

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**BROYLERDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERİCHİA***  
***COLI*'LERİN ÖNEMLİ VIRULANS GENLERİNİN VE**  
**ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN İNCELENMESİ**

**AYHAN İLÇEBAYLIK**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-19006 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2020**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Ayhan İLÇEBAYLIK tarafından hazırlanan “Broylerden İzole Edilen *Escherichia coli*'lerin Önemli Virulans Genlerinin ve Antibiyotik Direncinin İncelenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/01/2020

Üye : Prof. Dr. Şükrü KIRKAN Aydın Adnan Menderes Üniversitesi .....

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

Üye : Dr. Öğr. Üy. Fulya OCAK Manisa Celal Bayar 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. Cavit KUM  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen çalışmam esnasında katkılarını gördüğüm Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, Araş. Gör. Dr. Tuğba YÜKSEL'e, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı' Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi ve aynı zamanda Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Merkezi (REDPROM) Müdürü Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, bana yaşamım boyunca destek olan annelerim Emine İLÇEBAYLIK ve Filiz YILDIZ'a, babalarım Vezir İLÇEBAYLIK ve Yavuz YILDIZ'a, çok değerli eşim Yeliz ve değerli kızım Zeynep'e ve her konuda hoşgörüsünü esirgemeyen sayın müdürüm Hasan Basri ÖZDEMİR'e teşekkürü bir borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI .....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
RESİMLER DİZİNİ .....	ix
TABLolar DİZİNİ .....	x
ÖZET .....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İnsan Patojenik <i>E. coli</i> .....	3
2.2. <i>E. coli</i> Patotipleri.....	4
2.3. Kanatlı Patojenik <i>E. coli</i> (APEC).....	5
2.4. APEC’de Enfeksiyon Modeli .....	8
2.5. APEC ve Gıda Güvenliği .....	8
2.6. APEC’nin Yayılımı.....	9
2.7. APEC’nin Virülens İle İlişkili Genleri.....	10
2.8. Virülens ile İlişkili Genleri Belirleme Yöntemleri: Karşılaştırmalı Genom.....	17
2.9. Patojenik <i>E. coli</i> ’nin Tanımlama Yöntemleri .....	18
2.9.1. Konvansiyonel Yöntemler.....	18
2.9.2. Serotiplendirme.....	19
2.9.3. Moleküler Tanımlama.....	20
2.9.4. Diğer Faydalı Teknikler.....	21
2.10. Klonal İlişki ve Patojen Klon Tespiti .....	21
2.11. Kanatlı Hayvan Endüstrisinde Kolibasillozun Etkisi. ....	22
2.12. Antibiyotikler: Ünlü Keşiflerden Uygulanan Kısıtlamalara.....	23
2.12.1. Antibiyotik Direnci: Mekanizmalar ve Kökenleri.....	23
2.12.2. Kullanılan Antibiyotikler ve Gelişen Direnç.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	28

3.1. Gereç .....	28
3.1.1. Cihazlar .....	28
3.1.1. İzolasyon Materyali.....	28
3.1.2. Referans Suşlar .....	28
3.1.3. Besiyerleri.....	28
3.1.3.1. MacConkey agar.....	29
3.1.3.2. Eosine methylene blue agar.....	29
3.1.3.3. Mueller hinton agar.....	29
3.1.3.4. Nutrient broth .....	29
3.1.3.5. Brain hearth infusion broth.....	30
3.1.4. Ayıraç ve Boyalar.....	30
3.1.4.1. Oksidaz ayıracı.....	30
3.1.4.2. Gram boyama seti .....	30
3.1.4.3. %3'lük Hidrojen Peroksit.....	30
3.1.5. Antibiyotik Diskleri .....	31
3.1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	31
3.1.6.1. Solusyon ve boyalar.....	31
3.1.6.1.1. Fosfat tamponu.....	31
3.1.6.1.2. Tris, borik asit, EDTA.....	31
3.1.6.1.3. Yükleme tamponu.....	32
3.1.6.1.5. Primerler.....	32
3.1.6.1.6. Kullanılan cihazlar.....	33
3.1.6.1.7. Agaroz jel.....	34
3.1.6.1.8. Elektroforez.....	34
3.1.6.1.9. Görüntüleme.....	34
3.1.6.1.10. Marker.....	34
3.2. Yöntem.....	35
3.2. 1. Bakteri İzolasyon ve İdentifikasyonu.....	35
3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	35
3.2.3. DNA İzolasyonu, Saflık Kontrolleri ve Miktar Tayinleri .....	36
3.2.4. PZR.....	37
3.2.5. APEC Değerlendirme Kriterleri.....	38
3.2.6. İstatistiksel Analiz.....	38

