, kolistine düşük (%1,8-%12,0), piperasilin tazobaktama ise orta düzeyde (%38,2) direnç saptanmıştır. Bu antibiyotiklerin veteriner hekimlikte kullanılmaması, veteriner pratiğinde bu ilaçlarla tedavi edilen bakterilere karşı direnç gelişme olasılığını düşürmüş olabilir. Ancak bu ilaçlara karşı direnç, insanlarda ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak önemli seçenekleri sınırlayabilir. Özellikle meropenem gibi karbapenem antibiyotikleri, insanlarda çok dirençli bakterilere karşı son çare olarak kullanılır. Bu antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerin evcil köpeklerde bulunması, köpek sahiplerinin bu bakterilerle temas etmeleri ve bu bakterilerin insanlara geçme potansiyelleri olduğundan halk sağlığını etkileyebilir.

Çalışmamızda, örnek alınan köpeklerde tigesiklin hiç kullanılmamış olmasına rağmen, yüksek düzeylerde (%81,8) direnç saptandı. Bu durumun iki muhtemel sebebi olabilir.

Bunlardan birincisi bu bakterilerin temas ettiği çevreden veya başka bir kaynaktan tigesiklin direnç genini kazanmaları olabilir. İkincisi ise tetrasikline dirençli bakterilerde ribozomal hedeflerde veya taşıma sistemlerinde meydana gelen değişiklikler, tigesiklin direncini de tetikleyebilme ihtimalidir. Çünkü materyal alınan işletmelerde tetrasiklin yaygın olarak kullanılan bir antibiyotik idi. Tetrasiklin ve tigesiklin, aynı etki mekanizmasına sahiptir ve aynı ribozomal hedeflere bağlanarak bakteri hücrelerinin protein sentezini engeller. Bu nedenle tetrasiklin antibiyotiği tigesiklin direncinin gelişimine katkıda bulunmuş olabilir (Yaghoubi ve diğerleri, 2022). Direnç genleri, plazmidler veya diğer genetik elemanlar aracılığıyla transfer edilebilir. Direnç genlerinin varlığı ve aktarımı, farklı antibiyotiklere karşı direncin yayılmasına katkıda bulunabilir (Yaghoubi ve diğerleri, 2022). Bu durumu daha iyi anlamak için yapılabilecek ileri araştırmalar ve direnç mekanizmalarının analizi gerekebilir.

Çalışmamızın dikkat çekici sonuçlarından birisi de izolatlarımızın düşük düzeylerde de olsa (%7,3) kolisitine direnç geliştirmiş olması idi. *E. coli*'deki kolistin direncinin kromozomal genlerdeki mutasyonlardan veya plazmit aracılı *mcr* genlerinin varlığından kaynaklanabileceği bildirilmektedir (Li ve diğerleri, 2022). Şu anki bilgilerimize göre Türkiye'de ishali köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatlarında kolistin direnci bildirilmemiştir. Kolistin, insanlarda ve hayvanlarda ciddi enfeksiyonların tedavisinde son çare olarak kullanılan bir antibiyotiktir. Bu nedenle kolistin direnci, hem veteriner hem de insan sağlığı açısından ciddi bir endişe kaynağı olmalıdır.

Benzer şekilde çalışmamızda, yine beşeri hekimlikte enfeksiyonların tedavisi açısından önemli olan karbapenem grubu antibiyotiklere, düşük düzeylerde de olsa (%1,8-%12,7) direnç saptadık. Karbapenemlere düşük düzeylerde direnç gelişimi bakteriler arası gen transferi yoluyla oluşabileceği düşünülebilir. Bu durum, bakterilerin çevresel koşullara uyum sağlama yeteneğinin bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Ayrıca, antibiyotik kullanımının yaygın olduğu alanlarda, karbapenem direnci geliştiren bakterilerin çevrede bulunma olasılığı daha yüksek olabilir. Bu nedenle, bu tür direnç oluşumlarını izlemek ve kontrol altına almak, antibiyotiklerin etkili bir şekilde kullanılmasını ve antibiyotik direncinin yayılmasını önlemeyi amaçlayan önemli bir sağlık hedefi olabilir.

Bu çalışmada köpeklerin klinik durumu ile ampisilin, amoksisilin klavulanat, siprofloksasin ve tigesiklin direnci arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki tespit edildi. Bu sonuç antibiyotiklere karşı direnç geliştirme olasılığının köpeklerin ishal durumu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. (Tablo 9). Bu bulgu klinik açıdan önemli birkaç noktayı işaret edebilir: Örneğin; köpeklerde ishal vakalarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin

bazılarında direnç gelişimi, tedavi seçeneklerini sınırlandırabilir. Zaman içerisinde ampisilin, amoksisilin klavulanat, siprofloksasin gibi antibiyotikler etkisiz hale gelebilir. Bu, veterinerlerin tedavi seçeneklerini yeniden değerlendirmeleri gerekebileceği anlamına gelebilir. Veteriner hekimler, köpeklerin tedavisinde uygun antibiyotikleri seçerken bu direnç profillerini göz önünde bulundurmalıdır. Bununla birlikte, *E. coli* izolatlarının kazanmış olduğu antibiyotik direnci sadece hayvan sağlığı açısından değil, aynı zamanda insan sağlığı açısından da endişe kaynağıdır. Köpeklerde görülen antibiyotik direnci, insanlara temas, kontamine gıda tüketilmesi vs yollarla geçebilir. Bu nedenle Bu nedenle, köpeklerin dışkılarının hijyenik bir şekilde insanların yaşadıkları ortamlardan uzaklaştırılması ve ev ortamına bulaş riskinin ortadan kaldırılması köpeklerle temas halinde olan kişiler için önemlidir. Dolayısıyla, bu direncin izlenmesi ve kontrol altına alınması, genel halk sağlığı açısından önemlidir.

Çoklu antibiyotik direnci, üç veya daha fazla antibiyotik sınıfında en az bir antibiyotiğe dirençli olma durumunu ifade eder (Magiorakos ve diğerleri, 2012). Bu çalışmada, izolatlarımızın MDR oranları Nijerya (Mustapha ve diğerleri, 2021) ve Mısır'da (Younis ve diğerleri, 2015) yapılan çalışmalarda bildirilen oranlar kadar yüksek oranlarda (%100,0) olmasa bile, yüksek denebilecek bir oranda (%78,2) saptanmıştır. İshal olan köpeklerde çoklu antibiyotik direncinin yüksek olması, bu köpeklerin tedavisini zorlaştırabilir. Çünkü çoklu dirence sahip bakterilere karşı kullanılacak etkili antibiyotiklerin seçeneği sınırlıdır. Bu nedenle, tedavi seçenekleri daha iyi değerlendirilmeli ve antibiyotikler sadece gerektiği durumlarda kullanılmalıdır.

Bu çalışmada köpeklerin klinik durumu ile çoklu antibiyotik direnç durumları arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki tespit edilmedi. İshalin nedenleri çok çeşitli olabilir ve sadece bakteriyel enfeksiyonlara değil, virüsler, parazitler, diyet değişiklikleri ve başka faktörlere de bağlı olabilir. Bu faktörler, dirençli suşların oluşumunu ve yayılmasını etkileyebilir. İshal olan ve sağlıklı görünen köpeklerin yaşadığı çevrelerdeki antibiyotik kullanımı alışkanlıkları benzer olabilir. Bu nedenle, çoklu antibiyotik direnci kazanma olasılıkları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiş olabilir. Bu tür bir çalışmada istatistiksel ilişkinin tespit edilememesi, birden fazla faktörün etkileşimi, örneklem büyüklüğü ve çalışmanın kapsamı gibi çok sayıda faktörden kaynaklanabilir.

Halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından önemli bir endişe kaynağı olan enterik *E. coli* patotipleri, yüksek bir patojenik mekanizma ve virülans faktörü çeşitliliğine sahiptir. Bu çalışmada, EHEC en sık tespit edilen patovardı ve izolatların %47,2'ini oluşturdu. Bu patovar,

ishal köpeklerin %51,0'inden sağlıklı köpeklerin ise %25,0'inden izole edildi. EHEC prevalansı görünüşte sağlıklı hayvanlardan alınan örneklerde daha düşüktü. Sağlıklı ev köpeklerinde daha önce yapılan çalışmalarda EHEC prevalansı İran'da %4,08 (Askari ve diğerleri, 2020), Türkiye'de ise %5,9 (Sancak ve diğerleri, 2004); ishal köpeklerde ise Brezilya'da %2,7 olarak bildirilmiştir (Coura ve diğerleri, 2020). Genel olarak, bu çalışmalar, ishal olan köpeklerde EHEC yaygınlığının bölgeye göre değişebileceğini ve bazı sağlıklı köpeklerde bulunabileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda daha yüksek oranlarda EHEC prevalansı tespit edilmesi coğrafi bölge farklılığı sebebi ile olabilir. Çalışmamızın gerçekleştirildiği bölge, diğer çalışmalardan farklı bir EHEC yayılımına sahip olabilir. Ayrıca, kullanılan laboratuvar yöntemleri, çalışmalara göre farklılık gösterebilir. Çalışmamızın incelendiği köpek popülasyonu diğer çalışmalardan farklıdır. Örneğin, köpeklerin yaş, cinsiyet veya ırk gibi faktörlere göre farklı prevalansa sahip olması mümkündür

Bu çalışmada EPEC en sık tespit edilen ikinci patovar idi. EPEC, intimin üretimi ile karakterize edilir ve varlığı veya yokluğuna göre tipik veya atipik olarak sınıflandırılabilir (Mainil, 2013). Çalışmamızda, Brezilya'da yapılan çalışmalara (Puño-Sarmiento ve diğerleri, 2013; Coura ve diğerleri, 2018) benzer bir şekilde, atipik EPEC'in tipik EPEC'ten daha yüksek bir dağılıma sahip olduğunu saptadık. Sonuçlarımız, diğer çalışmalarla uyumlu olup, EPEC'in köpeklerde önemli ishal oluşturan patotip olduğunu göstermektedir (Puño-Sarmiento ve diğerleri, 2013; Coura ve diğerleri, 2018).

Bu çalışmada ETEC, klinik vakalarda %10,6 ve ishalsiz köpeklerde %25,0 ile en yaygın görülen patovar olarak üçüncü sırada yer aldı. Diyareli köpeklerde ETEC yaygınlığı, yapılan çalışmalara göre değişkenlik gösterir. Sancak ve diğerleri (2004), ETEC'in akut ve kronik ishali olan köpeklerde, sağlıklı evdeki ve köpek kulübesindeki kontrol köpeklerine göre daha yaygın olduğunu bulmuştur. İran'da yapılan bir çalışmada sağlıklı köpeklerde ETEC prevalansı %2,1 olarak bildirilmiştir (Askari ve diğerleri, 2020).

İzolatlarımız arasında en düşük oranda saptanan EIEC hem ishali (%4,3) hem de ishalsiz köpeklerde (%12,5) tespit edildi. Yapılan çalışmalarda Meksika'da hem sağlıklı hem de ishal köpeklerde (Vega-Manriquez ve diğerleri, 2020), Brezilya'da ise ishali köpeklerde (Puño-Sarmiento ve diğerleri, 2013) EIEC tespit edilmediği bildirilirken; İranda ise sağlıklı köpeklerde (%6,1) tespit edilmiştir (Askari ve diğerleri, 2020).

Bu çalışmada EPEC, ETEC ve EIEC prevalansları sağlıklı olan köpeklerde (%37,5, %25,0, %12,59) ishal olan köpeklerden (%37,5, %10,6, %4,3) daha yüksek saptandı. Bu

durum sağlıklı köpeklerin, virülans gen taşıyıcısı olarak virülans genlerini barındırabileceklerini ancak semptom göstermeyebileceklerini göstermektedir. Sağlıklı köpeklerde bulunan EPEC/ETEC/EIEC suşları, ishal köpeklerdekinden daha az patojen olabilir, bu da semptomları tetiklememiş olabilir. Ya da örnek alınan sağlıklı köpeklerin daha güçlü bir bağışıklık sistemi olabilir, bu da ishal semptomlarını engellemiş olabilir. Bu farklılıkların birden çok faktöre bağlı olduğunu göz önünde bulundurarak daha fazla örnek kullanılarak araştırma yapılarak bu farklılıkların kesin nedenlerini açıklığa kavuşturabilir.

Bu çalışmada, köpeklerin klinik durumu ile *E. coli* izolatlarının patotipleri arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki tespit edilmemiştir (Tablo 11). *E. coli*, farklı patotiplere ayrılabilir ve her bir patotipin farklı enfeksiyonlara yol açma potansiyeli vardır. Ancak, bu patotipler farklı klinik durumlarla ilişkilendirilebilirken, bazen de aynı klinik durumda farklı patotipler bulunabilir. Bu nedenle, klinik durumla patotip arasındaki ilişki karmaşık olabilir. İshalin birden fazla nedeni olabilir ve her bir neden farklı *E. coli* patotipleri ile ilişkilendirilebilir. Bu karmaşıklık, istatistiksel bir ilişkinin tespitini zorlaştırabilir.

Clermont filogrupsu yöntemi, genetik alt yapıya dayalı olarak *E. coli* izolatlarını filo gruplarına sınıflandırmak için geliştirilmiştir. Orijinal yöntem izolatları dört filo gruptan birine (A, B1, B2 veya D) atamıştır (Clermont ve diğerleri, 2000), ancak güncellenmiş bir yöntem şimdi sekiz filo grubunu tanımaktadır (A, B1, B2, C, D, E, F ve klad I) (Clermont ve diğerleri, 2013). Güncellenmiş yöntem doğru bir şekilde *E. coli* izolatlarının %95'ten fazlasını bir filo gruba atadığını göstermiştir (Clermont ve diğerleri, 2013). Clermont ve arkadaşları tarafından geliştirilen *E. coli* filogrup analizinde kommensal gruplar genellikle A ve B1 filogrupsu olarak adlandırılır. Bu filogrupsu *E. coli*'nin kommensal veya doğal olarak insan ve hayvanların bağırsaklarında bulunan suşlarını içerir. Virulent gruplar ise B2 ve D filogrupsu içerir. Diğer filogrupsu patojeniteleri hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Filogrupsu, *E. coli* suşlarını genetik benzerliklerine göre sınıflandırmak için kullanılır ve bakterinin farklı özelliklerini ve enfeksiyon potansiyelini yorumlamada yardımcı olabilir. Ancak bu filogrupsu sadece bir sınıflandırma yöntemidir ve tek başına patojenite hakkında tam bir bilgi vermez (Clermont ve diğerleri, 2013).

Köpek izolatları arasındaki filogenik gruplarının dağılımının, ekstraintestinal, kommensal ve klinik örnekler açısından farklılık gösterdiği bilinmektedir. Ekstraintestinal izolatlar söz konusu olduğunda, B2 ve D gruplarının baskın olması beklenirken, Gibson ve arkadaşları (2010) B2 grubuna ait hiç izolat bulunmadığını bildirmiştir. Bununla birlikte Maynard ve arkadaşları (2004) ekstraintestinal örneklerde B2 filogen grubunun %88,0

sıklığını rapor etmiştir. Harada ve arkadaşlarının (2012) yaptığı bir çalışmada köpeklerin dışkı suşlarında B2 grubunun yüksek bir prevalansı gözlenmiştir. Davis ve arkadaşları (2011), sağlıklı köpeklerin rektal bölge dahil olmak üzere farklı anatomik bölgelerinden izole ettikleri suşlarda B2 ve D grubunun baskın olduğunu da gözlemlemişlerdir.

