

1. GİRİŞ

Ekstraintestinal patojenik *E. coli*'nin (ExPEC) bir alt grubu olan Kanatlı Patojenik *Escherichia coli* (APEC), solunum ve genital yollar dâhil olmak üzere farklı yollardan kanatlı vücuduna girerek tavuklarda kolibasilozis olarak adlandırılan tavuk endüstrisinde yıllık milyonlarca dolar kayba sebep olan çeşitli ekstraintestinal hastalıklara neden olur (Nolan ve ark, 2013). Kolibasilozis, sadece APEC olarak bilinen *E. coli*'nin patojenik suşları ile enfekte olan kuşlarda görülür Bazı intestinal kommensal *E. coli* suşlarının patojenite kazanarak ekstraintestinal bölgeyi enfekte ederek APEC haline gelmesi pek çok virülens faktörünü kazanmasının bir sonucudur (Schouler ve ark, 2012).

E. coli'de patojenitesinden sorumlu pek çok virülens faktörü bulunmakta ve *E. coli* suşlarının enfeksiyon yeteneği, virülensla ilişkili genler (VAG) tarafından kodlanan çok çeşitli virülens faktörleri tarafından kolaylaştırılmaktadır. Adezinler (*papC*, *tsh*), demir alma sistemleri (*iucD*, *iroN*, *iutA*), kolisinler (*colV*), toksinler (*astA*, *vatA*), serumda sağ kalım (*iss*, *ompT*) konak savunmasına karşı kolonizasyon, adhezyon, invazyon ve sağkalımda rol oynarlar (Schouler ve ark, 2012; Johnson ve Nolan 2012). Bir bakterinin virülens faktörlerinin incelenmesindeki amaç, bu bakterinin neden olduğu hastalığı önlemek için özgün anti virülens mekanizmalarını geliştirmektir. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda APEC'lerin virülens faktörleri incelenmiş ve APEC izolatlarının patojenitesi incelenen virülens özellikleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir (Rodriguez-Siek ve ark, 2005; Johnson ve ark, 2008).

APEC izolatlarının antimikrobiyal ajanlara daha dirençli hale geldiğine dair kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır (Johnson ve ark, 2005) ve bu da gelecekte kolibasilozun kontrolünün daha da sorunlu hale geleceğini göstermektedir. Sonuç olarak, uygun koşullar olduğunda, kolibasilozun aşı temelli kontrolünün giderek daha arzu edilir hale gelmesi muhtemeldir. Ne yazık ki, kanatlı kolibasilozisini önlemek için geliştirilen aşuların kullanılması sonucu farklı sonuçlarla karşılaşmıştır. Çeşitli APEC izolatlarına karşı aşular üretilmesine rağmen (Bolin ve Jensen, 1987), bazıları sadece homolog uygulamalar sonrasında etkili olduklarını kanıtlamıştır (Peighambari ve ark, 2002). Bu tip aşı başarısızlığı, genellikle APEC popülasyonlarının çeşitliliği nedeniyle, kolibasiloz kontrolünde kritik bir engeldir (Rodriguez-Siek, 2005a; Rodriguez-Siek, 2005b). Bu çeşitliliğe rağmen, APEC patotipini tanımlamaya yönelik son çalışmalar APEC izolatlarının çoğunun, nispeten az sayıda kanatlı komensal *E. coli* (AFEC) izolatında ortaya çıkan; yüksek oranda korunmuş

plazmid ile ilişkili virülens genleri kümesini içerdiğini göstermiştir (Johnson, ve ark, 2006; Rodriguez-Siek, 2005b). Bu nedenle, gelecekte kolibasiloz kontrolünde bu plazmid özelliklerinin ya da diğer sıkça görülen APEC belirleyicilerinin, saptanmasının yaygın olarak kullanılacağı düşünülmektedir.

Hastalıklar nedeni ile oluşan ekonomik zararlar ölüm ve büyüme geriliği diğeri ise sağaltım masraflarıdır. Bununla birlikte tedavi maksadı ile antibiyotiklerin kalıntı bırakması ve bu durumun insan sağlığını olumsuz etkilemesi de günümüzde artık önemli olan bir problemdir. Antimikrobiyal tedavi, APEC enfeksiyonlarının neden olduğu morbidite ve mortaliteyi azaltmak için en önemli kontrol önlemlerinden birisidir. Antimikrobiyallerin uygun olmayan kullanımları dirençli izolatların seçimine yol açtığından, hem hayvanlarda hem de insanlarda terapötik faydalarını korumak için dikkatli bir şekilde kullanılmaları gerekir (Gyles, 2008).

Kolibasillozis, enfekte eden suş olan *E. coli*'nin, konakçıda adezyon ve çoğalmasına imkan veren spesifik genler tarafından kodlanan virülens faktörleri ortaya çıktığında görülür. APEC izolatlarının karakterizasyonu, kolibasillozisin patogenezi anlamak ve hastalık için etkili önleme ve kontrol stratejilerine ulaşmak için gereklidir (Lutful Kabir, 2010). APEC izolatlarını tanımlamak için tanısal stratejiler *E. coli*'nin çeşitli virülens genlerinin saptanmasına dayanmıştır (Schouler ve ark, 2012). Yurdumuzda APEC ve bunların sahip oldukları virülens faktörlerinin belirlenmesi amacı ile az sayıda çalışma yapılmıştır ve APEC izolatlarının virülens genotipleri hakkında spesifik bilgi bulunmamaktadır. Bu durumda kolibasillozisin kontrol çalışmalarının başarısını da tahmin etmek de zordur. Bu çalışmada, kolibasillozis şüpheli broyler iç organlarından elde edilen APEC izolatlarında sideroforları (*iucD*, *iroN*, *iutA*), toksinleri (*astA*, *vatA*, *hlyF*), adezinleri (*papC*, *tsh*), kolisin (*colV*) ve serum direncini (*iss*, *ompT*) kodlayan toplam 11 geninin varlığı ve bu izolatların antibiyotik direnç durumlarının incelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

Escherichia coli *Enterobacteriaceae* familyasına ait çomak şeklinde, Gram negatif, fakültatif bir anaerobik bakteri olup çok çeşitli yüzeylerde yaşayabilmektedir. *E. coli*, aerobik veya anaerobik solunum yapabilmekle birlikte anaerobik koşullarda, laktat, süksinat, etanol, asetat ve karbondioksit üreten karışık asit fermantasyonunu kullanmaktadır. Çoğu *E. coli* suşunun en uygun üremesi 37°C'de aerobik koşullarda meydana gelmekle birlikte bazı istisnai suşlar 49°C'ye kadar olan sıcaklıklarda üreyebilmektedir. *E. coli* suşları flagellaya sahiptir ve dolayısıyla hareketli bakteri olarak sınıflandırılmaktadır (Nolan ve ark, 2013).

E. coli bakterilerinin ortalama genom büyüklüğü 4000'den fazla protein kodlayan gen içeren 4.6×10^6 baz çiftidir. *E. coli*, DNA'sını mevcut bir popülasyonda genetik materyalin yatay olarak yayılmasını sağlayan bakteriyel konjugasyon, transdüksiyon veya transformasyon yoluyla aktarabilir (Nolan ve ark, 2013). *E. coli* genellikle çoğu sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal sisteminde kolonize olur (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999). *E. coli* suşlarının çoğu, bağırsakta patojenik bakteri oluşumunu önleyen rekabetçi bir inhibitör görevi gören K2 vitamini ürettikleri için normal bağırsak florasının bir parçası olarak kabul edilmektedir (Bentley ve Meganathan, 1982).

2.1. İnsan Patojenik *E. coli*

E. coli suşları konakçalarına zararsızdır, ancak bazı suşlar yüksek derecede patojenik olabilir ve özellikle immün yetmezliği olan kişilerde ciddi sorunlara neden olabilir. Genellikle insanlarda kolibasilozis şiddetli karın krampları ile başlar. Birkaç saat içinde, sıvı ve elektrolit kaybına neden olan sulu bir ishal görülür. Kanlı ishal, genellikle 2 ila 5 gün sürer. Bazı durumlarda, hastalık merkezi sinir sistemine zarar verebilir (Nataro ve Kaper, 1998).

Patojenik *E. coli* insanlarda üç tip enfeksiyondan sorumludur: idrar yolu enfeksiyonları (İYE), yenidoğan menenjit ve bağırsak hastalıkları (Germon ve ark, 2005). Bu enfeksiyonlarla ilgili olan *E. coli*'nin en önemli virülens belirleyicileri, Tablo 1'de özetlenmiştir (Todar, 2007).

Tablo 1. Patojenik *E. coli*'nin virülens belirleyicileri.

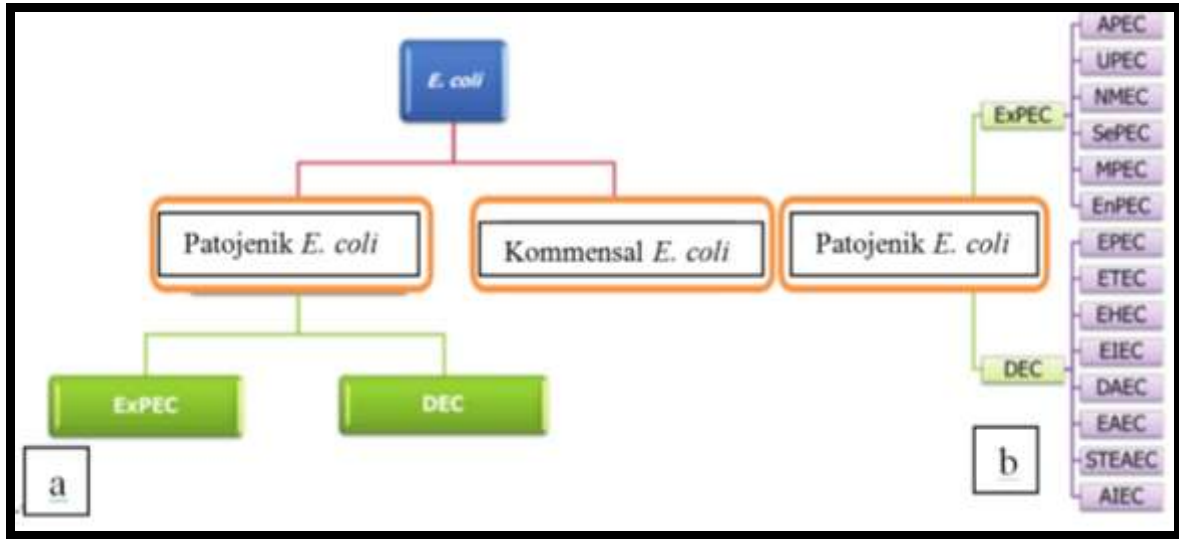
	CFAI / CFAII
	Tip 1 fimbria
Adezinler	P fimbria
	S fimbria
	Intimin (fimbrial olmayan yapışma)
İnvazinler	Hemolizinler
	Sideroforlar ve siderofor alma sistemleri
	Hücre içi invazyon için Shigella benzeri "yayılma"
Hareket	Flagella
	LT toksini
Toksinler	ST toksini
	Shiga benzeri toksin
	Sitotoksinler endotoksin (LPS)
Antifagositik, yüzey özellikleri	Kapsüller **
	K antijenleri * / **
	Lipopolisakaritler (LPS) * / **

* Serum bakterisidal reaksiyonuna karşı savunma

** Bağışıklık tepkilerine karşı savunma

2.2. *E. coli* Patotipleri

E. coli memelilerde kommensal ve patojenik [ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) ve diyarejenik *E. coli* (DEC)] olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Önemli bir grup olan ExPEC'lerin ise altı [üropatojenik *E. coli* (UPEC), yenidoğan menejiti ile ilgili *E. coli* (NMEC), kanatlı patojenik *E. coli* (APEC), sepsisle ilgili patojenik *E. coli* (SePEC), meme patojenik *E. coli* (MPEC) ve endometrial patojenik *E. coli* (EnPEC)] patotipi belirlenmiştir. Diğer önemli grup olan DEC'nin sekiz [Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), Diffuzaderant *E. coli* (DAEC) ve Enteroagregatif *E. coli* (EAEC), shigatoksijenik Enteroagregatif *E. coli* (STEAEC) ve Aderantinvasiv *E. coli* (AIEC)] patotipi saptanmıştır (Clements ve ark, 2012) (Şekil 1).



Şekil 1. a) *E. coli* grupları ve ilişki patotipleri b) Patojenik *E. coli*'lerin patotip ve alttıpleri.

2.3. Kanatlı Patojenik *E. coli* (APEC)

Broylerlerde koliseptisemi ilk olarak hasta tavukların kolera benzeri bir hastalıktan ölmesi üzerine 1907 yılında bildirilmiştir. *Bacterium coli* olarak isimlendirilen etkenin bağırsağı terk ederek stres faktörlerinin varlığında virülens kazanarak broylerlerde enfeksiyona sebep olduğu görülmüştür. 1923 yılında enfeksiyöz astım ve felç belirtileri gösteren kanatlılardan, 1938 yılında ise 10 günlük yaştaki civcivlerde pullorum benzeri bir hastalık tanımlanmış, bu hastalık %15-40 arasında mortaliteye sebep olmuş, nekropside perikarditis, perihepatitis ve karaciğerde beyaz renkli odaklar olduğu bildirilmiş ve izolasyon çalışmaları sonucunda da etkenin *E. coli* olduğu ve hijyen koşullarına uygun olmayan kuluçka makinalarından çıkan civcivlerde hastalığa neden olduğu bildirilmiştir. Daha sonraki yıllarda ise etkenin çok daha farklı klinik semptomlara (koligranüloma, hava kesesi yangısı, artrit, parmak apseleri, omfalitis, panoftalmis, peritonitis ve salpingitis) neden olabileceği bildirilmiştir (Nolan ve ark, 2013).

Patojenik *E. coli* suşları, diğer hayvanlar için ekstraintestinal enfeksiyonlarla da ilgilidir (Nolan ve ark, 2013). Kanatlı hayvanlar arasında, *E. coli*'nin patojenik suşlarının solunum yolu hastalıklarına neden olduğu kanıtlanmıştır (Ewers ve ark, 2004; Ewers ve ark, 2005; Saberfar ve ark, 2008).

Tavuklardaki bağırsak koliformlarının %10-15'i patojen olma potansiyeline sahiptir (Tabatabaei ve Nasirian, 2003). Kanatlı patojenik *E. coli* suşları APEC olarak bilinir ve temel olarak ekstraintestinal hastalıklar ile ilişkilidir (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999).