4. BULGULAR .....	39
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon.....	39
4.1.1. Fenotipik.....	39
4.1.2. Genotipik.....	39
4.2. Virülens Genotiplendirme.....	40
4.3. İstatistiksel Analiz.....	43
4.4. Antibiyotik Dirençlilik.....	45
4.1. APEC, cAPEC ve pAPEC İzolatlarında Çoklu Antibiyotik Dirençlilik Durumlarının Karşılaştırılması.....	46
5. TARTIŞMA .....	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	53
KAYNAKLAR .....	55
ÖZGEÇMİŞ .....	69

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AIEC</b>	: Aderantinvasiv <i>E. coli</i>
<b>AML</b>	: Amoksisilin Klavulanik Asit
<b>APEC</b>	: Kanatlı Patojenik <i>E. coli</i>
<b>AX</b>	: Amoksisilin
<b>CIP</b>	: Siprofloksasin
<b>CL</b>	: Sefaleksim
<b>CN</b>	: Gentamisin
<b>colV</b>	: Kolisin V Operon Yapısal Geni
<b>CRD</b>	: Kronik Solunum Sistemi Hastalığı
<b>DAEC</b>	: Diffuzaderant <i>E. coli</i>
<b>DEC</b>	: Diyarejenik <i>E. coli</i>
<b>DO</b>	: Doksisiklin
<b>EAEC</b>	: Enteroagregatif <i>E. coli</i>
<b>EHEC</b>	: Enterohemorajik <i>E. coli</i>
<b>EIEC</b>	: Enteroinvasiv <i>E. coli</i>
<b>EnPEC</b>	: Endometrial Patojenik <i>E. coli</i>
<b>EPEC</b>	: Enteropatojenik <i>E. coli</i>
<b>ERIC</b>	: Ekstragenik Palindromik Amplifikasyon
<b>ETEC</b>	: Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
<b>ExPEC</b>	: Ekstraintestinal Patojenik <i>E. coli</i>
<b>FF</b>	: Florfenikol
<b>FOS</b>	: Fosfomisin
<b>hylF</b>	: Hemolizin F geni
<b>iroN</b>	: Siderofor Reseptörü Geni
<b>iss</b>	: Serumda Sağkalım Geni
<b>iucD</b>	: Demir Elde Etme Sistem Geni
<b>iutA</b>	: Demir Reseptörü Geni
<b>İYE</b>	: İdrar Yolu Enfeksiyonları
<b>MDR</b>	: Çok İlaça Dirençli
<b>MLEE</b>	: Multi Locus Enzim Elektroforezi

<b>MPEC</b>	: Meme Patojenik <i>E. coli</i>
<b>NMEC</b>	: Menejiti İle İlgili <i>E. coli</i>
<b>ompT</b>	: Dış Membran Proteaz Geni
<b>papC</b>	: Piyelonefrit İle İlişkili Pilus
<b>PDR</b>	: Tüm İlaçlara Dirençli
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>REP</b>	: Ekstragenik Palindromik Amplifikasyon
<b>SCOTS</b>	: Kopyalanan Dizilerin Seçici Yakalanması
<b>SePEC</b>	: Sepsisle İlgili Patojenik <i>E. coli</i>
<b>SHS</b>	: Şiş Kafa Sendromu
<b>STEAEC</b>	: Shigatoksijenik Enteroagregatif <i>E. coli</i>
<b>STM</b>	: Transpozon Mutagenезisi
<b>SXT</b>	: Trimetoprim Sulfametoksazol
<b>tsh</b>	: Sıcaklığa Duyarlı Hemaglutinin Geni
<b>UPEC</b>	: Üropatojenik <i>E. coli</i>
<b>uspA</b>	: Üniversal Stres Protein Geni
<b>VAG</b>	: Virülens İle İlişkili Genler
<b>vatA</b>	: Isıya Dayanıklı Enterotoksin-1 Geni
<b>VG</b>	: Virülend Gen
<b>XDR</b>	: İlaça Aşırı Dirençli
<b><math>\chi^2</math></b>	: Ki-Kare