Bu çalışmada filo grupları analizi, kommensal filotipler olan A ve B1'in sağlıklı köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatlarının %37,5'sini (3/8); ishallerden elde edilen izolatların ise %10,6'sını (5/47); virulent B2 ve D filogruplarının ise sağlıklı köpeklerde %12,5 (1/8) ve ishal köpeklerde %48,9 (23/47) oluşturduğunu gösterdi. Meksika'da yapılan çalışmada da *E. coli* izolatları filogrup karakterizasyonuna dayanarak analiz edildiğinde, sağlıklı köpeklerde kommensal filogruplar A ve B1 %57,0 ile virulent filogruplar olan B2 ve D %43,0; diyareli köpeklerde ise kommensal filogruplar %31,0 ve virulent filogruplar %69,0 oranında saptandı (Vega-Manriquez ve diğerleri, 2020). Bu bulgular görünüşte sağlıklı köpeklerin hem kommensal hem de virulent suşlarla kolonize olabildiğini göstermektedir. Meksika'da yapılan çalışmaya benzer bir şekilde, bu çalışmada da, evcil köpeklerin virulent *E. coli* filogruplarının rezervuarı olduğunu; sahiplerine veya dolaylı temasta olan insanlara potansiyel olarak bu etkenleri bulaştırabilecekleri düşünülebilir (Arais ve diğerleri, 2018).

Örnek alınan köpeklerin klinik durumu ile *E. coli* izolatlarının filotipleri arasında anlamlı istatistiksel farklılıklar gözlenmedi (Tablo 11). *E. coli*, her biri farklı özelliklere sahip sekiz filotipe ayrılmaktadır. Bu filotipler farklı klinik durumlarla ilişkilendirilebilirken, bazen aynı klinik durumda farklı filotipler bulunabilir. Bu nedenle, klinik durumla filotip arasındaki ilişki karmaşık olabilir. İshal, birçok farklı nedenle ortaya çıkabilir. Bazen bakteriyel nedenlerle gelişirken bazen virüsler, parazitler, diyet değişiklikleri veya diğer faktörler nedeniyle de görülebilir. Bu faktörler, klinik durumu etkileyebilir ve bu da filotiplerle ilişkiyi belirlemeyi zorlaştırabilir. Benzer şekilde örnek sayıları, istatistiksel analiz sonuçlarını etkileyebilir. İshal olan köpekler grubunun çok daha büyük olması, analiz dengesiz olmasına ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlemenin zorlaşmasına sebep olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Filogrup ve patotiplendirme sonuçları, elde edilen *E. coli* izolatlarının genetik özelliklerini ve patojenik potansiyellerini değerlendirmek için önemli bir bilgi kaynağıdır. Filogruplar, izolatların genetik kökenini ve ilişkilerini anlamamıza yardımcı olurken, patotiplendirme ise izolatların potansiyel hastalık yapma yeteneklerini belirlememize yardımcı olur. Bu bilgiler, *E. coli* enfeksiyonlarının yayılma riskini değerlendirmek ve uygun tedavi stratejileri geliştirmek için önemlidir. Bu çalışmada, ishal ve sağlıklı köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatlarının patotipik, filogenetik ve antibiyotik direnç özelliklerini incelenmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

Bu çalışmada moleküler tekniklerin benimsenmesi, farklı *E. coli* patotiplerini ve filotiplerini daha hızlı tespit ve tanımlama olanağı sağlamıştır. Bu nedenle, şüpheli *E. coli* enfeksiyonları olan hastalar için uygun tedavileri belirleme ve salgınların kontrolü için kritik bilgiler sunmaktadır.

Patotip analizi, ishal köpeklerde beklenen şekilde diyarejenik *E. coli* patotiplerini tespit etmiştir. Ancak, bu çalışmada dikkat çeken bir nokta, sağlıklı köpeklerin dışkılarında da diyarejenik *E. coli* patotiplerine ait virülans genlerinin bulunmasıdır. Bu, sağlıklı görünümlü köpeklerin de insanlara veya diğer hayvanlara bulaşabilecek patojen *E. coli* suşlarını taşıma potansiyeline sahip olduğunu gösterir. Bu durum, insan veya diğer hayvanlar için enfeksiyon riskini artırabilir ve ciddi sağlık sorunlarına yol açabilir. Bu nedenle, veterinerler ve sağlık otoriteleri, köpeklerde bu tür patojenlerin varlığını izlemeli ve gerekli önlemleri almalıdır, böylece enfeksiyonların yayılmasını önleyebilirler. Köpek sahipleri, köpeklerinin temizlik ve hijyenine özen göstermelidir. Bu patojenlerin yayılmasını sınırlayabilir.

Filogrup analizi, virulent ekstraintestinal *E. coli* suşlarının çoğunlukla B2 ve D filogrubuyla ilişkilendirildiğini, kommensal suşların ise genellikle A veya B1 filogrupları ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Clermont ve diğerleri, 2013). C, D ve E filogrupları, patojen *E. coli* suşlarına ait virülans genlerini içerebilir ve bu nedenle halk sağlığı açısından önemli olabilir. Ayrıca, hem ishal hem de sağlıklı köpeklerden elde edilen çok farklı filogrupların varlığı, *E. coli* popülasyonunun çeşitliliğini gösterebilir. Bu, *E. coli*'nin doğal olarak farklı filogruplara sahip olduğunu veya farklı çevresel koşullara uyum sağlayabileceğini düşündürülebilir. B2 filogrubu, insanlarda ve hayvanlarda hastalık yapma potansiyeline sahip

olan izolatları içerebilir. Bu nedenle, B2 filogrupuna ait izolatların daha yakından incelenmesi ve patojenlik potansiyellerinin değerlendirilmesi önemlidir. *E. coli* izolatlarının filogrupları, bakterinin kökenini ve patojenlik potansiyelini gösteren önemli bir bilgidir.

Antibiogram sonuçlarına göre, hem sağlıklı hem de ishal köpeklerden izole edilen suşlar, β -laktamlara, aminoglikozidlere, tetrasiklinlere ve folat inhibitörlerine karşı dirençlidir ve MDR oranları yüksektir. Bu durum, hem sağlıklı hem de ishal köpeklerden elde edilen suşların birçok farklı antibiyotiğe karşı direnç geliştirdiğini gösterir ve köpeklerde tedavi seçeneklerini kısıtlar. Veteriner hekimler, antimikrobiyal ilaçlarını doğru şekilde reçete etmeli ve köpek sahiplerine antibiyotik direnci konusunda bilinçlendirme yapmalıdır. Yanlış kullanım, direnç problemini daha da kötüleştirebilir.

Köpeklerin klinik durumu ile ampisilin, amoksisilin klavulonat, siprofloksasin ve tigesiklin direnci arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki tespit edilirken; izolatların çoklu antibiyotik direnç durumları, patotipleri ve filotipleri arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki saptanmadı. Bu konular üzerinde daha fazla örnek kullanılarak daha kapsamlı araştırmaların yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatlarında, genellikle insan hekimliğinde kullanılan (imipenem, ertapenem, meropenem, kolistin, piperasilin tazobaktam, tigesiklin) antibiyotiklere karşı direnç saptanmıştır. Köpeklerden izole edilen *E. coli* suşlarının antibiyotik direnç genlerinin insanlara geçme potansiyeli olduğu bilinmekte ve çoklu dirençli *E. coli* suşlarının köpeklerle sahipleri arasında paylaşıldığı gözlemlenmektedir (Carvalho ve diğerleri, 2016). Bu durum, *E. coli* enfeksiyonlarının tedavi seçeneklerinin sınırlandırılmasına yol açarak önemli bir halk sağlığı sorunu teşkil edebilir. Bu bağlamda, köpeklerdeki *E. coli* enfeksiyonları ve direnç sorunları üzerine daha fazla araştırma yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmanın sonuçları, ishal köpekler kadar sağlıklı görünümlü evcil köpeklerin de insanlara bulaşabilecek çoklu antibiyotik dirençli, patojen *E. coli* patotip ve filotiplerini taşıyabileceğini göstermektedir. Köpek sahiplerinin ve veterinerlerin hijyen önlemlerine dikkat etmesi ve antibiyotik kullanımını antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre yapmaları önemlidir. Bu, hem köpeklerin sağlığını korumak hem de insan sağlığını tehlikeye atmamak için gereklidir.