Kolibasilloz, APEC suşlarının neden olduğu en önemli hastalıktır, solunum yolu enfeksiyonu, sepsisemi, omfalit, enterit ve selülit içeren pek çok ekstraintestinal bozukluklar ile karakterizedir. Hastalığın kanatlı hayvanın üst solunum yollarında başlatıldığı düşünülmektedir; hava keseleri enfekte olan ilk organlardır (Tabatabaei ve Nasirian, 2003; Germon ve ark, 2005, Sabrefar ve ark, 2008) (Resim 1) (Qabajah M, 2011).



Resim 1. APEC suşlarının neden olduğu kolibasilozdan ölen bir tavukta iç organların patomorfolojik değişiklikleri: Gösterilen beyaz tabaka, kolibasilozis enfeksiyonu kolonizasyon seviyesindeki APEC proliferasyonunun sonucudur.

Hastalık genellikle genç kanatlılarda kötü beslenme ve çevresel koşulların neden olduğu stres durumlarında diğer patojenler tarafından oluşturulan enfeksiyondan sonra ortaya çıkar (Ewers ve ark, 2004). İnkübasyon süresi genellikle kısadır (yaklaşık 1 ila 3 gün) ve enteritit, artrit, omfalit, salpingitis, sepsisemi, hava kesesi iltihabı, kronik respiratuar hastalık (CRD), şiş kafa sendromu, peritonit, osteomyelit, sinovit, selülit en önemli klinik belirtilerdir (Nolan ve ark, 2013).

Kolibasilozis yurdumuzda ve dünyada yapılan çalışmalarda kanatlı hayvanlarda en çok bildirilen hastalıklardan birisidir ve kanatlı hayvan endüstrisinde ciddi maddi kayıplara neden olmaktadır. İngiltere yapılan bir çalışmada, kolibasilozis sebebi ile tüketilmesi sakıncalı olan broyler karkaslarının %43'ünün kolibasilozisin karakteristik bulgularını göstermesinden dolayı imha edildiği ve zararın yıllık olarak 5 ya da 6 milyon Euro olduğu raporlanmıştır (Yogaratanam, 1995). Kolibasilozisin yurdumuzdaki kanatlı hayvanlar üzerindeki ekonomik kaybını ortaya gösteren bir araştırma şu anki bilgilerimize göre mevcut değildir.

Kolibasilozis *Mycoplasma gallisepticum* veya Enfeksiyöz Bronşit Virüsü veya Newcastle virüsü gibi farklı virüslerin neden olduğu primer bir enfeksiyonun ardından başlar (Karch ve ark, 1999; Germon ve ark, 2005). APEC suşlarının yol açtığı solunum yolu enfeksiyonu, kuşlarda kolibasilozis gelişimi için ilk adım olarak kabul edilir (Nolan ve ark, 2013). İki ile 12 haftalık kanatlı hayvanlar, hastalığa karşı daha hassastır ve ölüm oranları, 4 ila 9 haftalık aralıktaki kanatlılarda %20'ye kadar çıkabilir (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999).

APEC'ler farklı organlarda lokalize olup çok farklı hastalıklara neden olmaktadır:

Omphalitis ve sarı kesesi enfeksiyonu: Cıvcivlerde yaşamın ilk günlerde görülen ölümlerin en önemli nedeni olup bağırsaktan kana geçen etken yumurta sarısını enfekte edip göbek bölgesinde omfalitisin oluşmasına neden olur (Nolan ve ark, 2013).

Sellulitis: Karın ve but bölgesinin derialtı yangısı sellülitis olarak isimlendirilir olarak bilinen selülitisin herhangi bir klinik semptomu yoktur ve enfeksiyonda yüzeysel deri lezyonları görülmektedir (Nolan ve ark, 2013).

Şiş kafa sendromu (SHS): Broilerlerde periorbital bölge ve derialtı dokusunun yangısı ile karakterizedir. Broiler ve yumurtacılar, şiş kafa sendromu APEC suşlarının yaygın olarak neden olduğu sendromlardan biridir. Bu sendrom, kanatlıların %3-4'ünün ölümünden ve yumurta üretimindeki %2-3'ünün azaltılmasından sorumludur. Şişmiş kafa sendromu genellikle pnömovirüsün neden olduğu akut bir rinitin ardından, bu da derialtı cilt dokularının, karakteristik ödeme nedeniyle olan *E. coli* tarafından istila edilmesiyle başlar (Nolan ve ark, 2013).

Akut vaginitis: Özellikle hindilerde çiftleşmeden sonra görülmektedir (Nolan ve ark, 2013).

Salpingitis: *E. coli* tarafından oviduktun yangısı olarak bilinen salpingitis enfeksiyonundan sonra vücut boşluğunda yangısal eksudat birikmesi ile karakterize peritonitis gelişebilir (Nolan ve ark, 2013).

Orşitis ve epididimitis: Dişilerdeki salpingitise benzer, erkeklerdeki genital bölge enfeksiyonu olarak bilinmektedir (Nolan ve ark, 2013).

Koliseptisemi: Broiler ve yumurtacı tavuklarda yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan en önemli serotipler O1, O2 ve O78'dir. Kolibasilozis ile ilgili en önemli sorunlardan birisi de kanatlılara uygun olmayan antibiyotiklerin kullanılması sonucu antibiyotik direnci gelişmesidir (Nolan ve ark, 2013).

Solunum sistemi formu: İki aya kadar olan broilerler septisemi ile karakterize olan kronik solunum sistemi hastalığı (CRD) enfeksiyonuna yatkındır. Solunum sistemi APEC

suşlarının kan dolaşımına en önemli giriş yoludur. Bakteri solunum sistemi mukozasındaki yaralanmalardan sonra kan dolaşımına girip tüm vücuda yayılarak hava kesesi yangısı ve diğer klinik semptomların oluşmasına neden olur (Nolan ve ark, 2013).

Koligranuloma (Hjarre's hastalığı): Nadir görülen karaciğer, duodenum, sekum, bağırsak gibi iç organlarda granülomların görülmesi ile karakterize broyler, yumurtacı ve hindileri etkileyen sistemik bir formudur (Nolan ve ark, 2013).

2.4. APEC'de Enfeksiyon Modeli

Kanatlı patojenik *E. coli*'den kaynaklanan kolibasillozun patojenik yeteneği lokalize veya sistemik olabilir. APEC patojenik kabiliyeti, geniş virülens virülens ile ilişkili genler tarafından kodlanan virülens faktörler ile artabilmektedir (De Carli ve ark, 2015). Moleküler kriterlerine göre bir suşun APEC olarak kabul edilebilmesi için en az beş virülens ile ilişkili gene sahip olması gerekmektedir (De Carli ve ark, 2015).

APEC patogenezi dört aşamadan oluşur:

Etkenin konağın solunum yoluna kolonizasyonu,

Etkenin konak epitelin solunum organları mukozasına penetrasyonu,

Etkenin kan dolaşımı yolu ile farklı organlarda değişikliğe neden olan iç organlarda sağkalım ve çoğalma aşaması,

Son olarak, ökaryotik hücreler ve lezyonlara yol açan dokular üzerinde toksinlerinin üretilmesi ve bunu klinik belirtilerin başlaması (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999).

APEC patojen suşlarının virülens genotipleri hakkında çok az bilgi mevcuttur (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999, Dozois ve ark, 2000). Bununla birlikte, bazı virülens faktörlerinin, APEC patojenisitesi ile pozitif bir şekilde bağlantılı olduğu, epitel yapışma ve yayılma, hareket, demir tutma sistemleri, toksinler ve sitotoksinler, sıcaklığa duyarlı hemaglutinin, serum direnci, kolisin üretimi ve dış zar proteinleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. (Saberfar ve ark, 2008).

2.5. APEC ve Gıda Güvenliği

Düşük üretim maliyeti ve nispeten ucuz fiyatlar nedeniyle, kümes hayvanı eti tüm dünyada tüketici pazarında çok önemlidir. Bununla birlikte, epidemiyolojik çalışmalar, kanatlı

etlerinde ve yan ürünlerinde patojenik ve bozulma gösteren mikroorganizmaların varlığının önemli bir endişe olmaya devam ettiğini göstermiştir. *E. coli*, günümüzde gıda kaynaklı hastalıklar ile tutarlı şekilde ilişkilendirilmiştir (Lutful Kabir, 2010). Yapılan bazı çalışmalarda da APEC suşlarının potansiyel zoonotik ajanlar olarak kabul edildiğini (Moulin-Schouleur ve ark, 2007, Johnson ve ark, 2008) ve APEC suşlarının insanlara bulaşabileceğini göstermiştir. White ve ark. (1993a) APEC suşlarının insan ExPEC suşları ile aynı klonlara ait olabileceğini rapor etmiş; Moulin-Schouleur ve ark. (2006) ise O18: K1: H7 serotipinin çok yakından ilişkili klonlarının, insanlarda ve tavuklarda ekstra bağırsak enfeksiyonlarından elde edilebildiği ve her iki türün izolatlarının civcivler için virulent olduğu bildirilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) bazlı filotipleme ve çoklu lokuslu sekans tiplemesi, APEC ve insan ExPEC'i arasında bir bağlantı olduğunu ve insan ExPEC'in potansiyel gıda kaynaklı patojen olduğunu (Johnson ve ark, 2007; Moulin-Schouleur ve ark, 2007) ve tüm genom sekans analizi çalışmaları da APEC ile ExPEC arasında yüksek derecede benzerlik bulunduğunu ortaya koymuştur (Johnson ve ark, 2007).

Diğer hayvanlarda ve kanatlılarda enfeksiyona neden olan *E. coli*'lerin birçok özelliği benzerdir. Bu yüzden kanatlı izolatları antibiyotik direnci ile virülens özelliklerini kodlayan genlerin veya plazmidlerin bir kaynağı olabilirler (Lafont ve ark, 1987). Kanatlı hayvanlar ile çalışan insanlardan izole edilen *E. coli*'ler ile kanatlılardan izole edilen *E. coli*'lerin antibiyotik direnç durumları birbirine bezemekle birlikte bazı spesifik suşların kanatlı hayvanlar ve işçiler arasında ortak olduğu saptanmıştır. Bu çalışmalar kanatlılardan insanlara dirençli izolatlar ya da plazmidlerin geçişinin yaygın olduğunu ortaya koymaktadır (Van den Bogaard ve ark, 2001).

2.6. APEC'nin Yayılımı

APEC suşlarının kaynağının kanatlıların sindirim sistemi (GIT) olduğu düşünülmektedir (Ewers ve ark, 2009). Bununla birlikte oral ve üst solunum yolları en önemli gibi görünmesine rağmen ekstraintestinal yayılma yolu tam olarak açıklanamamıştır (Antao ve ark, 2008). APEC'in kümes hayvanları için toz parçacıkları üzerinde, toz başına 10^6 koloni oluşturan birimi aşan seviyelerde kaldığı ve kontamine olmuş parçacıkların solunmasının önemli bir enfeksiyon yolu olduğu düşünülmektedir. Doğal enfeksiyonlarda kanatlıların 10^6 - 10^9 cfu bakterinin solunum sistemi ile alınmasını takiben lokal veya sistemik enfeksiyonlar görülebileceği bildirilmiştir (Antao ve ark, 2008). Oral enfeksiyonun ardından intestinal

transepitelyal göç, ekstraintestinal yayılma olmakta ayrıca, yüzeysel ve deri altı yaralanmalarının da enfeksiyonların yayılımı için alternatif mekanizmalar olduğu da öne sürülmüştür (Arne ve ark, 2000).

Vertikal bulaşma broiler enfeksiyonlarında önemli bir rol oynayabilmektedir. Olsen ve ark. (2012), başta *E. coli* olmak üzere bakteriyel enfeksiyonların, yumurtacı tavukların yaşamlarının ilk haftası boyunca görülen ölümlerinin yaklaşık %50'sini oluşturduğunu rapor edilmiştir (Olsen ve ark, 2012). Septisemili veya septisemi olmayan omfalit ve/veya yumurta sarısı enfeksiyonları bildirilmiştir. Bu tür enfeksiyonlar, yumurta sarısının yumurtalıkta veya kuluçkahane ortamında enfekte olduğu salpingitis ile enfekte damızlık tavuklardan kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Mokady ve ark, 2005). Petersen ve ark. (2006) florokinolona dirençli *E. coli*'nin vertikal bulaşmasını göstermiştir. Vertikal bulaşmayı gösteren çalışmalar ile ekstraintestinal *E. coli* enfeksiyonlarının erken sürü mortalitesine katkısı desteklenmektedir (Olsen ve ark, 2012).

2.7. APEC'nin Virülens ile İlişkili Genleri (VAG)

Bir patojenin konakta hastalık oluşturabilmek ve konak savunmasından korunabilmek için ürettiği her madde veya yapısal elemanı virülens faktörü olarak kabul edilmektedir. APEC izolatlarının patojenitesi adezinler (*papC*, *papG* alel I, II, III, *fimH*, *sfaS* gibi), invazinler (*afaD*, *ibeA*, *aap*), protektinler (*iss*, *traT*, *ompT*), toksinler (*hlyF*, *hlyD*, *astA*) ve demir toplama mekanizmaları (*iroN*, *iutA*, *iucD*, *sitAC*, *sitAP*) gibi onları konakçı immün tepkisine karşı koruyan ve ekstraintestinal varlıklarını mümkün kılan virülens faktörlerine bağlıdır (Nolan ve ark, 2013). Sistematik olarak APEC ile ilişkili olduğu kanıtlanmış tek bir virülens gen/genler yoktur. Bu durum tüm APEC izolatlarını hedef alan aşı tasarımının geliştirilme çalışmalarını zorlaştırır. APEC izolatlarının karakterizasyonu, kolibasilozisin patogenezi anlamak ve hastalık için etkili önleme ve kontrol stratejilerine ulaşmak için gereklidir (Lutful Kabir, 2010). APEC izolatlarını tanımlamak için tanısal stratejiler *E. coli*'nin çeşitli virülens genlerinin saptanmasına dayanmıştır (Schouler ve ark, 2012). Broilerlerde APEC epidemiyolojisi hakkında UK (Kemmett ve ark, 2014), Mısır (Mohamed ve ark, 2014), Meksika (Vhm ve ark, 2017), Cezayir (Mohamed ve ark, 2014), Nepal (Subedi ve ark, 2018) ve Pakistan (Azam ve ark, 2019)'da çalışmalar yapılmıştır. APEC enfeksiyonlarının patogenezi belirleyen spesifik virülens genlerinin önemi ve etkileşimi halen tam olarak anlaşılamamıştır (Díaz ve ark, 2012).