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b>	a) <i>E. coli</i> grupları ve ilişki patotipleri b) Patojenik <i>E. coli</i> 'lerin patotip ve alttipleri.....	5
<b>Şekil 2.</b>	MDR, XDR ve PDR arasındaki ilişki.....	27
<b>Şekil 3.</b>	APEC, cAPEC ve pEPEC izolatlarının virülens gen dağılımlarının karşılaştırılması.....	42
<b>Şekil 4.</b>	APEC, cAPEC ve pAPEC izolatlarının antibiyotik direnç oranları.....	46
<b>Şekil 5.</b>	APEC, cAPEC ve pAPEC izolatlarının antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması.....	47

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b>	APEC suşlarının neden olduğu kollibasillozdan ölen bir tavukda iç organların patomorfolojik değişiklikler.....	6
<b>Resim 2.</b>	<b>a.</b> EMB agarda karakteristik yeşil metalik parlaklık gösteren ve <b>b.</b> MacConkey agar'da laktoz fermentasyonu pozitif <i>E. coli</i> izolatları.	38
<b>Resim 3.</b>	<i>E. coli</i> izolatlarının jel elektroforez görüntüsü.....	40
<b>Resim 4.</b>	APEC virülens genlerinin jel elektroforez görüntüsü.....	40

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b>	Patojenik <i>E. coli</i> 'nin virülens belirleyicileri.....	4
<b>Tablo 2.</b>	APEC izolatlarının virülensle ilgili genlerinin fonksiyonu ve yerleşimi.	17
<b>Tablo 3.</b>	Primerler sekansları, ürün uzunlukları, kaynakları.....	33
<b>Tablo 4.</b>	Antibiyotikler, disk içerikleri, etki mekanizmaları ve değerlendirme kriterleri.....	36
<b>Tablo 5.</b>	Mastermiksin hazırlanma oranları.....	37
<b>Tablo 6.</b>	İzolatların içerdikleri virülens gen sayıları ve değerlendirme.....	41
<b>Tablo 7.</b>	APEC, cAPEC ve pAPEC izolatlarının virülens gen dağılımları.....	42
<b>Tablo 8.</b>	APEC izolatlarının virülens gen profilleri.....	43
<b>Tablo 9.</b>	pAPEC izolatlarının virülens gen profilleri.....	44
<b>Tablo 10.</b>	APEC, cAPEC ve pAPEC izolatlarında virülens gen dağılımının karşılaştırılması.....	45
<b>Tablo 11.</b>	Tüm izolatların antibiyotiklere duyarlılık ve direnç durumları.....	46
<b>Tablo 12.</b>	APEC, cAPEC ve pAPEC izolatlarının antibiyotik dirençlilik durumlarının karşılaştırılması.....	47

## ÖZET

### BROYLERDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERİCHIA COLI*'LERİN ÖNEMLİ VİRÜLANS GENLERİNİN VE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN İNCELENMESİ

İlçebaylık, A. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019.