KAYNAKLAR

- Abdelhalim K.A., Uzel A., Ünal N.G. (2020). Virulence determinants and genetic diversity of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strains isolated from patients with Crohn's disease. *Microbial Pathogenesis*, 145:104233. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104233.
- Afzal, M. (2017). Antibiotic resistance pattern of *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Pakistan: a brief overview. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 9, 277–279. doi: : 10.4172/1948-5948.1000377.
- Alvestegui A., Olivares-Morales M., Muñoz E., Smith R., Nataro J.P., Ruiz-Perez F., Farfan M.J. (2019). TLR4 participates in the inflammatory response induced by the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* on intestinal epithelial cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9:143. doi: 10.3389/fcimb.2019.00143.
- Arais, L.R., Barbosa, A.V., Andrade, J.R.C., Gomes, T.A.T., Asensi, M.D., Aires, C.A.M., Cerqueira, A.M.F. (2018). Zoonotic potential of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from puppies with diarrhoea in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 227:45–51. doi: 10.1016/j.vetmi c.2018.10.023.
- Arbab, S., Ullah, H., Wang, W., Zhang, J. (2022). Antimicrobial drug resistance against *Escherichia coli* and its harmful effect on animal health. *Veterinary Medicine and Science*, 8:1780–1786. doi: 10.1002/vms3.825.
- Arbab, S., Ullah, H., Wei, X., Wang, W., Ahmad, S. U., Zhang, J. (2021). Drug resistance and susceptibility testing of Gram negative bacterial isolates from healthy cattle with different β -Lactam resistance phenotypes from Shandong province China. *Brazilian Journal of Biology*, 83, e247061. doi: 10.1590/1519-6984.247061.
- Arbab, S., Ullah, H., Weiwei, W., Wei, X., Ahmad, S. U., Wu, L., Zhang, J. (2021). Comparative study of antimicrobial action of aloe vera and antibiotics against different bacterial isolates from skin infection. *Veterinary Medicine and Science*, 7(5), 2061–2067. doi: 10.1002/vms3.488.
- Askari, A., Ghanbarpour, R., Akhtardanesh, B., Aflatoonian, M.R., Sharifi, H., Jajarmi, M., Molaei, R. (2020). Detection of zoonotic diarrheagenic pathotypes of *Escherichia coli*

in healthy household dogs. *Iranian Journal of Microbiology*, 12(6): 522-530. doi: 10.18502/ijm.v12i6.5026.

Bag, M.A.S., Khan, M.S.R., Sami, M.D.H., Begum, F., Islam, M.S., Rahman, M.M., Rahman, M.T., Hassan, J. (2021). Virulence determinants and antimicrobial resistance of *E. coli* isolated from bovine clinical mastitis in some selected dairy farms of Bangladesh. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28, 6317–6323, 2021. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.06.099.

Barnett Foster, D. (2013). Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through the human gastrointestinal tract. *Virulence*, 4:315–323. doi: 10.4161/viru.24318

BD Phoenix-Otomatik Bakteri Identifikasyon ve Antibiyotik Duyarlılık Testi. (2023). <https://www.bd.com/en-uk/offerings/capabilities/microbiology-solutions/clinical-microbiology/identification-and-susceptibility-testing/bd-phoenix-automated-identification-and-susceptibility-testing-system>, adresinden erişildi.

Beata S., Michał T., Mateusz, O., Urszula, W., Choroszy, M., Andrzej, T., Piotr, D. (2021). Norepinephrine affects the interaction of adherent-invasive *Escherichia coli* with intestinal epithelial cells. *Virulence*. 12:630–637. doi: 10.1080/21505594.2021.1882780.

Belotserkovsky, I., Sansonetti, P.J. (2018). *Escherichia coli*, a Versatile Pathogen. Springer; Cham, Switzerland: *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*, pp.: 1–26.

Bhakat, D., Mondal, I., Chatterjee, N. (2020). *EatA*, a non-classical virulence factor, of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is modulated by the host factors during pathogenesis. *International Journal of Infectious Diseases*, 101:3–4. doi: 10.1016/j.ijid.2020.09.048.

Bin P., Tang Z., Liu S., Chen S., Xia Y., Liu J., Wu H., Zhu G. (2018). Intestinal microbiota mediates enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea in piglets. *BMC Veterinary Research*, 14:1–13. doi: 10.1186/s12917-018-1704-9.

Blyton, M.D., Banks, S.C., Peakall, R., Gordon, D.M. (2013). High temporal variability in commensal *Escherichia coli* strain communities of a herbivorous marsupial. *Environmental Microbiology*. 15:2162-2172. doi: 10.1111/1462-2920.12088.

Buuck, S., Smith, K., Fowler, R., Cebelinski, E., Lappi, V., Boxrud, D., Medus, C. (2020). Epidemiology of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in Minnesota, 2016–2017. *Epidemiology and Infection*, 148:e206. doi: 10.1017/S0950268820001934.

- Callaway, T. R., Carr, M., Edrington, T., Anderson, R. C., Nisbet, D. J. (2009). Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Current Issues in Molecular Biology*, 11:67. doi: 10.21775/cimb.011.067.
- Cao, H., Bougouffa, S., Park, T.-J., Lau, A., Tong, M.-K., Chow, K.-H., Ho, P.L. (2022). Sharing of antimicrobial resistance genes between humans and food animals. *MSystems*. 20;7(6):e0077522, doi: 10.1128/msystems.00775-22.
- Caruso, R., Lo, B.C., Núñez, G. (2020). Host–microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 20:411–426. doi: 10.1038/s41577-019-0268-7.
- Carvalho, A.C., Barbosab, A.V., Arais, L.R., Ribeiro, P.F., Carneiro, V.C., Cerqueira, A.M.F. (2016). Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of *Escherichia coli* from dogs and owners. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47: 150-158. doi: 10.1016/j.bjm.2015.11.005.
- Cebula, T.A., Payne, W.L., Feng, P. (1995). Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:248–250. doi: 10.1128/jcm.33.1.248-250.1995.
- Chen, Z., Jiang, X. (2014). Microbiological safety of chicken litter or chicken litter-based organic fertilizers: a review. *Agriculture*, 4, 1–29. doi: 10.3390/agriculture4010001.
- Chervy, M., Barnich, N., Denizot, J. (2020). Adherent-invasive *E. coli*: update on the lifestyle of a troublemaker in Crohn's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21:3734. doi: 10.3390/ijms21103734.
- Chowdhary, A., Kumar, A., Sharma, V., Prakash, C., Agarwal, A., Babu, K., ... Meis, J. F. (2014). Multidrug-resistant endemic clonal strain of *Candida auris* in India. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 33, 919-926. doi: 10.1007/s10096-013-2027-1.
- Clements, A., Young, J.C., Constantinou, N., Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, 3:71–87. doi: 10.4161/gmic.19182.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 4555-4558. doi: 10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000.

- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. (2004). Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 1770-1772. doi: 10.1128/JCM.42.4.1770-1772.2004
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., Gordon, D.M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1):58-65. doi:10.1111/1758-2229.12019.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylotyping method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environmental Microbiology Reports*, 5:58–65. doi:10.1111/1758-2229.12019
- Clermont, O., Lescat, M., O'Brien, C.L., Gordon, D.M., Tenailon, O., Denamur, E. (2008). Evidence for a human specific *Escherichia coli* clone. *Environmental Microbiology*, 10: 1000-10006. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01520.x
- Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., ... Denamur, E. (2011). Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infection, Genetics and Evolution*, 11: 654-662. doi: 10.1016/j.meegid.2011.02.005.
- Costa, D., Poeta, P., Saenz, Y., Vinue, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., ...Torres, C. (2006). Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 1311-1312. doi: 10.1093/jac/dkl415.
- Coura, F.M., Diniz, A.N., Junior, C.A.O., Lage, A.P., Lobato, F.C.F., Heinemann, M.B., Silva, R.O.S. (2018). Detection of virulence genes and the phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil. *Ciência Rural*, 48(02): e20170478. doi: 10.1590/0103-8478cr20170478.
- Cowley, L.A., Oresgun, D.R., Chattaway, M.A., Dallman, T.J., Jenkins, C. (2018). Phylogenetic comparison of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated from cases of diarrhoeal disease in England, 2005–2016. *Journal of Medical Microbiology*, 67:884-888. doi: 10.1099/jmm.0.000739.

- Crofts, A.A., Giovanetti, S.M., Rubin, E.J., Poly, F.M., Gutiérrez, R.L., Talaat, K.R., Porter, C.K., ...Brubaker J. (2018). Enterotoxigenic *E. coli* virulence gene regulation in human infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115:E8968–E8976. doi: 10.1073/pnas.1808982115.
- Croxen, M.A., Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 2010;8:26–38. doi: 10.1038/nrmicro2265.
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26:822–880. doi: 10.1128/CMR.00022-13.
- Davis, J.A., Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Barrlett, J.B., Brousse, J.H., Gustafson, J., Kucher, M. (2011). Anatomical distribution and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from healthy companion animals. *Journal of Applied Microbiology*, 110:597–604. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04920.x.
- de Almeida, P.M., Arais, L.R., Andrade, J.R.C., Prado, E.H.R.B., Irino, K., Cerqueira, A.D. (2012). Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from dogs. *Veterinary Microbiology*, 158(2012):420–424. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.02.021
- Deborah Chen H., Frankel G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:83–98. doi: 10.1016/j.femsre.2004.07.002.
- Dias, R.C., Tanabe R.H., Vieira M.A., Cergole-Novella, M.C., Dos Santos, L.F., Gomes, T.A., Elias, W.P., Hernandes R.T. (2020). Analysis of the virulence profile and phenotypic features of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolated from diarrheal patients in Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10:144. doi: 10.3389/fcimb.2020.00144.
- Donnenberg, M.S., Finlay, B.B. (2013). Combating enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections: The way forward. *Trends in Microbiology*, 21:317–319. doi: 10.1016/j.tim.2013.05.003.

- Escobar-Paramo, P., Giudicelli, C., Parsot, C., Denamur, E. (2003). The evolutionary history of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* revised. *Journal of Molecular Evolution*, 57:140–148. doi: 10.1007/s00239-003-2460-3.
- EUCAST. (2022). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 12.0.http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf, adresinden erişildi.
- Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., Wieler, L.H. (2012). Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7):646–655. doi:10.1111/1/j.1469-0691.2012.03850.x.
- Ferdous, M., Friedrich, A.W., Grundmann, H., de Boer, R.F., Croughs, P.D., Islam, M.A., Kluytmans-van den Bergh, M.F....Rossen, J.W. (2016). Molecular characterization and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates obtained from two Dutch regions using whole genome sequencing. *Clinical Microbiology and Infection*, 22:642.e1–642.e9.
- Fleckenstein, J.M., Kuhlmann, F.M. (2019). Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. *Current Infectious Disease Reports*, 21:1–9. doi: 10.1007/s11908-019-0665-x.
- French, G. L. (2005). Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1514–1527. doi: 10.1016/j.addr.2005.04.005
- García-Heredia, A., García, S., Merino-Mascorro, J.Á., Feng, P., Heredia, N. (2016). Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Microbiology* 59:124–132. doi: 10.1016/j.fm.2016.06.001.
- Gaytán, M.O., Martínez-Santos V.I., Soto, E., González-Pedrajo, B. (2016). Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6:129. doi: 10.3389/fcimb.2016.00129.
- Gencay, Y. E. (2014). Sheep as an important source of *E. coli* O157/O157: H7 in Turkey. *Veterinary Microbiology*, 172, 590–595. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.06.014.

- Gibson, J.S., Cobbold, R.N., Trott ,D.J. (2010), Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from extraintestinal clinical infections in animals. *Journal of Medical Microbiology*, 59(Pt 5):592–598. doi: 10.1099/jmm.0.018002-0.
- Gomes, T.A., Elias W.P., Scaletsky, I.C., Guth, B.E., Rodrigues, J.F., Piazza, R.M., Ferreira, L.C., Martinez, M.B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47:3–30. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.015.
- Gordon, D.M., Clermont, O., Tolley, H., Denamur, E. (2008). Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*,10: 2484–2496. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x.
- Grave, K., Tanem, H. (2006). Compliance with short-termoral antibacterial drug treatment in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 40:158–162. doi: 10.1111/j.1748-5827.1999.tb03781.x.
- Guerrieri, C.G., Pereira, M.F., Galdino, A.C.M., Santos, A.L.S.D., Elias, W.P., Schuenck, R.P., Spano, L.C. (2019). Typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* are both virulent in the Galleria mellonella model. *Frontiers in Microbiology* 10:1791. doi: 10.3389/fmicb.2019.01791.
- Gunzburg, S.T., Tornieporth, N.G., Riley, L.W. (1995). Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:1375–1377. doi: 10.1128/jcm.33.5.1375-1377.1995.
- Harada, K., Okada, E., Shimizu, T., Kataoka, Y., Sawada, T.,Takahashi, T. (2012). Antimicrobial resistance, virulence profiles, and phylogenetic groups of fecal *Escherichia coli* isolates: acomparative analysis between dogs and their owners in Japan. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35:139–144. doi: 10.1016/j.cimid.2011.12.00.
- Hartland, E.L., Leong, J. (2013). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*: Ecology, pathogenesis, and evolution. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3:15. doi: 10.3389/fcimb.2013.00015.
- Hazen, T.H., Michalski, J., Luo Q., Shetty, A.C., Daugherty, S.C., Fleckenstein, J.M., Rasko, D.A. (2017). Comparative genomics and transcriptomics of *Escherichia coli* isolates

- carrying virulence factors of both enteropathogenic and enterotoxigenic *E. coli*. *Scientific Reports*, 7:1–17. doi: 10.1038/s41598-017-03489-z.
- Hendriks, A.C., Reubsæet „F.A., Kooistra-Smid A.M., Rossen, J.W., Dutilh, B.E., Zomer, A.L., van den Beld, M.J. (2020). Genome-wide association studies of *Shigella* spp. and Enteroinvasive *Escherichia coli* isolates demonstrate an absence of genetic markers for prediction of disease severity. *BMC Genomic*, 21:1–12. doi: 10.1186/s12864-020-6555-7.
- Hernandes, R.T., Elias, W.P., Vieira, M.A., Gomes, T.A. (2009). An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 297:137–149. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x.
- Huang, C.R., Kuo, C.J., Huang, C.W., Chen, Y.T., Liu, B.Y., Lee, C.T., Chen, P.L., Chang, W.T., Chen, Y.W., Lee, T.M. (2021). Host CDK-1 and formin mediate microvillar effacement induced by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 12:1–19. doi: 10.1038/s41467-020-20355-1.
- Jacoby, G. A., Munoz-Price, L. S. (2005). The new beta-lactamases. *The New England Journal of Medicine*, 352, 380–391. Doi: 10.1056/NEJMra041359.
- Javadi, K., Mohebi, S., Motamedifar, M., Hadi, N. (2020). Characterization and antibiotic resistance pattern of diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC), isolated from paediatric diarrhoea in Shiraz, southern Iran. *New Microbes New Infections*, 38:100780. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100780.
- Jenkins, C. (2018). Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 416:27-50. doi: 10.1007/82-2018-105.
- Johnson, J.R., Stell, A.L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 261–272, doi: 10.1086/315217.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2):123–140. doi: 10.1038/nrmicro818.
- Karahutová, L., Mandelík, R., Bujnáková, D. (2021). Antibiotic resistant and biofilm-associated *Escherichia coli* isolates from diarrheic and healthy dogs. *Microorganisms*, 9(6), 1334. doi: 10.3390/microorganisms9061334.