APEC'nin virülensinin anlaşılması, kolibasilozis ile mücadele etmek için spesifik terapötiklerin geliştirilmesi için gereklidir. APEC'de bulunan virülens genlerinin bakterinin patojenisitesi ile korelasyonu üzerine önemli araştırmalar yapılmıştır. Patojenik olmayan izolatlar genellikle klinik olarak sağlıklı kanatlıların dışkılarından elde edilirken, kolibasilozun klinik belirtilerini gösteren tavukların dışkıları, organları veya gastrointestinal izolatları APEC izolatlarını temsil etmek için kullanılmaktadır (Delicato ve ark, 2003; Vandekerchove ve ark, 2005).

E. coli'nin ekstraintestinal sağ kalımı, virülens genleri tarafından kodlanan sayısız virülens faktörleri tarafından kolaylaştırılmaktadır. Bir izolatın potansiyel bir APEC suşu olup olmadığını belirlemek için şüpheli patojenik ve patojenik olmayan izolatlar arasındaki karşılaştırmalar (virülens genlerinin sıklıkları, çeşitliliği, kombinasyonları ve genlerin suşların patojenisitesi üzerindeki etkileri) yapılmaktadır (Mellata ve ark, 2003). Yapılan bir çalışmada, APEC'in çeşitli patotipleri tanımlanmış ve konakçı duyarlılığının durumunun, spesifik patotiplere sahip *E. coli* suşlarının hastalığa neden olmada önemli bir rol oynadığı bununla birlikte hasta broylerlerin APEC izolatları arasında yüksek genetik çeşitlilik olduğunu gösterilmiştir (Kemmett ve ark, 2013).

Bir patojenin hastalığa neden olabilmesi dolayısıyla ile hayatta kalabilmesi konak savunma mekanizmalarına karşı direnç göstermesi veya kaçabilme yeteneğine bağlıdır. Bakterinin hayatta kalması, serum direnci ve kapsül oluşturabilmesi ile yakından ilişkilidir. Patojen fimbria, pilus ve dolaşım sistemindeki kırmızı kan hücrelerinin hemaglutininleri gibi adezinler ile konakda spesifik dokulara yapışabilir (Nolan ve ark, 2013). Ayrıca, patojenler konak hücreleri istila eder ve patojenlerin konakçı dokulardan yayılmasını sağlar (Ewers ve ark, 2007). Patojenler konak hücrelerde sayıca çoğalır, konakçıda büyümeyi teşvik etmek için ortamdaki demiri bağlar ve böylece hastalığın şiddetini artırır (Andrews ve ark, 2003).

Bazı *E. coli* patotipleri, virülens ile ilişkili, tanımlanmasına ve karakterizasyonuna yardımcı olan bazı faktörlerle ilişkilidir. Örneğin, EHEC shiga benzeri toksinleri kodlayan *stx1* ve *stx2* genlerini taşımaktadır. EHEC, diyare hastalığı, hemolitik kolit ve hemolitik üremik sendrom ile ilişkilidir. EPEC, EPEC yapışma faktörü plazmidleri tarafından kodlanan demet oluşturma pilus kullanılır. Son yıllarda, APEC enfeksiyonunun APEC'in daha iyi tanımlanmasına ve hastalık kontrolü ve mücahalesine olanak sağlayan patogenezinin ya da virülensinin anlaşılmasına katkı sağlayan çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bilim adamları, bugüne kadar, tüm APEC izolatlarında bulunan tek bir ya da VAG grubunu tanımlamayı başaramamıştır (Nataro ve Kaper, 1998).

Ekstra-intestinal *E. coli*'lerin sahip olduğu virülens faktörlerinin bazıları APEC izolatlarında da rastlanmıştır. Bu virülens faktörleri arasında adezinler (Tip 1 Fimbria, P fimbria, S fimbria, afimbrial adezinler, Curli fimbria, Isıya Duyarlı Hemaglutininler), serumun bakterisidal etkilerine karşı dirençlilik, aerobaktin demir elde etme sistemi, toksinler, hemolizin, hareket, kapsüler antijen, kolisin V plazmidi, kongo red ile boyanma ve asit toleransı sayılabilir (La Ragione ve Woodward, 2002).

Adezinler: Bakterilerin konak epitel dokusuna yapışması *E. coli* enfeksiyonunun oluşturulması için önemli bir adımdır ve patojenik suşların olduğu kadar komensal *E. coli* izolatlarının da bir özelliğidir (Campos ve ark, 2005). Adezyon ile bakteriyel bağlanma bakterinin konak epitel dokularına yakın temasta kalmasını sağlamaktadır. *E. coli*'nin yapışma kapasitesinin bir virülens faktörü olabileceğine dair ilk kanıtlar Arp ve Jensen (1980)'nın hindi trakeasında fimbriyalı ve virulent bir suşun avirulent ve fimbriasız bir suştan daha kalıcı olduğunun gösterilmesi ile kanıtlanmıştır.

Fimbria ya da adezinlerin en önemli görevi konak dokularına bağlanarak bakterinin kolonizasyonunu sağlamalarıdır. Fimbrialar eritrositlere bağlanma özelliklerinden faydalanılarak *in vitro* deneyler ile saptanabilmektedir. Ortamda D-mannoz varlığında hemaglutinasyon özelliğinin, kaybolup kaybolmamasına göre fimbrialar mannoz duyarlı (tip 1 fimbria) ve mannoz dirençli (P fimbria, S fimbria ve afimbrial adezinler) adezinler olarak iki önemli grupta incelenmektedir.

Bununla birlikte curli fimbria adı verilen oldukça ince, halka şeklinde kıvrılmış, saç benzeri yüzeysel uzantılar da ekstra intestinal *E. coli*'lerde belirlenen önemli diğer adezinlerdendir (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999). *Salmonella* Enterica ve *E. coli*'nin hücre yüzeyinde bulunan ince ve kıvrımlı yapılar bakterinin hücre dışı matris proteinlerine bağlanmasından sorumludur (Collinson ve ark, 1993). Curli fimbrialar, sabit fazdaki ve düşük ozmolarite ortamındaki büyüme sırasında 26°C'de optimum şekilde eksprese edilmektedir. Curli fimbriaların kanatlı koliseptisemisindeki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Collinson ve ark, 1993).

APEC izolatlarında bulunan Tip 1 fimbriaların hem *in vitro* hem *in vivo* olarak farinks ve trake epitel hücrelerine bakterinin bağlanmasını sağladığı bildirilmiştir. Tip 1 fimbria'nın yapışkan özelliği spesifik antiserum ve ökaryotik hücre zarı üzerindeki hücre reseptörü olan bir karbonhidrat olan D-mannoz tarafından inhibe edilir. Bu özellikler bakterinin karakterizasyonunda kullanılmaktadır (Gyimah ve Panigraphy, 1988). Tip 1 fimbria *fimA* adı verilen bir ana proteinden ve *fimF*, *fimG* ve *fimH* yardımcı proteinlerinden oluşmakla birlikte bunlar *E. coli* kromozomunda lokalize olan *fim* gen yığını tarafından kodlanmaktadır. Tip 1

fimbriaların patojenik *E. coli*'lerde oldukça yüksek oranda görüldüğü bildirilmekle birlikte apatojen/kommensal *E. coli* izolatlarının yaklaşık yarısında bulunduğu bildirilmektedir (Dozois ve ark, 1992).

İnsan ve farklı hayvan eritrositlerini ortamda D-mannoz varlığında mannoz dirençli fimbrialar (P fimbrialar (*pap*), S fimbrialar (*sfa*) ve afimbrial adezinler (*afa*)) hemaglutine etme özelliğindedirler. P fimbrial yapıların ilgili enfeksiyonların patogenezindeki rolleri hakkında pek çok çalışma yapılmış iken, S fimbrialar ve afimbrial adezinler hakkındaki bu konudaki bilgiler sınırlıdır. Pourbakhsh ve ark. (1997) Tip 1 fimbriaların üst solunum yolu ilk kolonizasyonu ile ilişkiliyken, P fimbrial yapışmanın daha derin kanatlı organlarındaki bakteri kolonizasyonunda rol oynayabileceğini bildirmişlerdir. APEC suşlarında da bulunan P fimbrial adezinler ilk önce insan idrar yolu enfeksiyonları ile ilişkili suşlar (İYE) olarak tanımlanmıştır (Kallenius ve ark, 1980). P fimbria, bakteriyel kromozomda bulunan *pap* operonu tarafından kodlanır. *papA* geni, ana yapısal protein (*papA*), *papI* ve *papB* faz değişim sürecinden sorumlu düzenleyici genlerdir (Mol ve Oudega, 1996). P fimbrianın APEC patojenitesindeki rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Pourbakhsh ve ark. (1997), *in vivo* çalışmalar kullanılarak, P fimbrianın konak üst solunum yolunun ilk kolonizasyonu için önemli olmayacağını, ancak enfeksiyonun son aşamalarında rolü olduğunu öne sürmüşlerdir.

Sıcaklığa Duyarlı Hemagglutinin: Bazı APEC izolatlarında 26-30°C gibi düşük ısılarda eksprese edilen ve 42°C'de baskılanan bir hemagglutinasyon aktivitesi görülmüştür. Bu olay ısıya duyarlı hemagglutinasyon olarak bilinmektedir. Bu izolattan *tsh* geni klonlanmış ve bu genin kodladığı *tsh* proteininin APEC'in patogenezindeki fonksiyonu her ne kadar tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte; pek çok çalışmada patojen APEC izolatlarında tespit edilmiştir. Bu gen sıklıkla APEC suşları arasında yüksek moleküler ağırlıklı plazmidlerde esas olarak *ColV* plazmitlerinde bulunur (Dozois ve ark, 2000) bulunur. Maurer ve ark. (1998) *tsh* genini çalışılan patojen izolatların %46'sında tespit ettiklerini ve komensansal izolatların hiçbirinde bulunmadığını saptamadıklarını bildirmişlerdir. Campos ve ark. (2005), *tsh* geninin septisemili ve şişmiş kafa sendromu olan tavukların %25-50'sinde saptarken komensansal izolatların sadece %6'sında bulunduğunu rapor etmişlerdir. Ewers ve ark. (2004) bu geninin patojen APEC suşlarını saptamak için moleküler bir marker olarak kullanılmasını önermiştir.

Demir Toplama Sistemleri: APEC suşları, demir alıcı sistemlerin ekspresyonu nedeniyle, çoğunlukla konağın içindeki demir kullanılabilirliğinin düşük olduğu ortamlarda hayatta kalır ve büyür (Dho ve Lafont, 1984). Bakteriyel demir alım mekanizmaları,

konakçıda iyon şelatlayıcı olarak işlev gören siderofor üretimini içerir. Bu mekanizma ile bakteri demir eksikliği bulunan ortamlarında hayatta kalabilmektedir. *E. coli* en çok bağırsaklarda üreyebilmektedir. Çünkü üremesi üzerine olumlu etkisi olan serbest demir dokularda ve mukozalarda oldukça azdır. *E. coli* demirden faydalanmak için yapısında bulunan düşük moleküllü bileşikler olarak bilinen sideroforlar yardımıyla organizmada laktoferrin veya transferrin gibi demire bağlanmış moleküllerden demiri kazanır. Bu sideroforlar iki grupta incelenmektedir. Daha çok EPEC ve ETEC suşlarında sentezlenen fenolat siderofor ve EIEC suşlarında sentezlenen hidrosomat siderofor aerobaktin *E. coli* invaziv enfeksiyonlarında etkili olmaktadır (Williams ve Griffiths, 1992).

APEC enfeksiyonlarında bir günlük civcivlerin mortalitesi ve düşük demir konsantrasyonu arasında pozitif bir ilişki olduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca, Dozois ve ark.. (1992) patojenik APEC suşlarının demir alım sistemlerine sahip olduğunu apatojen suşların ise sahip olmadığını göstermiştir. Yersiniabactin (siderofor) sistemi (*fyuA* ve *irp-2* genleri) APEC suşları arasında daha sık görülmüştür (Janßen ve ark, 2001). *iucA* ve *fepC* genleri gibi başka bir demir alım sistemiyle ilgili genler APEC suşları arasında da bulunmuştur (Okeke ve ark, 2004). Gerçekleştirilen bir çalışma da patojenik kanatlı *E. coli* suşları arasında yüksek oranda demir alımı ile ilişkili gen göstermiştir (Campos ve ark, 2005). Son zamanlarda, bir APEC suşunda bir *Salmonella enterica* suşlarındakine benzer *sitABCDE* sistemi tanımlanmıştır. Bu sistem, diğer demir alım sistemleri ile birlikte demir alımına ve oksidatif stres bakteriyel sağkalımına katkıda bulunabilen bir demir ve manganez taşıyıcı sistemidir (Sabri ve ark, 2006). APEC suşları arasında demir toplama sistemleri, plazmid genleri (Johnson ve ark, 2006; Sabri ve ark, 2006) veya kromozomal patojenite adaları (Kariyawasam ve ark, 2006) tarafından kodlanabilir.

Serumun Bakterisidal Etkilerine Karşı Dirençlilik: Daha çok septisemik enfeksiyonlara neden olan APEC izolatları kapsül, lipopolisakkarid, kolisin üretimi ve dış membran proteinleri sayesinde serumdaki komplementin bakterisidal etkilerine karşı direnç sağlanmaktadır (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999). Yapılan çalışmalarda APEC izolatlarının serum direnci ile virülansı arasında yakın bir ilişki olduğunu gösterilmiştir (Dozois ve ark, 1992). Mellata ve ark (2003), serum direncinin APEC suşları tarafından patojenezde kullanılan mekanizmalardan biri olduğunu bildirmiştir. Serum direncinde rol oynayan genler arasında serum sağkalımını arttırır (*iss*), kolisin-V operonunun yapısal genleri (*cvi/cva*), dış zar proteini (*ompA*) ve transfer proteini (*traT*) bulunur (Ideses ve ark, 2005).