Kanatlı patojenik *Escherichia coli* (APEC)'nin neden olduğu kolibasilozis, *E. coli*'nin konakçıda yapışmasını ve çoğalmasını teşvik eden spesifik genler tarafından kodlanan virülens faktörleri bulunduğu meydana gelir. Bu çalışmada, broyler iç organlarından elde edilen APEC izolatlarında sideroforları (*iucD*, *iroN*, *iutA*), toksinleri (*astA*, *vatA*, *hlyF*), adezinleri (*papC*, *tsh*), serum direncini (*iss*, *ompT*) ve kolisini (*colV*) kodlayan virülens gen (VG) varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile ve izolatların antibiyotik dirençlerinin disk difüzyon yöntemi ile incelenmesi amaçlandı. En az beş VG taşıyan izolatlar klinik APEC (cAPEC) daha az VG taşıyanlar potansiyel APEC (pAPEC) ve en az üç veya daha fazla antimikrobiyal madde sınıfına dirençli olanlar çoklu antibiyotiğe dirençli (MDR) olarak değerlendirildi. cAPEC ve pAPEC arasındaki VG sıklığını karşılaştırmak için Ki-Kare ( $\chi^2$ ) testi kullanıldı ve  $\chi^2$  testinde  $P \leq 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi. Yüz yetmiş üç broylerden 140 (%80,1) APEC izole edildi. Çalışmanın sonunda 140 izolattan 86'sının (%61,4) cAPEC, 54'ünün (% 38,6) pAPEC olduğu ve bu izolatların 47 virülans genotipi taşıyordığı saptandı. *iss* (%78.6), *iutA* (%75.7), *iroN* (%68.6), *hlyF* (%61.4), *ompT* (%60.0) genleri en yüksek oranda tespit edilen genlerdi. Araştırılan diğer genler ise; *iucD* (%40.0), *tsh* (%27.1), *colV* (%25.7), *papC* (%21.4), *vatA* (%8.6), *astA* (%4.3) daha düşük sıklıklarda saptandı.  $\chi^2$  testi, tüm virülans genlerinin cAPEC ve pAPEC suşları arasındaki dağılımının önemli olduğunu gösterdi. Tüm izolatların, amoksisilin, trimetoprim sülfametoksazol, amoksisilin klavulanik asit ve siprofloksasine karşı yüksek düzeyde direnç gösterdiği bulundu. Birden fazla demir taşıma sistemine sahip olmanın APEC sağkalımı üzerinde önemli bir rol oynadığı, virülans genlerinin PZR yöntemiyle incelenmesinin patojenite testi yapmaktan daha pratik olduğu ve virülans genotiplerinin karakterize edildiği VG bazlı teşhis yöntemlerinin geliştirilmesinin gelecekteki aşı çalışmaları için faydalı olabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyotik direnci, broyler, *Escherichia coli*, virülens gen.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE IMPORTANT VIRULENCE GENES AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *ESCHERICHIA COLI*'S ISOLATED FROM BROILER

İlçebaylık, A. Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Microbiology Program, M.Sc. Thesis, Aydın, 2019.

Colibacillosis induced by poultry pathogenic *Escherichia coli* (APEC) occurs when virulence factors that are encoded by specific genes that promote adhesion and proliferation of *E. coli* in the host. The aim of this study was to investigate the virulence genes encoding siderophores (*iucD*, *iroN*, *iutA*), toxins (*astA*, *vatA*, *hlyF*), adhesins (*papC*, *tsh*), serum resistance (*iss*, *ompT*) and colicin (*colV*) APECs isolated from broiler internal organs by polymerase chain reaction (PCR) and antibiotic resistance of isolates by disc diffusion method. The isolates carrying at least five VG were clinical APEC (cAPEC), whereas those carrying less VG were potentially APEC (pAPEC) and isolates resistant to at least three or more classes of antimicrobial agents were evaluated as multiple antibiotic resistant (MDR). Chi-Square ( $\chi^2$ ) test was used to compare the frequency of VGs between cAPEC and pAPEC,  $P \leq 0.05$  was considered as significant. A hundred forty (80.1%) APEC were isolated from 173 broilers. At the end of the study, 86 (61.4%) of the 140 isolates were cAPEC, 54 (38.6%) were pAPEC and these isolates had 47 virulence genotypes. *iss* (78.6%), *iutA* (75.7%), *iroN* (68.6%), *hlyF* (61.4%), *ompT* (60.0%) genes were the highest detected genes. Other genes investigated; *iucD* (40.0%), *tsh* (27.1%), *colV* (25.7%), *papC* (21.4%), *vatA* (8.6%), *astA* (4.3%) were detected at lower frequencies. The  $\chi^2$  test showed that the distribution of all virulence genes between cAPEC and pAPEC strains was important. All isolates were found to be high level resistant to amoxicillin, trimethoprim sulfamethoxazole, amoxicillin clavulanic acid and ciprofloxacin and 90.0% had MDR. It was concluded that having more than one iron transport system plays an important role on APEC survival, the examination of virulence genes by PCR method is more practical than pathogenicity test and development of VG-based diagnostic methods that characterize virulence genotypes may be useful for future vaccine studies.

**Keywords:** Antibiotic resistance, broiler, *Escherichia coli*, virulence gene.