- Karpman, D., Ståhl A.L. (2014). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis and the host response. *Microbiology Spectrum*, 2:2–5. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0009-2013.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia, Lippincott, USA.
- Kumar, P., Kuhlmann, F.M., Chakraborty, S., Bourgeois, A.L., Foulke-Abel, J., Tumala, B., Vickers, T.J., Sack, D.A., DeNearing, B., Harro, C.D. (2018). Enterotoxigenic *Escherichia coli*–blood group A interactions intensify diarrheal severity. *Journal of Clinical Investigation*, 128:3298–3311. doi: 10.1172/JCI97659.
- Kunert Filho, H.C., Carvalho, D., Grassotti, T.T., Soares, B.D., Rossato, J.M., Cunha, A.C., Cavalli, L.S., ... Brito, B.G. (2015). Avian Pathogenic *Escherichia coli* – methods improved diagnosis. *World's Poultry Science Journal*, 71, 249-258. doi: 10.1017/S0043933915000264.
- Lagerqvist, N., Löf, E., Enkirch, T., Nilsson, P., Roth, A., Jernberg, C. (2020). Outbreak of gastroenteritis highlighting the diagnostic and epidemiological challenges of enteroinvasive *Escherichia coli*, County of Halland, Sweden, November 2017. *Eurosurveillance*, 25:1900466. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.1900466.
- Le Bouguéneq, C., Servin, A.L. (2006). Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, 256:185–194. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00144.x.
- Lee, J.G., Han, D.S., Jo, S.V., Lee, A.R., Park, C.H., Eun, C.S., Lee, Y. (2019). Characteristics and pathogenic role of adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease: potential impact on clinical outcomes. *PLoS ONE*, 14(4): e0216165. doi: 10.1371/journal.pone.0216165.
- Leimbach, A., Hacker, J., Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358:3-32.
- Lescat, M., Clermont, O., Woerther, P.L., Glodt, J., Dion, S., Skurnik, D., Djossou, F., Dupont, C., Perroz, G., Picard, B., Catzeflis, F., Andremont, A., Denamur, E. (2013). Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host

- dependant population structure. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1):49-57. doi: 10.1111/j.1758-2229.2012.00374.x.
- Li, F., Cheng, P., Li, X., Liu, R., Liu, H., Zhang, X. (2022). Molecular epidemiology and colistin-resistant mechanism of *mcr*-positive and *mcr*-negative *Escherichia coli* isolated from animal in Sichuan Province, China. *Frontiers in Microbiology*, 13:818548. doi: 10.3389/fmicb.2022.818548.
- Lopez-Saucedo, C., Cema, J.F., Villegas-Sepulveda, N., Thompson, R., Velazquez, F.R., Torres, J., ...Estrada-Garcia, T. (2003). Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 127-131. doi: 10.3201/eid0901.010507.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y, Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbart, S., ...Monnet, D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug resistant and pandrug resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18:268-281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Mainil, J. (2017). *Escherichia coli* virulence factors. 152(1-2): 2-12. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, doi: 10.1016/j.vetimm.2012.09.032.
- Mainil, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152:2–12. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.09.032
- Majowicz, S.E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J.M., Stapleton, J., Angulo, F.J., Yeung, D.H., Kirk, M.D. (2014). Global incidence of human shiga toxin–producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(6):447–455. doi: 10.1089/fpd.2013.1704.
- Maniatis, T., Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, USA.
- Mansan-Almeida, R., Pereira, A.L., Giugliano, L.G. (2013). Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiology*, 13:1–14. doi: 10.1186/1471-2180-13-22.
- Martinez-Medina, M. (2021). Pathogenic *Escherichia coli*: Infections and Therapies. *Antibiotics*, 10, 112. Doi:10.3390/antibiotics10020112.

- Mauro, S.A., Koudelka, G.B. (2011). Shiga toxin: expression, distribution, and its role in the environment. *Toxins*. 3:608–625. doi: 10.3390/toxins3060608.
- Maynard, C., Bekal, S., Sanschagrin, F., Levesque, R.C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., Harel, J. (2004). Heterogeneity among virulence and antimicrobial profiles of extraintestinal *E. coli* isolates of animal and human origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:5444–5452. doi: 10.1128/JCM.42.12.5444-5452.2004.
- McGowan Jr, J. E. (2001). Economic impact of antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 286. doi: 10.3201/eid0702.010228.
- Melton-Celsa, A., Mohawk, K., Teel, L., O'Brien, A. (2011). Ricin and Shiga Toxins. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany:. Pathogenesis of shiga-toxin producing *Escherichia coli*. pp.: 67–103.
- Melton-Celsa, A.R. (2014). Shiga toxin (*Stx*) classification, structure, and function. *Microbiology Spectrum*, 2(4):EHEC-0024-2013, doi: 10.1128/microbiolspec.
- Mirhoseini, A., Amani, J., Nazarian, S. (2018). Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. *Microbial Pathogenesis*. 117:162–169. doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.032.
- Moraes, C.T., Longo, J., Silva, L.B., Pimenta, D.C., Carvalho, E., Morone M.S., da Rós N., Serrano, S.M., Santos, A.C.M., Piazza, R.M. (2020). Surface protein dispersin of enteroaggregative *Escherichia coli* binds plasminogen that is converted into active plasmin. *Frontiers in Microbiology*, 11:1222.
- Morato, E.P., Leomil, L., Beutin, L., Krause, G., Moura, R.A., Pestanade Castro, A.F. (2009). Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. *Zoonoses Public Health*, 56(2009):229–237. doi:10.1111/j.1863-2378.2008.01190.x.
- Mustapha, M., Audu, Y., Ezema, K.U., Abdulkadir, J.U., Lawal, R.R., Balami, A.G., Adamu, L., Bukar-Kolo, Y.M. (2021). Antimicrobial susceptibility profiles of *Escherichia coli* isolates from diarrheic dogs in Maiduguri, Borno State, Nigeria. *Macedonian Veterinary Review*, 44 (1): 47-53. doi:10.2478/macvetrev-2020-0035.
- Nash J.H., Villegas A., Kropinski A.M., Aguilar-Valenzuela R., Konczyk P., Mascarenhas M., Ziebell K., Torres A.G., Karmali M.A., Coombes B.K. (2010). Genome sequence of

adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics*, 11:1–15. doi: 10.1186/1471-2164-11-667.

Ochoa, T.J., Barletta F., Contreras C., Mercado, E. (2008). New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102:852–856. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.03.017.

Pakbin, B., Brück, W., Rossen, J.W.A. (2021). Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 9922. doi: 10.3390/ijms22189922.

Palmela, C., Chevarin, C., Xu Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng S.C., Colombel J.F. (2018). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*, 67:574–587. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314903.

Pasqua, M., Michelacci, V., Di Martino, M.L., Tozzoli, R., Grossi, M., Colonna, B., Morabito, S., Prosseda, G. (2017). The intriguing evolutionary journey of enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward pathogenicity. *Frontiers in Microbiology*, 8:2390. doi: 10.3389/fmicb.2017.02390.

Paton, A.W., Paton, J.C. (1998). Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb0111*, and *rfb0157*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:598–602. doi: 10.1128/JCM.36.2.598-602.1998.

Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J., Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity*, 67:546-553. doi: 10.1128/iai.67.2.546-553.1999.

Picard, B., Sevali Garcia, J., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N.... Bingen, E. (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extra-intestinal infection. *Infection and Immunity*, 67: 546–553. doi: 10.1128/IAI.67.2.546-553.1999.

Pinaud, L., Sansonetti, P.J., Phalipon, A. (2018). Host cell targeting by enteropathogenic bacteria T3SS effectors. *Trends in Microbiology*, 26:266–283. doi: 10.1016/j.tim.2018.01.010.

- Platenkamp, A., Mellies, J.L. (2018). Environment controls LEE regulation in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 9:1694. doi: 10.3389/fmicb.2018.01694.
- Pollock, G.L. (2019). Investigating the molecular mechanisms of enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenesis. University of Melbourne; Melbourne, Australia Ph.D. Thesis.
- Puño-Sarmiento, J., Medeiros, L., Chiconi, C., Martins, F., Pelayo, J., Rocha, S., Blanco, J., Blanco, M., ... Nakazato, G. (2013). Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 166:676–680. doi:10.1016/j.vetmicro.2013.07.007.
- Rasko D.A., Del Canto F., Luo Q., Fleckenstein J.M., Vidal R., Hazen T.H. (2019). Comparative genomic analysis and molecular examination of the diversity of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from Chile. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13:e0007828. doi: 10.1371/journal.pntd.0007828.
- Rogawski E.T., Guerrant R.L., Havt A., Lima I.F., Medeiros P.H., Seidman J.C., McCormick B.J., ... Bodhidatta L. (2017). Epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11:e0005798. doi: 10.1371/journal.pntd.0005798.
- Ruano-Gallego, D., Sanchez-Garrido, J., Kozik, Z., Núñez-Berruero, E., Cepeda-Molero, M., Mullineaux-Sanders, C., Clark, J.N.-B., Slater, S.L., Wagner, N., Glegola-Madejska I. (2021). Type III secretion system effectors form robust and flexible intracellular virulence networks. *Science*, 371:6534. doi: 10.1126/science.abc9531
- Sancak, A., Rutgers, H., Hart, C., Batt, R. (2004). Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. *Veterinary Record*, 24;154(4):101-6. doi: 10.1136/vr.154.4.101.
- Schierack, P., Romer, A., Jores, J., Kaspar, H., Guenther, S., Filter, M., Eichberg, J., Wieler, L.H. (2009). Isolation and characterization of intestinal *Escherichia coli* clones from wild boars in Germany. *Applied and Environmental Microbiology*. 75:695-702. doi: 10.1128/AEM.01650-08

- Schwidder, M., Heinisch, L., Schmidt, H. (2019). Genetics, toxicity, and distribution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin. *Toxins*, 11:502. doi: 10.3390/toxins11090502.
- Serapio-Palacios, A., Finlay, B.B. (2020). Dynamics of expression, secretion and translocation of type III effectors during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Current Opinion in Microbiology*, 54:67–76. doi: 10.1016/j.mib.2019.12.001.
- Shaler, C.R., Elhenawy, W., Coombes, B.K. (2019). The unique lifestyle of Crohn’s disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 431:2970–2981. doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.023.
- Sharma, S., Bhat, G. K., Shenoy, S. (2007). Virulence factors and drug resistance in *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 25, 369–373. doi: 10.4103/0255-0857.37341
- Shulman, S.T., Friedmann, H.C., Sims, R.H. (2007). Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clinical Infectious Diseases*, 45(8):1025-1029.
- Singh, B. N., Singh, H. B., Singh, A., Singh, B. R., Mishra, A., Nautiyal, C. S. (2012). Lagerstroemia speciosa fruit extract modulates quorum sensing controlled virulence factor production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 158, 529–538. doi: 10.1099/mic.0.052985-0.
- Slater, S.L., Sågfors, A.M., Pollard, D.J., Ruano-Gallego, D., Frankel, G. (2018). *Escherichia coli, a Versatile Pathogen*. Volume 416. Springer; Cham, Switzerland: The type III secretion system of pathogenic *Escherichia coli*; pp. 51–72. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. doi: 10.1007/82_2018_116.
- Smith, J.L., Fratamico, P.M., Gunther, N.W. (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4:134-163. doi: 10.1089/fpd.2007.0087.
- Smith, J.L., Fratamico, P.M., Gunther, N.W. (2014). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Advances in Applied Microbiology*, 86:145–197. doi: 10.1016/B978-0-12-800262-9.00003-2.
- Stacy-Phipps, S., Mecca, J.J., Weiss, J.B. (1995). Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA

- during the course of infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:1054–1059. doi: 10.1128/jcm.33.5.1054-1059.1995.
- Suvarna, K., Stevenson, D., Meganathan, R., Hudspeth, M.E.S. (1998). Menaquinone (vitamin K₂) biosynthesis: localization and characterization of the menA gene from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180, 2782–2787. doi: 10.1128/jb.180.10.2782-2787.1998.
- Swift, J. M., Foster, D. M., Rogers, A. T., Sylvester, H. J., Griffith, E. H., Jacob, M. E. (2017). Efficacy of an *Escherichia coli* O157: H7 SRP vaccine in orally challenged goats and strain persistence over time. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14, 160–166. doi: 10.1089/fpd.2016.2213.
- Szmlka, A., Anjum, M. F., La Ragione, R. M., Kaszanyitzky, É. J., Nagy, B. (2012). Microarray based comparative genotyping of gentamicin resistant *Escherichia coli* strains from food animals and humans. *Veterinary Microbiology*, 156, 110–118. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.09.030.
- Tareen, A. M., Samad, A., Mustafa, M. Z., Maryam, M., Rizwan, S., Akbar, A. (2022). Immunogenic protein profiling of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from infants with diarrhea in Quetta Balochistan. *Journal of King Saud University-Science*, 34, 101883. doi: 10.1016/j.jksus.2022.101883.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8:207–217. doi:10.1038/nrmicro2298.
- Tomazi, T., Coura, F.M., Gonçalves, J.L., Heinemann, M.B., Santos, M.V. (2018). Antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from bovine clinical mastitis. *Journal of Dairy Sciences*, 101:9406–9418. doi: 10.3168/jds.2018-14485.
- Torkan, S., Bahadoranian, M.A., Khamesipour, F., Anyanwu, M.U. (2016). Detection of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic dogs in Iran. *Archivos De Medicina Veterinaria*, 48:181–190. doi: 10.4067/S0301 - 732X2 0160002000 08.
- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D., White, M.R.H. (2004). *Moleküler Biyoloji Önemli Notlar*. Nobel Yayınları.

- Turunen K., Antikainen J., Lääveri T., Kirveskari J., Svennerholm A.-M., Kantele A. (2020). Clinical aspects of heat-labile and heat-stable toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli*: A prospective study among Finnish travellers. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 38:101855. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101855.
- Van den Beld, M., Reubsaet F. (2012). Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 31:899–904. doi: 10.1007/s10096-011-1395-7.
- van den Beld, M.J., Warmelink, E., Friedrich, A.W., Reubsaet ,F.A., Schipper, M., de Boer, R.F., Notermans, D.W., ...Rossen J.W. (2019). Incidence, clinical implications and impact on public health of infections with *Shigella* spp. and entero-invasive *Escherichia coli* (EIEC): Results of a multicenter cross-sectional study in the Netherlands during 2016–2017. *BMC Infectious Diseases*, 19:1–12. doi: 10.1186/s12879-019-4659-y.
- van Hoek, A.H., van Veldhuizen, J.N., Friesema, I., Coipan, C., Rossen, J.W., Bergval, I.L., Franz E. (2019). Comparative genomics reveals a lack of evidence for pigeons as a main source of stx 2f-carrying *Escherichia coli* causing disease in humans and the common existence of hybrid Shiga toxin-producing and enteropathogenic *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics*, 20:271. doi: 10.1186/s12864-019-5635-z.
- Vega-Manriquez, X. D., Ubiarco-Lopez, A., Verdugo-Rodriguez, A., Hernandez-Chinas, U., Navarro-Ocana, A., Ahumada-Cota, R. E., Ramirez-Badillo, D., ...Eslava, C. A. (2020). Pet dogs potential transmitters of pathogenic *Escherichia coli* with resistance to antimicrobials. *Archives of Microbiology* 202:1173–1179. doi: 10.1007/s00203-020-01828-9.
- Walczuk, U., Sobieszczńska, B., Turniak ,M., Rzeszutko, M., Duda-Madej, A., Iwańczak, B. (2019). The prevalence of mucosa-associated diffusely adherent *Escherichia coli* in children with inflammatory bowel disease. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 28:899–905.
- Walk, S.T., Alm, E.W., Gordon, D.M., Ram, J.L., Toranzos, G.A., Tiedje, J.M., Whittam, T.S. (2009). Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 6534–6544. doi: 10.1128/AEM.01262-09.