Toksinler: Yapılan çalışmalarda vakumlu ototransporter toksin (*vat*) geni ve ısıya dayanıklı enteroagregatif toksin (*astA*) genlerinin APEC ile en çok ilişkili iki toksin geni

olduğu bildirilmektedir. APEC suşları tarafından eksprese edilen vakumlu ototransporter toksini *vat* geni tarafından kodlanır ve bu suşlarda bir patojenite adasında bulunmaktadır (Nichols ve ark, 2016). Enteroagregatif toksin ise *astA* genine sahip EAEC suşlarının ürettiği ısıya dayanıklı bir toksindir. Aynı zamanda diyarejenik diğer *E. coli* sınıflarında da mevcuttur ve bu bakterilerin patogeneğinde önemli role sahiptir. Hayvanlardan daha çok domuz yavruları ve buzağularla görülmekle birlikte ilk olarak bir çocuğun dışkısında saptanmış ve ishali tetiklediği bildirilmiştir (Ménard ve Dubreuil, 2002). Bazı APEC suşları sıcaklığa duyarlı (LT) ve sıcaklığa dayanıklı (ST) enterotoksinler ve Shiga-toksinler (stx) olarak bilinen verotoksinler üretebilir (Nolan ve ark, 2013).

İnvazinler: Bir bakterinin invazivliği yapışma kabiliyetlerinden ve konakçı hücrelerinin dışında hayatta kalma kabiliyetinden etkilenir. Patojenler, dolaşım sırasında enfeksiyon için uygun dokulara ulaşmak için yeterince uzun süre hayatta kalmak için yüksek derecede invaziv olmalıdır. APEC'in patogeneğinde yer alan iki hayati invazyon geni *ibeA* (beyin epitelyumunun istilasısı) geni ve *gimB* (yeni doğmuş menenjitte ilişkili genetik ada) genidir (Cortes ve ark, 2008).

Hemolizin: *E. coli*'ler alfa ve beta hemolizin sentezler. Alfa-hemolizin konak hücre proteinlerini hasara uğratar. İnsanlar ve memeli hayvanlarda ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olan *E. coli*'lerin patogeneğinde hemolizin'in eritrositleri parçalayarak etkenlerin demir ihtiyacını sağlamasında önemli bir virülens özelliği olduğu düşünülmektedir (Orskov ve Orskov, 1985).

Hareket: Nadir olarak hareketsiz suşlar izole edilmesine rağmen çoğu APEC suşunun peritrik flagellaları sayesinde hareketli oldukları belirlenmiştir. Flagellasız bir APEC mutantının kullanıldığı çalışmalarda tavuk bağırsak ve trake hücrelerine bu suşun bağlanmasında azalma olduğu belirlenmişlerdir. Bu nedenle flagellanın mukus tabakasını geçerek adezyonun oluşmasında bir özellik olduğunu ve ayrıca kolonizasyon ve invazyon açısından önemli olduğu da tespit edilmiştir (La Ragione ve ark, 2000).

Kolisin: Kolisinler *E. coli* tarafından eksprese edilen aynı veya ilişkili türlerde bakteri üremesini inhibe eden proteinlerdir. Kolisinler iki şekilde etki oluşturur: bunlardan biri bakteri hücre lezyonlarının oluşturulmasıdır, diğeri ise bakterinin kendi kolisinlerine karşı korunmasıdır (Hardy ve ark, 1975). Kolisin, plazmidlerde bulunan genlerle kodlanabilir. Bu nedenle, bunlar sıklıkla *col* plazmitleri olarak adlandırılır. APEC suşları arasında kolisin ekspresyonunun en çok Ia, Ib, E1, E2, E3, I, K, B ve V gibi kolisleri içeren bakteri suşları arasında en yaygın olduğu göstermiştir (Silveira ve ark, 2002a). APEC suşlarının çoğunda kolisin V plazmitleri vardır (Nolan ve ark, 2013). Bu plazmitler ayrıca diğer patojenite ile

ilişkili genleri de içerir (Johnson ve ark, 2003). Aerobaktin demir elde etme sistemini kodlayan genlerin de tamamının bu plasmidlerde yerleşik olduğu gösterilmiştir (La Ragione ve Woodward, 2002).

Kapsül: Bazı *E. coli* suşları, hücre yüzeylerinde, bakterilere immün direnç sağlayan ve immün direnci indükleyen klasik kompleman yolu ile etkileşime giren bir N-asetil muramik asit kapsülü içerir (Jann ve Jann, 1977). K1 kapsüller antijeni sık sık O1, O2 serogruplarına ve tiplenemeyen suşlara ait APEC suşları ile ilişkilidir (Nolan ve ark, 2013). Pourbakhsh ve ark. (1997), K1 kapsülünü ifade eden üç APEC suşunun, diğer K antijenlerini eksprese eden APEC suşlarına kıyasla serum bakterisit etkilerine karşı daha dirençli olduğunu dolayısı ile K1 kapsül antijenine sahip APEC izolatlarının enfeksiyon yapma yeteneği açısından önemli bir virülens faktörüne sahip olduklarını bildirmişlerdir. Konak savunma mekanizmalarından kaçınmak için, hücre çevresinde *kps* ve *neuC* genleri tarafından kodlanan proteinlerin hareketleri vasıtasıyla bir polisakkarit katmanından oluşan koruyucu bir kapsül oluşturulabilir (Delicato ve ark, 2003). Bu kapsüller, kompleman direnci ve fagositlerle ters orantılı olarak ilişkilendirilmiştir (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999; Mellata ve ark, 2003).

Diğer virülens faktörleri: APEC suşları arasında bulunan diğer virülens faktörleri arasında patojenite adaları (Kariyawasam ve ark, 2006) ve enterosit yok etme bölgesi (LEE) (La Ragione ve ark, 2002) bulunur. Rodriguez-Siek ve ark. (2005), insan UTI ve kanatlı kolibasilozisinden elde edilen *E. coli* izolatlarının serogruplar, filogenetik gruplar ve virülens genotipleri, plazmid-DNA ile ilişkili sekanslar, yapışma, demir alımı, protezler ve toksinlerle ilgili olarak önemli benzerlik gösterebileceğini bildirmiştir. Ayrıca APEC suşları arasında Kongo kırmızısı besiyerine bağlanma kapasitesi gözlenmiştir. Bu ilişki kesin olmamakla birlikte Kongo kırmızısı ile boyanan izolatların daha invaziv oldukları kabul edilmektedir. Bazı yazarlar bu özelliğin APEC suşlarına virülens belirteçlerinden birisi olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Berkhoff ve Vinal, 1986). Ayrıca APEC izolatlarının *in vitro* testlerde kommensal *E. coli*'lere nazaran aside karşı dirençli oldukları saptanmıştır. Bu özelliğin APEC'lerin kanatlıların asidik sindirim sisteminde yaşayabilmesine faydası olduğu öne sürülmektedir (La Ragione ve Woodward, 2002).

Daha önceki yıllarda APEC izolatlarının virülens genleri incelenmiştir. Johnson ve ark. (2008) tarafından APEC izolatlarının virülens genlerinin incelendiği bir çalışmada, bilinen patojenite ve serogruplu 124 APEC izolatı, virülens genotipleme ve filogenetik tiplendirmeye tabi tutulmuştur. Bu çalışma sonucunda, plazmidler tarafından taşınan beş genin (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, and *ompT*) son derece patojenik APEC suşları ile ilişkili olarak tanımlanmıştır. Çalışmada bu beş geni hedefleyen bir multipleks PZR paneli, toplam 994

APEC ve kanatlı fekal *E. coli* (AFEC) izolatlarının taranması için kullanılmıştır. Çalışmada APEC izolatlarının, patojenik bir yaşam tarzı için iyi bir şekilde donatıldığını göstermiş ve APEC izolatlarının çoğunun, fırsatçı patojenler olduğuna dair olan yaygın bir inancın yanlış olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, APEC'lerin tüm patojenik suşlarında tek bir virülens geni (VG) bulunmaz bu da farklı virülens mekanizmalarının kullanımını göstermektedir (La Ragione ve Woodward, 2002; Germon ve ark, 2005). APEC izolatlarının sahip olduğu virülens gen kapasitesi plazmidler, bakteriyofajlar veya patojenik adalar olarak adlandırılan DNA'nın belirli bölgelerinde bulunan belirli genlerin yatay geçişi ile elde edilir (Moulin-Schouleur ve ark, 2007).

APEC suşlarının virülensle ilişkili en önemli genleri Tablo 2'de listelenmiştir (Dozois ve ark, 2000; Delicato ve ark, 2003; Dozois ve ark, 2003; Mellata ve ark, 2003).

Tablo 2. APEC izolatlarının virülensle ilişkili genlerinin fonksiyonu ve yerleşimi.

Gen	Adı	Fonksiyonu	Bulunduğu Yer
<i>iutA</i>	Demir reseptörü geni	Demir taşımacılığı	Plazmid/Kromozom
<i>iroN</i>	Katekol siderofor reseptör geni	Demir taşımacılığı	Plazmid
<i>iucD</i>	Demir elde etme sistem geni	Demir taşımacılığı	Plazmid/Kromozom
<i>hlyF</i>	Hemolizin F geni	Toksin	Plazmid
<i>vatA</i>	Ototransporter toksin geni	Toksin	Kromozom
<i>astA</i>	Isıya dayanıklı enterotoksin-1 gen	Toksin	Kromozom
<i>tsh</i>	Sıcaklığa duyarlı hemagglutinin geni	Adezin	Plazmid
<i>papC</i>	Piyelonefrit ilişkili pilus C	Adezin	Kromozom
<i>iss</i>	Serum sağ kalım geni	Serumda sağ kalım	Plazmid/Kromozom
<i>ompT</i>	Dış membran proteaz geni	Serumda sağ kalım	Plazmid
<i>colV</i>	Kolisin V operon yapısal geni	Kolisin	Plazmid

2.8. Virülens İle İlişkili Genleri Belirleme Yöntemleri: Karşılaştırmalı Genom

APEC patogeneğinde şüpheli VAG'lerin rolünü değerlendirmek için karşılaştırmalı genomik ve mutasyon çalışmaları kullanılabilir. Hasta kanatlıların sistemik enfeksiyonlardan izole edilen *E. coli*'ler sağlıklı görünümlü olan kanatlılardan (genellikle bağırsak mikrobiyodan) izole edilen *E. coli*'ler ile karşılaştırılmıştır. Genomik supresyon hibridizasyon analizinin, bu tür karşılaştırmaların yapılmasına olanak sağlayan değerli bir araç olduğu

kanıtlanmıştır (Mahan ve ark, 1993). Bu çalışmalar ile APEC suşlarında adezyon, yayılma, demir metabolizması ve plazmit kodlanmış genlerde yer alan, ancak *E. coli* K-12 MG1655 gibi patojenik olmayan suşlarda bulunmayan bir dizi potansiyel APEC virülens geninin tanımlanmasına yardımcı olmuştur (Mokady ve ark, 2005).

Kopyalanan dizilerin seçici yakalanması (SCOTS) tekniği kanatlılarda enfekte dokulardan alınan izolatlar tarafından ifade edilen genlerin tanımlanmasını sağlamaktadır (Graham ve ark, 1999). Dozois ve ark. (2003) enfeksiyon sırasında gerekli olan temel APEC genlerini tanımlamak için bu tekniğin avantajlı olduğunu bildirmişlerdir.

Transpozon mutagenesi (STM) çalışmaları mutant kütüphanelerin patogeneziye yer alan fonksiyonlarla genlerin tanımlanmasına büyük ölçekli tarama yapılmasını sağlamaktadır (Hensel ve ark, 1995). Li ve ark. (2005) bir APEC suşunda (O2: H5) önemli olan VAG'leri tanımlamak için STM'yi kullanmış ve bu teknik kullanılarak bir dizi hücre dışı polisakarit ve lipopolisakarit tanımlanmışlardır (Li ve ark, 2005). STM, büyük çaplı tarama ve bilinmeyen genlerin tanımlanmasına izin verdiği için güvenilir tekniklerden birisidir.

2.9. Patojenik *E. coli*'nin Tanımlama Yöntemleri

APEC tanımlamasında, kimyasal karakterizasyonu ve seçici ortamın doğasına dayanan konvansiyonel tanımlama yöntemleri kullanılmıştır. Daha spesifik bir tanımlama yaklaşımı, yüzey antijenlerine dayanarak patojenik suşları sınıflandırmayı amaçlayan serotip analizidir. DNA bazlı tanımlama yöntemleri, *E. coli* virülens genlerinin tanımlanmasını amaçlayan son derece hassas yaklaşımlar olarak kabul edilmektedir.

2.9.1. Konvansiyonel Yöntemler

Gram negatif bir bakteriyel olan *E. coli* aside dirençli olmayan, sporsuz, çomak şekilli ve çoğunluğu hareketli, 18-44°C'de üreyebilen, MacConkey agarda parlak pembe, EMB agarda siyah metalik koyu yeşil koloniler oluşturarak üreyen bir etkidir. Üremesi esnasında şekerlerden (glukoz, maltoz, manitol, ksiloz, gliserol, ramnoz, sorbitol ve arabinozdan) asit ve gaz oluşumuna sebep olmakla birlikte genellikle indol, metil red pozitif ve nitratı nitrite indirir. Voges Proskauer ve oksidaz negatiftir. Kanatlı *E. coli* izolatları da diğer kaynaklardan izole edilenler ile benzer biyokimyasal özelliklere sahiptir (Nolan ve ark, 2013).

İntestinal patojenik Gram negatif bakterilerin üretilmesinde en çok tercih edilen besi yerlerinden birisi Eosin–Methylene Blue agar (EMB)'dır (Koneman, 1997). Bu besiyerinde laktoz veya sakkarozun fermentasyonunu göstermek için Eosin Y ve methylene blue boyaları indikatör olarak kullanılmaktadır. Methylene blue Gram pozitif bakterilerin üremesini inhibe eder. *E. coli* laktozu fermente eder. *E. coli* genellikle bu besiyerinde laktozun hızlı fermentasyonuna bağlı ortası koyu renkli metalik yeşil refle vermektedir, *Salmonella* gibi diğer enterobakteriler laktoz veya sakkarozu fermente etmediklerinden renksiz koloniler oluşturmaktadırlar (Koneman, 1997).

Gram pozitif bakterilerin identifikasyonunda kullanılan bir diğer önemli besiyeri MacConkey (MAC) agardır. Bu besiyeri içerisinde kristal viyole ve safra tuzları mevcuttur. Laktozu fermente eden bakteriler MAC'da pembe-kırmızı renkli koloniler oluştururlar. Laktozun fermentasyonu sonucu asit ortaya çıkar ve bu da kolonilerin açık pembe renkli olmasına yol açar (Koneman, 1997).

E. coli'yi identifiye etmenin bir başka yolu da onu diğer patojenlerden ayıran biyokimyasal özellikleridir. En önemli biyokimyasal özelliklerinden birisi glikoz, maltoz, mannoz, mannitol, ksiloz, gliserol, rhamnoz, arabinoz, ve sorbitol gibi şekerlerin fermentasyonundan sonra asit ve gaz üretilmesidir. *E. coli* suşlarında çoğunlukla hareket, lizin ve indol üretimi, metil red pozitifdir. Oksidaz, Voges–Proskauer testi, sitrat kullanımı, üre hidrolizi, jelatinin erimesi, H₂S üretimi negatiftir. *E. coli*'nin en temel özelliği glikozun fermentasyonu sonucu asit ve gaz üretmesidir. Laktozun glikoz ve galaktoza ayrışması galaktosidaz enziminin varlığına bağlıdır. Bu enzim *E. coli*'nin *Salmonella* spp. ve *Shigella* spp.'den ayrımını sağlamaktadır (Koneman, 1997).

2.9.2. Serotiplendirme

E. coli'nin dış membranı, lipit A, çekirdek oligosakkaritler ve O-antijen olarak adlandırılan eşsiz bir polisakkarit içeren lipopolisakkaritlerden (LPS) oluşur. O-antijenlerinin kaybı, konakçı-patojen etkileşimlerindeki önemini vurgulayan zayıflatılmış virülense neden olmaktadır (Sarkar ve ark, 2014). O-antijenleri arasındaki antijenik çeşitlilik, *E. coli*'nin sınıflandırılmasında 1940'lı yıllardan beri kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, *E. coli* O-grupları için eşsiz bir serotipleme sistemi geliştirmiş, üç ana yüzey antijeni (O, H, K) varlığına dayanan tiplendirme şeması hazırlanmıştır (Ørskov ve ark. 1977).

O, H ve K antijenlerine dayanarak, 700'den fazla *E. coli* serotipi tanımlanmıştır.

Serotiplendirme, *E. coli*'nin patojenik suşlarının sınıflandırılması için temel teşhis yöntemlerinden biridir. Bazı suşların (O1, O2 ve O78) kanatlıların patojenik suşları olarak sınıflandırılabilceği öne sürülmektedir (Yaguchi ve ark, 2007). Ancak, yapılan son araştırmalar, bu yöntemin APEC sınıflandırması için yeterince verimli olmadığını ortaya koymuştur (Ewers ve ark, 2004; Yaguchi ve ark, 2007). Özellikle mevcut ticari kitlerin çok pahalı olması ve tüm O serotiplerini sınıflandırılmaması bu yöntemin en önemli dezavantajlarıdır. Bazı çalışmalarda O serotipleme toplam APEC suşlarının yaklaşık % 50'sini sınıflandırabilmiştir (Yaguchi ve ark, 2007). Bu nedenle, serotip tanımlama, *E. coli*'nin tüm patojenik suşları hakkında bize net bilgi verememekte ve suşların hepsinin sınıflandıramaması önemli bir dezavantaj olarak düşünülmektedir. Sonuç olarak, serogruplar suşların virülensini yansıtmaz ve bu nedenle serotipleme yararlı bir tanı aracı olarak kullanılamaz (Ewers ve ark, 2005).

2.9.3. Moleküler Tanımlama

Moleküler epidemiyoloji ve virülensla ilişkili APEC genleri hakkında sınırlı bilgi bulunması kolibasilozun önlenmesi için gerekli ve etkili epidemiyolojik kontrol önlemlerinin uygulanmasını engellemektedir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar APEC'in virülens faktörlerini kodlayan genleri tanımlamıştır. Bu genlerden en önemlileri demir ile siderofor reseptörü geni (*ironN*), demir elde etme sistem geni (*iucD*), demir reseptörü geni (*iutA*), ısıya dayanıklı enterotoksin-1 geni (*astA*), ototransporter toksin geni (*vatA*), hemolizin F geni (*hylF*), piyelonefrit ilişkili pilus C (*papC*), sıcaklığa duyarlı hemaglutinin geni (*tsh*), kolisin V operon yapısal geni (*colV*), serumda sağkalım (*iss*) ve dış membran proteaz (*ompT*) genleridir. Eskiden, APEC suşlarının moleküler tanımlanması, patojenite ile ilgili olması beklenen birkaç genin taranmasına dayanıyordu. Daha önceki araştırmalar, bazı virülens genlerinin, kolibasilozisli tavuklardan elde edilen izolatlar arasındaki prevalansının, kuşlarda bulunan patojenik *E. coli*'nin saptanması ve karakterizasyonu için yararlı belirteçler olduğunu ve bu nedenle kanatlı hayvanlarda kolibasilozisin teşhisinde kullanılabileceğini göstermiştir (Ewers ve ark, 2005). Yapılan çalışmalarda, APEC patojenitesinde tip 1 ve P fimbrial adezinler, aerobaktin demir taşıma sistemi ve sıcaklığa duyarlı hemaglutinin rolünü doğrulamıştır (Dozois ve ark, 2000; La Ragione ve ark, 2000).

Daha sonra, APEC'nin virülens profilini incelemeye odaklanan araştırmacılar, birçok çalışmada virülens profilinin oldukça önemli olduğunu, birbirleriyle kombinasyon halinde

bulunmaları halinde APEC'in patojenitesini artıracığını gösterdi (Ngeleka ve ark, 2002). Daha sonra yapılan çalışmalarda bu tür kombinasyonların APEC patojenitesi üzerindeki etkisini belirlemek ve virülens genleri arasındaki kombinasyonları tanımlamak için yararlı olmuştur. Bu çalışmalarda, birbirleri ile en çok ilişkili olan patojenik genleri tanımlamak için geniş ölçekte bakteri genlerini taranmaya başlanmıştır ve bazı virülens genlerinin patojenik izolatları tespit edebildiği görülmüştür. Buna paralel olarak birçok çalışma, birçok APEC izolatının, bazıları potansiyel virülens faktörlerini kodlayan belirli plazmitleri (örneğin, ColV plazmitleri) taşıdığını göstermiştir (Ewers ve ark, 2004); birkaç çalışma APEC virülensisi ile farklı gen adalarına sahip olan ColV plazmidlerinin varlığı arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir ki bu da patojenite ile olan ilişkiyi ortaya koymaktadır (Ewers ve ark, 2004).

2.9.4. Diğer Faydalı Teknikler

Belirli bir APEC suşunun virülensini araştırmak ve ayrıca saha suşları ile belirli bir gen veya fonksiyondan yoksun mutant suşları karşılaştırmak için deneysel enfeksiyonlarda farklı virülens deneyleri veya patojenite testleri gerçekleştirilerek *in vivo* çalışmalar yapılmaktadır (Antao ve ark, 2008). Bu çalışmalarda APEC'in incelenmesinde PZR ile tiplendirme (Carvalho de Moura ve ark, 2001), polimorfik DNA'nın rastgele amplifikasyonu (Maurer ve ark, 1998), multilokus enzim elektroforezi (White ve ark, 1993b), genomik supresyon subtractive hibridizasyonu (GSSH) (Schouler ve ark, 2004) gibi pek çok tiplendirme yöntemleri kullanılmış ve genom analizleri APEC patojenitesinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Yapılan transkripsiyon sekansı çalışmasında patojene özgü transkriptlerin, varsayılan adezyonlara, lipopolisakkarit çekirdek sentezine, demir-duyarlı, plazmid ve faj kodlanmış genlere ve bilinmeyen fonksiyona sahip genlere karşılık geldiği ve kopyalanan dizilerin seçici bir şekilde yakalanmasıyla tanımlanan aerobaktin siderofor sisteminin ve *E. coli iro* lokusunun spesifik olarak silinmesi, bu patojene özgü sistemlerin, üzerinde çalışılan bakteri suşunun virülensine katkıda bulunduğunu göstermiştir (Dozois ve ark, 2003).

2.10. Klonal İlişki ve Patojen Klon Tespiti

Enterobacteriaceae familyasının klonal karakterizasyonunda, tekrarlayan Ekstragenik Palindromik Amplifikasyon (REP) ve Enterobacterial Tekrarlayan İntergenik (ERIC) sekans

analizine dayanan moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılmıştır. Bu tekrarlayan DNA dizilerinin mikrobiyal organizmalarda dağılımı, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'nda korunmuş primer kullanılarak tespit edilebilir (Versalovic ve ark, 1991). Moura ve ark. (2001) REP-PZR ve ERIC-PZR tekniklerini kullanarak tavuklardan izole edilen incelenen suşlar tarafından sunulan büyük fenotipik ve genotipik değişkenliğe dayanarak APEC suşlarının fenotipleri ile genotipleri arasında bir ilişki olmadığını öne sürmüşlerdir. Brocchi ve ark. (2006) ayrıca REP-PZR kullanarak APEC suşları arasında yüksek bir genomik çeşitlilik bulmuşlardır, ancak bu araştırmacılar bu tekniğin APEC patojenik klonları arasında ayırım yapmak için verimli olmadığı sonucuna varmışlardır. Silveira ve ark. (2002b)'nin yaptığı klonal çeşitlilik çalışmasında kommensal avian *E. coli* suşları ve APEC suşları ERIC-PZR kullanarak, APEC suşlarının klonal kökeni ve patojenitesi arasında bir ilişki olduğunu gösterilmiştir. White ve ark. (1993b), Multi Locus Enzim Elektroforezi (MLEE) kullanarak, hindilerde septisemiye neden olan APEC suşlarının, özel patojenik klonların ve patojenik olmayan fırsatçı klonların bir karışımına ait olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Aynı tekniği kullanarak, Ngeleka ve ark. (1996), selülitli tavuklardan izole edilen APEC'in aynı klonal kompleksine ait olduğunu ve APEC'in septisemiye neden olan benzer fenotipik ve genotipik özelliklere sahip olduğunu göstermişlerdir. Buna ilaveten, Silveira ve ark. (2003) aynı tekniği kullanarak patojenik klonların, genetik olarak kommensal suşlar ile karşılaştırıldığında birbirlerine benzer olduğunu bildirmişlerdir. Ewers ve ark. (2004), itilmiş alan jel elektroforezi (PFGE) kullanılarak, Almanya'nın farklı bölgelerinden APEC suşları arasında sınırlı sayıda epidemik klonun varlığını ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte, araştırmacılar virülensla ilişkili sekanslar ve klonal kümeler arasında bir ilişki gözlemlememiştir. Ewers ve ark. (2005) virülens genlerinin horizontal gen transferinin, virülens genlerinin varlığı ve Almanya'dan APEC'nin patojenik klonal kümeleriyle birleşmesinden sorumlu olabileceğini bildirmişlerdir. Tüm bu çalışmalar, APEC suşlarının açık bir patotip tanımının yapılamamasının nedeninin APEC izolatlarının oldukça karmaşık bir genotipik yapıda olmasından ileri gelebileceğini ortaya koymuştur.

2.11. Kanatlı Hayvan Endüstrisinde Kolibasillozun Etkisi

Her yaştaki tavukların kolibasillozise duyarlı olduğu, ancak hastalığın ciddiyetinin genç tavuklarda daha büyük olduğu bilinmektedir (Nolan ve ark, 2013). Hastalık broyler, damızlık ve yumurtacıları etkileyip, kanatlı hayvan ölümlerine neden olabilir. Kanatlı hayvan

endüstrisinde kolibasilozis salgınları nedeni ile antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu durum saha suşlarında antibiyotik direncine neden olmuştur. Halk sağlığı açısından bu durum oldukça önemlidir. Yoğun antibiyotik kullanımı ekonomik açıdan da önemli olduğu için alternatif tedavi seçenekleri ön plana çıkmaktadır (Nolan ve ark, 2013).

2.12. Antibiyotikler: Keşiflerden Uygulanan Kısıtlamalara

Penicillium notatum mantarı tarafından penisilin üretimi 1928'de Alexander Fleming tarafından keşfedilmiştir (Assadian, 2007). Penisilin bakterilere karşı öldürücü iken, hayvan ve insan dokularına toksik olmadığı, İkinci Dünya Savaşı sırasında penisilin bazlı “mucize tedavi” yönteminin geliştirilmesi ve yaygın olarak kullanılması Ernest Chain, Howard Florey ve Fleming'in yaptığı ortak çalışmalar sayesinde olmuştur (Chain ve ark, 2005). Bu, doğal olarak antibiyotiklerde araştırmaların artmasına ve bunun sonucunda yıllar içinde yaygın kullanımın enfeksiyonlara karşı insan ve daha sonra hayvan sağlığına fayda sağlamasına yol açtı. Moore ve ark. (1946) tarafından yapılan bir çalışmada, streptomisin civcivlerde bakterisit düzeylerde beslenmeleri ile birlikte büyümeyi hızlandırdığı ortaya çıkarmışlardır. Bunun devamında, tarım endüstrisinde büyüme destekleyicileri olarak antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılmasına neden olan antibiyotik takviyesinin büyümeyi destekleyici etkilerinin daha fazla gösterilmesi ile devam etmiştir. Büyüme destekleyicileri olarak geniş çaplı antibiyotik kullanımı ile kanatlı hayvan endüstrisindeki hastalık salgınlarını önlemek ve tedavi etmek için yanlış ve sorumsuz kullanımları, seçici antibiyotiğe dirençli bakterilerin oluşmasına neden olmuştur. Sonuç olarak, çeşitli antibiyotiklerin büyük ölçüde yanlış uygulamaları, kanatlı hayvan endüstrisi için olduğu kadar insan sağlığı için de önemli bir sorunu temsil eden çoklu antibiyotiğe dirençli suşlara yol açmış ve kanatlı hayvan endüstrisinde bazı antibiyotiklerin kullanılmasına karşı yasaklar getirilmiştir. Örneğin, ABD'ndeki Gıda ve İlaç İdaresi 2005 yılında kanatlı hayvanlarda kullanılan fluorokinolonların yasaklanmasıdır (US FDA, 2012). Yasak, ayrıca *Campylobacter* türlerine karşı da uygulanmıştır (Price ve ark, 2007). Benzer şekilde, Avrupa Birliği, 2006 yılında yürürlüğe giren hayvan yemlerinde antimikrobiyallerin terapötik olmayan kullanımına yasak getirmiştir (Avrupa Birliği, 2005). Bu nedenle, antibiyotik direnci ve hayvan endüstrilerinde kullanımlarının yasaklanması sorunları, antibiyotiklere alternatif terapötiklere ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