- Wang, H., Zhong, Z., Luo, Y., Cox, E., Devriendt, B. (2019). Heat-stable enterotoxins of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their impact on host immunity. *Toxins*, 11:24. doi: 10.3390/toxins11010024.
- Warr, A.R., Kuehl, C.J., Waldor, M.K. (2021). Shiga toxin remodels the intestinal epithelial transcriptional response to enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens*, 17:e1009290. doi: 10.1371/journal.ppat.1009290.
- Welinder-Olsson, C., Kaijser, B. (2005). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) *Scand Journal of Infectious Diseases*, 37:405–416. doi: 10.1080/00365540510038523.
- Wetzel, A.N., LeJeune, J.T. (2006). Clonal dissemination of *Escherichia coli* O157: H7 subtypes among dairy farms in northeast Ohio. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2621–2626. doi: 10.1128/AEM.72.4.2621-2626.2006.
- WHO. (2004). Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: scientific assessment: Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68883>.
- Xu, Y., Bai, X., Jin, Y., Hu, B., Wang, H., Sun, H., Fan, R., Fu, S., Xiong Y. (2017). High prevalence of virulence genes in specific genotypes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7:109. doi: 10.3389/fcimb.2017.00109.
- Yaghoubi, S., Zekiy, A.O., Krutova, M., Gholami, M., Kouhsari, E., Sholeh, M., Ghafouri, Z., Maleki, F. (2022). Tigecycline antibacterial activity, clinical effectiveness, and mechanisms and epidemiology of resistance: narrative review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 41(7): 1003–1022. doi: 10.1007/s10096-020-04121-1.
- Yasir, M., Icke, C., Abdelwahab, R., Haycocks, J.R., Godfrey, R.E., Sazinas P., Pallen, M.J., ... Browning D.F. (2019). Organization and architecture of AggR-dependent promoters from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 111:534–551. doi: 10.1111/mmi.14172.
- Younis, K., Baddour, M., Ibrahim, M.S. (2015). Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in pet animals and its antibiotic resistance in Alexandria Governorate. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 45:113-118. doi: 10.5455/ajvs.181517.

- Zarea, Z. Z., EL-Demerdash, G.O., El Shafei, A.A. , Elkader, S.A. (2020). Occurrence of *Escherichia coli* as a causative agent of enteritis in dogs with special reference to their multidrug resistance and virulence genes. *Journal of Animal Health and Production*, 9(1): 7-13. doi: 10.17582/journal.jahp/2021/9.s1.7.13.
- Zheng, W., Peña, A., Ilangovan, A., Clark, J.N.B., Frankel, G., Egelman, E.H., Costa, T.R. (2021). Cryoelectron-microscopy structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system *EspA* filament. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118:e2022826118. doi: 10.1073/pnas.2022826118.
- Zlatkov, N. (2019). Regulatory mechanisms involved in the pathoadaptation of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Umeaa University*. The Laboratory for Molecular Infection Medicine, Department of Molecular Biology, Umea, Sweden.

EKLER



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(AYDIN ADÜ-HADYEK)



Aydın 18/05/2023

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2023 Yılı V. Oturum
Sayı : 64583101/2023/76
Proje Başlığı : İshalli köpeklerden elde edilen *Escherichia coli* izolatlarının patotipik ve filogenetik özelliklerinin incelenmesi
Proje Yürütücüsü : Süheyla TÜRKYILMAZ
Proje Ekibi : Abdullah SERBEST

Hayvan Çalışması

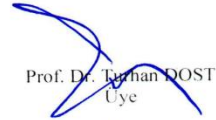
Bu çalışmanın hiçbir bölümünde
İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

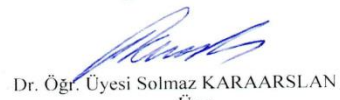

Prof. Dr. Murat SARIERLER
Başkan

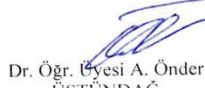

Prof. Dr. M. Dinçer BİLGE
Başkan Yardımcısı

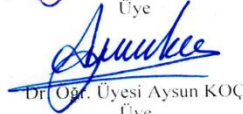

Prof. Dr. Tughan DOST
Üye



Prof. Dr. Işıl SÖNMEZ
Üye


Prof. Dr. Serkan BAKIRCI
Üye


Dr. Öğr. Üyesi Solmaz KARAARSLAN
Üye


Dr. Öğr. Üyesi A. Önder
ÜSTÜNDAĞ
Üye


Dr. Öğr. Üyesi Aysun KOÇ
Üye


Dr. Öğr. Üyesi Asude Gülce ORYAŞIN
Sor. Vet. Hek.
Üye


Hüseyin YAMAN
Serbest Vet. Hek. Üye


Öğr. Gör. Dr. Mehmet ÖZLERK
AYDIN
Sor. Vet. Hek. Üye


Şenay TEKİNBAŞ
HAYTAP Üye.

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“İshalli köpeklerden elde edilen *Escherichia coli* izolatlarının patotipik ve filogenetik özelliklerinin incelenmesi” başlıklı Yüksek Lisans/Doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

.....

Abdullah SERBEST

... / ... / ...

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı

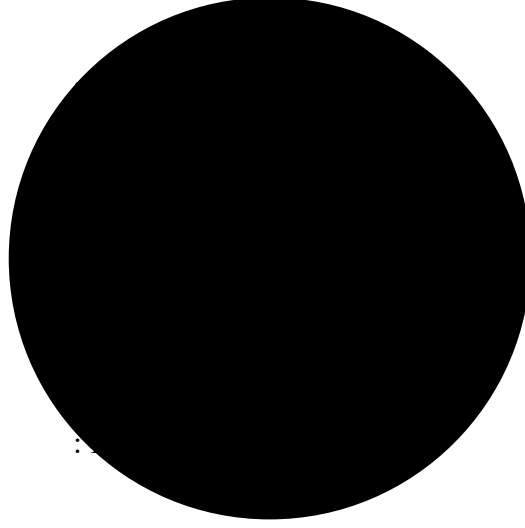
Uyruk

Doğum yeri ve tarihi

Telefon

E-posta

Yabancı dil



EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora
Y. Lisans	Aydın Adnan Menders Üniversitesi	22. 01. 2024
Lisans	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2006

BURSLAR ve ÖDÜLLER

....

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2014-2024	Bayrampaşa Veteriner Kliniği (İstanbul)	Veteriner Hekim

AKADEMİK YAYINLAR

....

1. MAKALELER

....

2. PROJELER

Türkyılmaz, S., Serbest, A. (2024). İshalli köpeklerden elde edilen *Escherichia coli* izolatlarının patotipik ve filogenetik özelliklerinin incelenmesi". ADÜ BAP (Proje No: VTF 23037)

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

....

B) Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

....