2.12.1. Antibiyotik Direnci: Mekanizmalar ve Kökenleri

Antibiyotiklere yönelik bakteriyel direnç mekanizmaları genetik (doğal, kazanılmış) veya biyokimyasal (ilacın hedefinde değişiklik, sentezlenen enzimle ilacın inaktive edilmesi, hücreye giren ilaç miktarının azaltılması) direnç mekanizmaları ile olabilir (Bennett, 2008). Bakteriler, doğada buldukları süre boyunca yaptıkları gibi, antibiyotikler dâhil toksik bileşiklere direnç kazanmak için genetik olarak hızla adapte olabirler (Laehnemann ve ark, 2014). Ek olarak, bakteriler, genler veya kromozomal fragmanlar gibi genetik materyalin plazmidler, transposable elementler, bakteriyofajlar veya diğer bakterilerden gelen integronlar vasıtasıyla horizontal transferi düzenli olarak dirençle ilgili genleri değiştirebilir. Ayrıca, bu transfer tür içi transferlerle sınırlı değildir, çünkü bakterilerin yatay gen transferini başka türlerle de yapabildikleri bilinmektedir (Bennett, 2008). Bakteriyofajlar (Balcazar, 2014) ve fajla ilgili mobil elemanlar (Brown-Jaque ve ark, 2015), antibiyotik dirençli genlerin transferi için ek vektörlerdir (Penadés ve ark, 2015). Antibiyotiklere karşı duyarlı olmamalarına rağmen, fajların, enfekte ettikleri bakteriye antibiyotik direnci sağlayabilen çeşitli genleri sıklıkla taşıdığı gösterilmiştir. Bu genetik içerik, mobil genetik elemanlar üzerinde taşınır. Nitekim bu genlerin bakterilere aktararak edinilmiş dirence neden oldukları ileri sürülmüştür (Balcazar, 2014). Hiç antibiyotik kullanılmayan ortamlardan izole edilen bakteriyofajların da antibiyotik direnç genlerine sahip olması oldukça dikkat çekici idi (Muniesa ve ark, 2013). Direnç genlerinin doğrudan bakteri konakçılarında aktarılmasının yanı sıra, litik fajlar ayrıca plazmid içeren bakteri hücrelerinin parçalanmasıyla horizontal gen aktarımına da katkıda bulunabilir, böylece dirençli gen içeren plazmitleri, diğer bakteri hücreleri tarafından potansiyel alım için çevreye salgırlar (Keen ve ark, 2017). Bu nedenle, kromozomal mutasyonlar vasıtasıyla, diğer bakterilerden direnç genleri taşıyan hareketli genetik elemanların alınması, direnç genlerinin fajlardan transferi, kromozomal rekombinasyon olayları ve bu işlemlerin kombinasyonları ile bakteriler olumsuz koşullara hızla adapte olabilir. Bu nedenle antibiyotiklerin gelişiminin benzer bir hızda gelişmesi veya etkili alternatif tedavilerin hazır olması gerekir. Antibiyotik direncini tamamen ortadan kaldırmak mümkün olmamakla birlikte, bakteriler tarafından daha fazla direnç kazanılmasını teşvik etmeden antibiyotik kullanımından korunmak mümkündür. İleriki yıllarda, APEC ile savaşmak için antibiyotik kullanımına karşı aşılama stratejilerinin, bakteriyofaj tedavilerinin ve antikör terapisi uygulamaları gibi potansiyel alternatif tedavi seçenekleri üzerinde durulmaktadır.

2.12.2. Kullanılan Antibiyotikler ve Gelişen Direnç

Kanatlı hayvanlarda büyüme destekleyici ve hastalıkları önleyici amaçlarla antibiyotik kullanımı sık sık yapılan bir uygulamalardır. Beta laktamlar (penisilinler, amoksisilin, seftiofur), aminoglikozidler (streptomisin, gentamisin, neomisin, spektinomisin); makrolidler (eritromisin, tilosin, spiramisin, kitasamicina, tilmicosin); linkozamitler (lincomisin); pleuromutilinler (tiamulin, kloramfenikol, florfenikol); tetrasiklin (tetrasiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin); folat inhibitörleri (sülfonamidler, trimetoprim); polimiksin B; kinolon (oksolinik asit, nalidiksik asit); florokinolonlar (flumequine, enrofloxacin, difloxacin) kullanılmaktadır. Bununla birlikte sefalosporinler, kinolonlar, tetrasiklinler ve trimethoprim-sulfamethoksazole hastalıkları tedavi etmek amacı ile kullanılan en önemli antibiyotiklerdir ve sonuç olarak bakterilerde en çok bu antibiyotiklere karşı direnç gelişimi olmuştur (Subedi ve ark, 2018). APEC izolatları arasında çoklu ilaç direnci ve direnç genlerinin varlığı çok önemlidir (Zhang ve ark, 2017). APEC suşları arasında çoklu ilaç direncinin ortaya çıkması, kolibasillozisin antimikrobiyal tedavisinde ciddi zorluklar doğurmuştur. Uzun süreli ilaç tedavisi, terapötik maddelere karşı yaygın dirençle sonuçlanmıştır. APEC suşlarının ayrıca yatay gen aktarımı yoluyla direnç genleri edinebildikleri için çok ilaca dirençli oldukları da tespit edilmiştir (Li ve ark, 2013).

Bir aile olarak *Enterobacteriaceae* familyası sık sık konjugasyon ve transformasyon ile antibiyotik direnç genlerini alan plazmidlerin bir taşıyıcısıdır (Boyd ve Hartl, 1997). Bununla ilişkili olarak, besi hayvanlarında profilaksi ve büyüme destekçisi olarak antibiyotiklerin fazlaca kullanımı, kanatlı hayvanlarda bulunan APEC'de antibiyotik direncinde bir artışa neden olmuştur. Verilerden elde edilen sonuçlar sülfametoksazol, tetrasiklin, streptomisin, ampisilin, siprofloksasin, penisilin, tylosin ve enrofloksasine karşı önemli ölçüde artmış direnç göstermektedir (Boyd ve Hartl, 1997; Radwan ve ark, 2017).

APEC'in bu ilaçların birçoğuna direnci, temel olarak plazmid rekombinasyonu yoluyla, direnç kodlayıcı genlerin edinimi ile bağlantılı olmuştur. Bu mobil genetik elemanlar, besin zinciri boyunca (Overdeest ve ark, 2011) vertikal olarak iletildiğinden, veteriner hekimlikte antibiyotiklerin olağanüstü kullanımı bu soruna önemli katkı sağlamıştır. Bu özelliğin insandaki klinik etkisi çok geniştir. Sadece mobil genetik elementlerin çevreden ve besin zincirindeki düşey aktarım yoluyla ciddi bir şekilde kazanılması söz konusu değildir, antibiyotiklerin klinik ortamlarda kötüye kullanılması bu tehdidi önemli ölçüde artırmaktadır. Direnç patotipleri veren genotipler çeşitlidir. ExPEC'in birçok izolatı yakın zamanda genişletilmiş β laktamaz (ESBL'ler) taşıyıcıları olarak sınıflandırılmıştır. Bu patojene 3. ve 4.

kuşak sefalosporinler ve penisilinler de dâhil olmak üzere çok çeşitli β laktamlar da direnç sağlar (Shaikh ve ark, 2015). CTX-M geninin dünyadaki en yaygın ESBL direnç geni (Giufre ve ark, 2012) olduğu ve hem dar hem de geniş çaptaki konak aralıklı plazmitlerde (Cantón ve ark, 1997) tanımlandığı belirlenmiştir. Florokinolon direnci ayrıca, yakından bağlantılı plazmid aracılı *qnr* genlerinin (Cantón ve ark, 1997) varlığından dolayı CTX-M kodlayan izolatlarda yaygın olarak tanımlanır. CTX-M'yi barındıran bir plazmid üzerinde bulunan ek genler aminoglikozitlere, kloramfenikol, sülfonamid, trimetoprim ve tetrasikline karşı direnci kodlar (Bonnet ve ark, 2004).

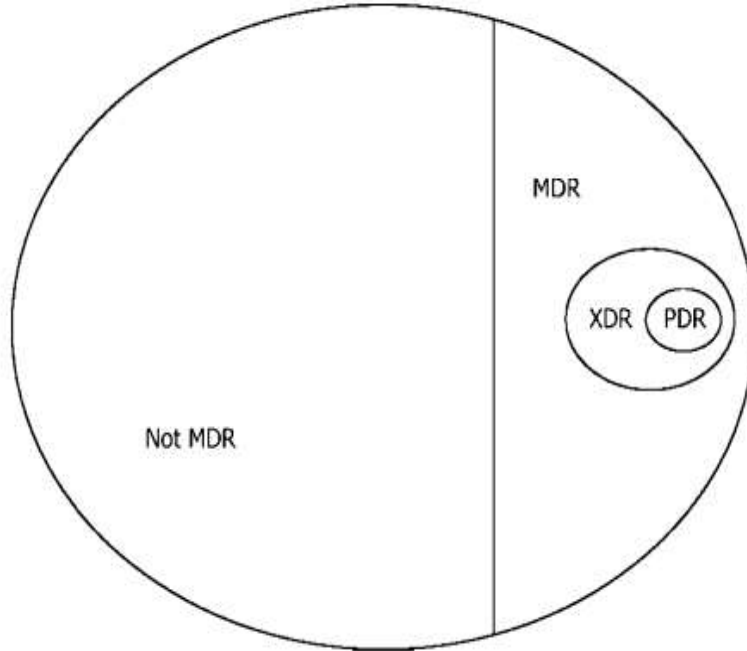
Yeni Delhi metalo- β -laktamaz (NDM-1), son on yıl içerisinde *E. coli*'de ortaya çıkmış ve tüm β -laktamazlara direnç sağlayan bir diğer önemli β -laktamazdır (Rogers ve ark, 2013). NDM-1 bir dizi plazmid ile bağlantılı olarak bir UPEC izolatında tanımlanmıştır. Bu, bazı klonlarının %50'sinden fazlasının ExPEC'de çoklu ilaç direnci ile ilişkili olduğunu anlamak için önemli bir bağlantıdır.

Son olarak, bir kolistin direnci kodlayan gen olan *mcr-1*, birkaç yıl içinde küresel olarak yayılmıştır (Falgenhaue ve ark, 2016). Kolistin, polimiksin E antibiyotik sınıfına dahildir ve çok ilaca dirençli enfeksiyonların tedavisinde son çare antibiyotik olarak sınıflandırılmasından dolayı halk sağlığı için büyük endişe duymaktadır (Falgenhaue ve ark, 2016). Birkaç yıl önce ortaya çıkmasından bu yana, *mcr-1* dünya çapında ExPEC izolatlarında tanımlanmıştır (Falgenhaue ve ark, 2016). Amerika Birleşik Devletleri'nde *mcr-1*'i barındıran ilk *E. coli*, 2016 yılında İYE olan bir hastadan izole edilmiştir (McGann ve ark, 2016). Bu kolistin direnç geni, CTX-M ve tetrasiklin direncini de kodlayan yeni bir IncF plazmidinde bulunmuştur. Bu direnç genlerinin *Enterobacteriaceae* familyası içerisindeki bakteriler arasında yayılması dünya çapında halk sağlığı için büyük endişe verici bir durumdur (Villa ve ark, 2010).

Antibiyotik direnci, büyük ölçüde bulaşıcı plazmitler üzerinde bulunan direnç genlerinin ortaya çıkması nedeniyle son yıllarda önemli artışlar göstermiştir. Gıda olarak tüketilen hayvanlarında antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı, düşük seviyelerde bile, günümüzde görülen çok sayıda ilaca dirençli patojenle sonuçlanan doğal iletim sürecinin hızını arttırmıştır. ExPEC CTX-M, NDM-1 ve MCR-1 dâhil olmak üzere birçok direnç genleriyle ilişkilendirilmiştir. APEC içindeki son çare ilaç olan kolistin direncinin belirlenmesi, kümes hayvanlarında bu gen haznesinin prevalansını azaltma ihtiyacını daha da önemli olduğunu ortaya koymuştur.

Patojenik bakterilerde çoklu antimikrobiyal maddelere direnç ortaya çıkması, bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar için mevcut olan etkili antimikrobiyal ajanların az veya hatta hiç olmadığından, önemli bir halk sağlığı tehdidi haline gelmiştir. Gram pozitif ve

Gram negatif bakteriler hem antimikrobiyal direncin ortaya çıkmasından hem de yükselmesinden etkilenir. Bu sorun büyümeye devam ettikçe, çoklu antimikrobiyal maddelere dirençli bakterileri tanımlamak ve sınıflandırmak için uyumlu tanımlara ihtiyaç duyulmaktadır, böylece epidemiyolojik sürveyans verileri sağlık hizmeti ortamları ve ülkeler arasında güvenilir bir şekilde toplanıp karşılaştırılabilir. İlaç dirençli mikroorganizmaları tanımlamak amacı ile çok ilaca dirençli (Multi Drug Resistant: MDR), aşırı ilaç dirençli (Extensively Drug Resistant: XDR) ve tüm ilaçlara dirençli (Pan-Drug Resistant: PDR) terimlerinin tanımlanması ve kullanılmasında henüz bir fikir birliği oluşturulamamıştır. Bu da çok ilaca dirençli organizmalar için surveyans verilerinin uygun bir şekilde kıyaslanmasını ve toplum sağlığını tehdit eden direnç artışı oranları ile ilgili doğru bilgilere ulaşılmasını engellemektedir (Falagas ve Karageorgopoulos, 2008). *In vitro* antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarına göre, test edilen bakterinin en az üç grup antibiyotiğe dirençli patojenler için MDR, XDR, iki veya daha az antimikrobiyal kategorideki fakat hepsinde en az bir maddeye duyarlılık olmadığı tanımlandı (genellikle kolistin ve tigesiklin hariç tüm antibiyotiklere dirençli patojenler için yani bakteriyel izolatlar sadece bir veya iki kategoriye duyarlı kalır) ve PDR, tüm antimikrobiyal kategorilerdeki tüm ajanlara duyarlı olmama olarak (kolistin ve tigesiklin dâhil tüm antibiyotiklere dirençli patojenler için) tanımlanmaktadır (Magiorakos ve ark, 2012).



Şekil 2. MDR, XDR ve PDR arasındaki ilişki.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. İzolasyon Materyali

Bu çalışmada materyal olarak özel bir kanatlı hayvan hastalıkları teşhis laboratuvarına 6 aylık bir süre boyunca (Ekim 2018-Mart 2019), koliseptisemi şüphesi ile getirilen, 16-41 günlük yaş aralığında, 173 broyler tavuktan aseptik olarak alınan iç organ (akciğer, kalp, karaciğer) örnekleri kullanıldı. Klinik olarak hasta hayvanlarda pnömoni, perikardit, perihepatit, peritonit, hava kesesi yangısı, artrit görüldü. Materyal alınan kanatlı hayvanların tedavi amacı ile son bir hafta içerisinde terapötik amaçlı antimikrobiyal madde kullanılmamış olmasına özen gösterildi.

3.1.2. Referans Suşlar

E. coli ATCC 25922 suşu antibiyotik duyarlılık testinde kalite kontrol suşu olarak ve *E. coli* izolatlarının moleküler olarak *E. coli* olduklarının doğrulanması için yapılan olan PZRlarında pozitif kontrol olarak ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşu da negatif kontrol olarak suşu olarak kullanıldı.

3.1.3. Besiyerleri

Alınan materyallerden *E. coli* izolasyon ve identifikasyonunda MacConkey Agar, Eosin-Methylene Blue Agar (EMB), antibiyotik dirençliliğinin saptanmasında Mueller-Hinton Agar (MHA), Nutrient Broth (NB) izolatların saklanması için %20 gliserinli Brain Heart Infusion Broth (BHIB) kullanıldı.

3.1.3.1. MacConkey agar (Merck, 1.05465)

Besiyeri 50 g olacak şekilde tartıldıktan sonra üzerine 1 litre saf su ile ilave edilerek mikrodalga fırında eritildi. Besiyeri pH'sı 7.2 ± 0.2 olacak şekilde ayarlanarak otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyerleri $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulduktan sonra petrilere döküldü.

3.1.3.2. Eosin methylene blue agar (Merck 1.01347)

Besiyeri 36 g olacak şekilde tartıldıktan sonra üzerine 1 litre saf su ile ilave edilerek mikrodalga fırında eritildi. Besiyeri pH'sı 7.2 ± 0.2 olacak şekilde ayarlanarak otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyerleri $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulduktan sonra petrilere döküldü.

3.1.3.3. Mueller Hinton agar (Merck 1.05437)

Besiyeri 38 g olacak şekilde tartıldıktan sonra üzerine 1 litre saf su ile ilave edilerek mikrodalga fırında eritildi. Besiyeri pH'sı 7.2 ± 0.2 olacak şekilde ayarlanarak otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyerleri $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulduktan sonra petrilere döküldü.

3.1.3.4. Nutrient broth (Merck 1.05443)

Besiyeri 8 g tartıldıktan sonra 1 litre distile suda eritilerek pH'sı 7.0 ± 0.2 olacak şekilde ayarlandı. Tüplere 5'er ml olacak şekilde dağıtılıp otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edildi.

3.1.3.5. Brain hearth infusion broth (Oxoid-CM1135) (%20 gliserinli)

Besiyeri 3.7 g tartıldı, üzerine 80 ml saf su ve 20 ml gliserin eklendi, mikrodalga fırında agar eritildi. Karışımın pH'sı 7.2 ± 0.2 ayarlandı, 1.5 ml'lik ependorf tüplerin hepsine besiyeri dağıtıldı. Otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edildi.

3.1.4. Ayıraç ve Boyalar

3.1.4.1. Oksidaz ayıracı (Oxoid, BR 64)

Oksidaz testi, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve intrasellüler olan oksidaz enziminin (sitokrom C oksidaz) varlığını ortaya koymak için kullanılmaktadır (Arda, 2011). Üreyen mikroorganizmaların oksidaz aktivitelerinin saptanması için oksidaz ayıracı kullanıldı. Ticari olarak kullanıma hazır olarak temin edilen oksidaz test kiti buzdolabında ($2-8^{\circ}\text{C}$) saklandı.

3.1.4.2. Gram boyama seti (Merck-111885)

İzolatların Gram boyanma morfolojilerinin belirlenebilmesi amacı ile kullanıldı. Ticari olarak temin edilen Gram boyama seti oda ısısında tutuldu.

3.1.4.3. % 3'lük Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Ticari olarak temin edilen bu çözelti, organizmaların katalaz aktivitelerini belirlemek amacıyla kullanıldı.

3.1.5. Antibiyotik Diskleri

İzolatların antibiyotik duyarlılık testinde amoksisilin (AX, 25 µg), amoksisilin klavulanik asit (AML, 20/10 µg), doksisisiklin (DO, 30 µg), trimetoprim sulfametoksazol (SXT, 1.25/23.75 µg), siprofloksasin (CIP, 5 µg), gentamisin (CN, 10 µg), fosfomisin (FOS, 50 µg), florfenikol (FF, 30 µg), sefalekssin (CL, 30 µg) olmak üzere hepsi oxoid marka toplam 9 antimikrobiyal aileye ait 9 antibiyotik kullanıldı. Diskler kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı.

3.1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

3.1.6.1. Solusyon ve boyalar

3.6.1.1.1. Fosfat tamponu (PBS, 10 mM pH 7.4)

Sodyum Ddihidrojen Fosfat (Na ₂ HPO ₄).....	1.44 g
Potasyum Dihidrojen Fostat (KH ₂ PO ₄).....	0.24 g
Tuz (NaCl).....	8 g
Potasyum Klorür (KCl)	0.2 g

Sekiz yüz ml distile suda eritildi. Daha sonra hacim 1000 ml'ye tamamlandı. pH: 7.2'ye ayarlayıp 121°C'de 15 dk otoklav edildi. Oda ısısında saklandı.

3.1.6.1.2. Tris, borik asit, EDTA (TBE, pH:8.0) Buffer

10X TBE stok solüsyonu

Tris Base [tris (hydroxymethyl)aminomethane]	108 g
Borik Asit.....	55 g
EDTA.....	7.5 g

Sekiz yüz ml distile suda eritildi. Daha sonra hacim 1000 ml'ye tamamlandı. pH: 8.0'e ayarlayıp 121°C'de 15 dk otoklav edildi. Oda ısısında saklandı.

0.5X TBE kullanma solüsyonu

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

Karıştırılarak solüsyon hazırlandı. Hazırlanan bu solüsyon, hem agaroz hazırlamada hem de elektroforez tankı içerisinde kullanıldı.

3.1.6.1.3. Yükleme tamponu (Loading Buffer) (6X) (Fermentes , SM1333)

Yükleme tamponu ticari olarak temin edildi ve buzdolabında saklandı.

3.1.6.1.4. MgCl₂, Taq DNA polimeraz, 10X Taq buffer, dNTP Set

10X Taq Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), 25 mM MgCl₂, 100 mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Taq DNA polimeraz (5U) (Fermentas) kullanıldı.

3.1.6.1.5. Primerler

E. coli, kromozomunda lokalize olan ve çeşitli çevresel stresler altında (ısı şoku, besin azlığı, ozmotik basınç ve toksik ajanların varlığı) tetiklenen altı (A, C, D, E, F, G) evrensel stres proteini (*usp*) geni taşımaktadır. Bu genlerden birisi olan “*uspA*”, *E. coli*'nin hücre gelişim, yapışma ve hareketlilik fonksiyonlarının yerine getirilmesini sağlayan dolayısı ile suşların hayatta kalması için önemli olan bir gen dir. Bu çalışmada PZR ile *E. coli* izolatlarının tür düzeyinde identifikasyonlarının doğrulanmasında bu genin varlığı araştırıldı (Chen ve Griffiths, 1998). Bu çalışmada APEC izolatlarının virülenla ilişkili 11 geninin [demir elde etme sistem geni (*iucD*), siderofor reseptörü geni (*iroN*), demir reseptörü geni (*iutA*), ısıya dayanıklı enterotoksin-1 geni (*astA*), ototransporter toksin geni (*vatA*), hemolizin F heni (*hylF*), piyelonefrit ilişkili pilus C (*papC*), sıcaklığa duyarlı hemaglutinin geni (*tsh*), kolisin V operon yapısal geni (*colV*), serum sağkalım geni (*iss*) dış membran proteaz geni (*ompT*)] varlığı da PZR ile incelendi. Çalışmada kullanılan tüm primerler Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Primerler sekansları, ürün uzunlukları, kaynakları.

Primer	Sekans (5'-3')	Tm (°C)	Amplikon uzunluğu (bp)	Kaynak
<i>uspF</i>	CCTCCCGCACGATGATC	59.5	884	Chen ve
<i>uspR</i>	TCCACGCATCGTCAGGC	62.5		Griffiths, 1998
<i>iutAF</i>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	65.9	302	Johnson ve
<i>iutAR</i>	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	65.3		ark, 2008
<i>iroNF</i>	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT	69.1	553	Johnson ve
<i>iroNR</i>	GTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	69.5		ark, 2006
<i>iucDF</i>	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC	55.5	714	Janssen ve ark,
<i>iucDR</i>	CCTGATCCAGATGATGCTC	57.3		2001
<i>hlyFF</i>	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC	71.0	450	Morales ve
<i>hlyFR</i>	GGCGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	69.5		ark, 2004
<i>vatAF</i>	TCCTGGGACATAATGGTCAG	57.3	981	Ewers ve ark,
<i>vatAR</i>	GTGTCAGAACGGAATTGT	63.8		2004
<i>astAF</i>	TGCCATCAACACAGTATATCC	58.4	116	Ewers ve ark,
<i>astAR</i>	TCAGGTCGCGAGTGACGGC	51.6		2005
<i>tshF</i>	ACTATTCTCTGCAG AAGTC	55.3	825	Ewers ve ark,
<i>tshR</i>	CTTCCGATGTTCTGAACT	54.5		2004
<i>papCF</i>	TGATATCACGCAGTCAGTAGC	57.9	500	Ewers ve ark,
<i>papCR</i>	CCGGCCATATTCACATAA	51.4		2004
<i>issF</i>	ATGCAGGATAATAAGATGAAA	50.1	290	Ewers ve ark,
<i>issR</i>	CTATTGTGAGCAATATACA	48.0		2004
<i>ompTF</i>	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT	71.6	496	Johnson ve
<i>ompTR</i>	TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	70.1		ark, 2006
<i>colVF</i>	TGGTAGAATTGTGCCAGAGCAAG	60.6	1180	Janßen ve ark,
<i>colVR</i>	GAGCTGTTTGTAGCGAAGCC	59.4		2001

3.1.6.1.6. Kullanılan cihazlar

Çalışmalar Boeco (USA) marka termal döngüleme cihazı, VWR (Singapur) marka güç kaynağı, Cleaver Scientific marka (İngiltere) elektroforez sistemi, Vilber Lourmat (Infinity VX2, Almanya) marka görüntüleme cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.1.6.1.7. Agaroz jel

İki gr agaroz (Sigma Marka, Katalog No: A9539-100G) tartılarak üzerine 100 ml 0.5X Buffer ilave edilerek karıştırıldı ve mikrodalga fırında 3-5 dk kaynatıldı. Homojenize halde olan karışım 40-50°C'ye kadar soğutuldu. 100 µl agaroz içerisine 7 µl Safe View (ABM, Canada) boyası ilave edilerek, 20 cm'lik yatay jel elektroforez tablasına döküldü. Dökülen agaroz üzerine elektroforez tırağı takılarak, jelin katılaşması için 30 dakika beklendi. Bu süre sonunda taraklar jele zarar vermeden çıkartıldı. Jel elektroforez tankına yerleştirildi ve üzerini kapatacak miktar kadar TBE (0.5 X) tampon çözeltisi eklendi.

3.1.6.1.8. Elektroforez

Jel elektroforez tablası elektroforez tankına yerleştirildikten sonra, elektroforez tankının içerisine 0.5x TBE tampon solüsyonu jelin 1 mm üstüne gelecek kadar ilave edildi. Örnekler agaroz jele 5 µL amplikon, 1 µL yükleme boyası toplamda 6 µL olacak şekilde karıştırılarak yüklendi. Bu karışımın hepsi jele yüklendi. DNA örnekleri 100 voltta 45 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu.

3.1.6.1.9. Görüntüleme

UV görüntüleme cihazında agaroz jele yüklenen DNA örnekleri incelendi ve fotoğrafları kaydedildi. Amplifikasyonu yapılmış olan ürün, beklenen boyutta bir bant oluşturduysa (Tablo 3), virülens genini taşıdığı kabul edildi. Her virülans geninin prevalansını hesapladıktan sonra, her APEC izolatının virülans gen profilleri belirlendi.

3.1.6.1.10. Marker

Marker olarak 50 bp ve 100 bp'lik (Fermentas, Vilnius, Litvanya, Katalog No: SM1333) DNA Ladder kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteri İzolasyon ve İdentifikasyonu

E. coli izolasyonu için steril olarak alınan iç organ örneklerinden MacConkey agar ve EMB agarlara ekimler yapıp, 37°C’de 24 saatlik inkübe edildi. MacConkey agar’da pembe renkli ve EMB agarda metalik röfle veren laktoz pozitif koloniler değerlendirmeye alındı. Gram boyama, oksidaz ve katalaz testleri yapıldı (Koneman ve ark, 1997). İzolatlar DNA ekstraksiyonu yapıncaya kadar -20°C’de BHIB’a alınarak saklandı.

3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Genotipik olarak *E. coli* olduğu doğrulanan izolatlar Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)’nün önerdiği şekilde Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemi ile yapıldı. Bunun için izolatlar NB’da canlandırıldıktan sonra bakteri kültürü %0.9’luk NaCl içinde 0.5 McFarland (1×10^8 kob/ml) bulanıklığına eşit olacak şekilde ayarlandı. Bu süspansiyondan 0.1 ml alınarak sıvayla MHA yayıldı. Besiyeri kuruduktan sonra antibiyotik diskleri agar yüzeyi ile temas edecek şekilde ve aralarındaki mesafe 24 mm’den yakın olmayacak biçimde petrilere yerleştirildi. Daha sonra 35±2°C’de 18±2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir izolat için disk etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçülerek CLSI (2012)’nin belirlediği değerlendirme kriterlerine dayanılarak duyarlı (S) orta derecede duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak yorumlandı. Antibiyotik duyarlılık testinde ise kalite kontrol suşu olarak da *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı. Antibiyotik duyarlılık testlerinde yörede kanatlı hayvan hastalıklarının tedavisinde en çok kullanılan 9 antimikrobiale aileye (penisilin, beta laktamaz inhibitör, aminoglikozidler, tetrasiklin, florokinolonlar, folat yolu inhibitörleri, fosforik asit derivatları, fenikol, sefalosporin) ait 9 antibiyotik (ampisilin, amoksisilin klavulonik asit, gentamisin, doksisisiklin, siprofloksasin, trimetoprim sulfamethoksazol, fosfomisin, florfenikol, sefaleksim) incelendi. Bu çalışmada en az üç veya daha fazla antimikrobiyal ajan sınıfına karşı dirençlilik belirlendiği durumlarda bakteriler çoklu antibiyotik dirençli (MDR) olarak kabul edildiler (Bywater ve ark, 2006). Kullanılan antibiyotiklerin adı, disk içerikleri, etki mekanizmaları ve değerlendirme kriterleri Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4. Antibiyotikler, disk içerikleri, etki mekanizmaları ve değerlendirme kriterleri.

Antibiyotik adı	Disk içeriği (µg)	Grubu (Etki Mekanizması)	Yorum	
			R	S
Amoksisilin	25	Beta Laktam	<14	14≥
Amoksisilin Klavulanik Asit	20/10	Beta Laktamaz İnhibitör	<19	≥19
Doksisiklin	30	Tetrasiklin	≤10	≥ 14
TrimetoprimSulfametoksazol	1.25/23.75	Folat Yolu İnhibitörü	≤11	≥14
Siprofloksasin	5	Fluorokinolon	≤24	≥26
Gentamisin	10	Aminoglikozid	≤14	≥17
Fosfomisin	50	Fosforik Asit Derivatları	<24	≥24
Florfenikol	30	Fenikol	≤10	≥21
Sefaleksim	30	Sefalosporin	<14	≥14

3.2.3. DNA İzolasyonu ve Saflık Kontrolleri ve Miktar Tayinleri

Bu çalışmada DNA ekstraksiyonu sonikasyon metodu ile daha önce bildirildiği gibi yapıldı (Maniatis ve Sambrook, 1989). Bunun için, *E. coli* stok kültürlerinden EMB Agara pasajlanan izolatlar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Bu bakteri kültüründen bir koloni alınarak 5 ml Nutrient Broth'a geçildi. NB'da 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Beş dk 13500 rpmde santrifüj edilerek üst sıvı atıldı. Tortu 1 ml PBS ile bir ependorf tüp içerisinde (~10⁸/ml) sulandırıldı ve bu süspansiyonlar DNA ekstraksiyonunda kullanıldı. PBS ile sulandırılan bakteri süspansiyonu, 40 Hz'de 10 dakika sonikatörde (IsoLab) tutularak parçalandı ve sonikasyon yöntemi ile bakteri DNA'ile elde edilmiş oldu. Daha sonra süspansiyon 10 dk 13500 rpm de santrifüj edildi, üst sıvı alındı ve bu üst sıvıdan her PZR reaksiyonunda 3 µl template DNA olarak kullanıldı.

Ekstraksiyonu yapılan genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından %1'lik agaroz jel elektroforeziyle kontrol edildi. Daha sonra, Nonadrop (Maestro) cihazı ile DNA'ların 260 nm ve 280 nm'deki absorbansları hesaplanarak miktar tayinleri ve saflık kontrolleri yapıldı. OD260/OD280 oranının 1.8-2.0 arasında olması DNA'nın saf olduğunu, bu aralıktan daha aşağıda olması RNA kontaminasyonu olduğunu ve bu aralıktan daha yukarıda olması da protein kontaminasyonu olduğunu göstermektedir (Turner ve ark, 2004).

3.2.4. PZR

PZR amplifikasyon, elektroforez ve görüntüleme olmak üzere üç aşamada gerçekleştirildi. İzolatların çalışma materyali olarak kullanılabilmesi için öncelikle *E. coli* olup olmadıkları moleküler olarak da spesifik primerler (*usp*) kullanılarak gerçekleştirilen PZR ile doğrulandı. Moleküler olarak *E. coli* oldukları doğrulanan izolatlar çalışma materyali olarak kullanıldı. Bu izolatların virülens gen profilleri de yine PZR ile incelendi. Tüm PZR reaksiyonlarında mastermikler aşağıdaki gibi hazırlandı: Bir örnek için PZR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi için 1X, MgCl₂ için 2 mM, dNTP için 0.2 mM, primer (her biri için) için 0.4 pmol, Taq DNA polymerase 1.5 U olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve volümleri Tablo 5’de belirtilmiştir.

Tablo 5. Mastermiksin hazırlanma oranları.

Malzeme (Konsantrasyon)	İstenen Son Konsantrasyon	10 örnek (µl)
Buffer (10X)	1 X	50
MgCl₂ (25 mM)	2 mM	40
dNTP (10 mM)	0.2 mM	10
Primer-F (100 pmol)	0.4 pmol	2
Primer-R (100 pmol)	0.4 pmol	2
Taq Polimeraz (5 U)	0.3 µl/ 50 µl	3
dH₂O	Son miktara tamamlanır	393

Mastermikler hazırlandıktan sonra 0.2 mL’lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, tüplerin içine 47’şer µl hazırlanılan master miksten konuldu. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA’dan 3’er µl ilave edildi ve tüplerin ağızları sıkıca kapatıldıktan sonra sonra termal döngüleme cihazlarına (Boeco, Almanya) yüklenip, programlandı. DNA amplifikasyonu için cihaz 94°C’de 3 dk. başlangıç denatürasyonu takiben; 35 siklus 94°C’de 15 sn. denatürasyon, 48°C (*iss*), 51°C (*astA*, *papC*), 53°C (*iucD*, *tsh*), 57°C (*usp*, *vatA*, *colV*), 63°C (*iutA*) ve 67°C (*iroN*, *hylF*, *ompT*) 15 sn. bağlanma, 72°C 30 sn. uzama ve 72 °C’de 7 dk. son uzama ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrasında elde edilen amplikonlar safe view (ABM, Kanada) ilave edilmiş %2’lik agaroz jel elektroforezde yürütüldü. Bu genlere özgü DNA bantları UV transiluminatör yardımıyla görüntülenerek Tablo 3’de belirtildiği şekilde değerlendirildi.

3.2.5. APEC Değerlendirme Kriteri

APEC terimi, kanatlı kolibasillosisinden elde edilen *E. coli* izolatları için kullanılır (Nolan ve ark, 2013). Bu çalışmada, APEC'lerin 11 virülens geninin varlığı araştırılmıştır. Önceki çalışmalarda, virulent APEC suşlarının patojenite için kabul edilmiş genetik kriterlere göre en az beş VG taşıması gerektiğini bildirilmiştir (Ewers ve ark, 2005; De Carli ve ark, 2015). Buna göre, incelenen 11 virülens geninden en az 5 veya daha fazlasını taşıyan izolatlar virulent olarak değerlendirilerek bu izolatlar klinik APEC (cAPEC) ve 5'ten daha az virülens genine sahip izolatlar ise potansiyel APEC (pAPEC) olarak isimlendirildi.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

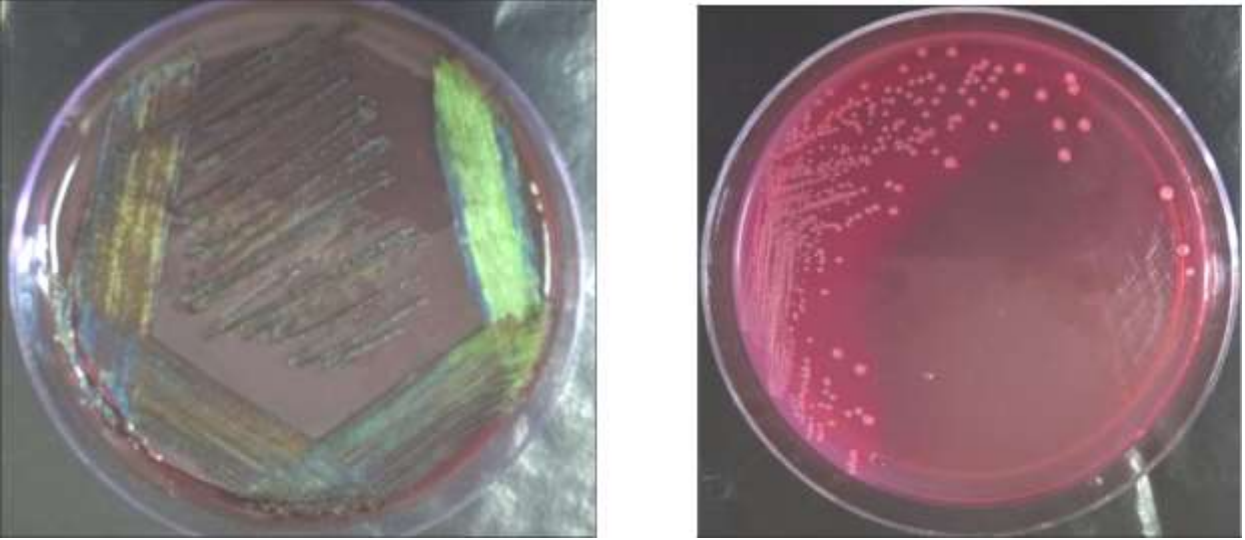
Verilerin analizinde Ki-Kare (χ^2) testinden faydalanıldı ve SPSS 22.0 paket programı kullanıldı. χ^2 testi ile pAPEC ve cAPEC izolatları arasındaki virülens genlerinin sıklığı karşılaştırıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, $P \leq 0.05$ olan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

4.1.1. Fenotipik

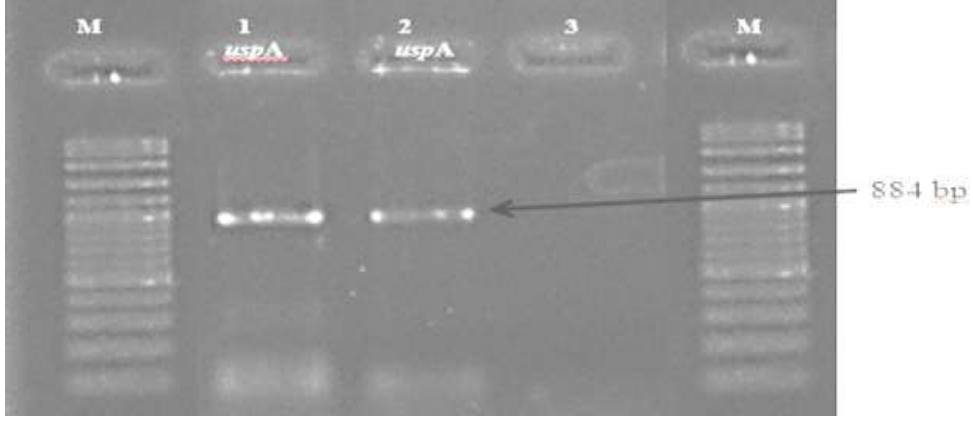
Bu çalışmada kolibasillozis şüpheli 173 broylerin iç organlarından yapılan mikrobiyolojik ekimler sonrasında MacConkey agarda laktoz fermentasyonu pozitif, EMB agarlarda metalik yeşil refle veren (Resim 2), Gram negatif kısa çomak şeklinde, oksidaz negatif, katalaz pozitif 140 (%80.1) izolat *E. coli* şüpheli olarak değerlendirildi. *E. coli* izolatlarının identifikasyonları genotipik olarak PZR ile yapıldı.



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

4.1.2. Genotipik

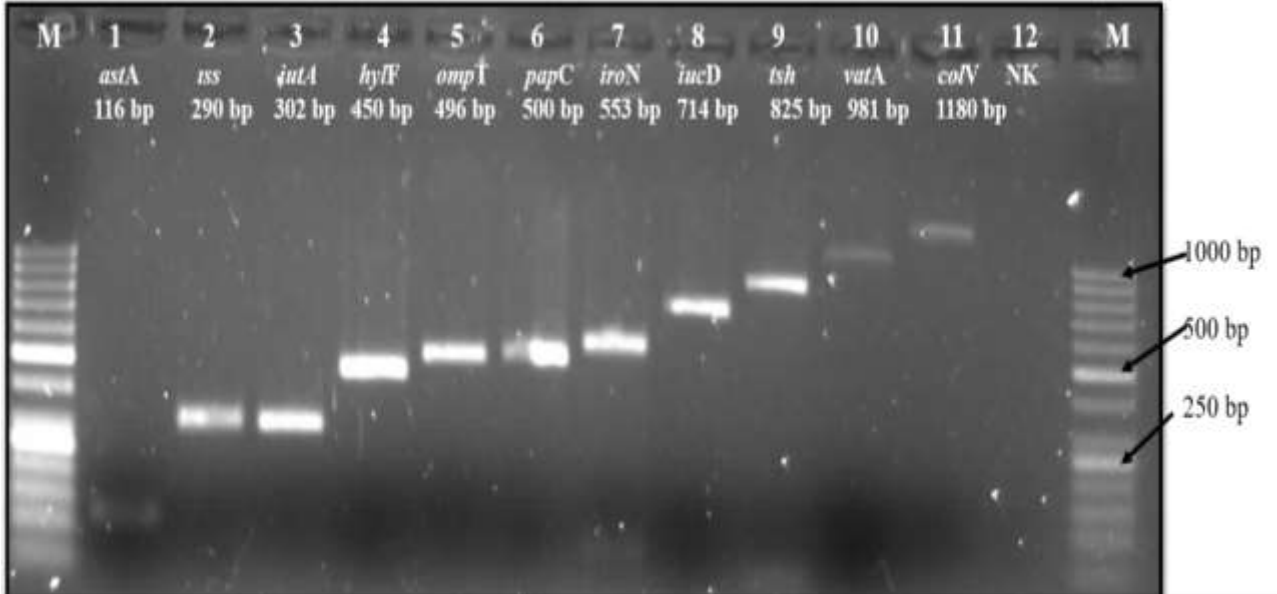
Yüzkırk *E. coli* şüpheli izolat ile türe özgü *uspA* primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonrasında 884 bp'lik ampikon elde edildi ve böylece tüm izolatların *E. coli* oldukları genotipik olarak da doğrulandı (Resim 3).



Resim 3. *E. coli* izolatlarının jel elektroforez görüntüsü **1.** *E. coli* ATCC 25922 (Pozitif kontrol) **2.** *E. coli* saha izolatu **3.** Negatif Kontrol (*E. faecalis* ATCC 25912 suşu) M: Marker (100 bp DNA Ladder).

4.2. Virülens Genotiplendirme

Bu çalışmada kolibasilozis şüpheli broyler iç organlarından elde edilen 140 *E. coli* izolatın 11 virülens geni [demir toplama sistemleri (*iroN*, *iutA*, *iucD*), toksinler (*hlyF*, *astA*, *vatA*), adezinler (*papC*, *tsh*), kolisin (*colV*), serumda sağ kalım (*iss*, *ompT*)] PZR ile incelendi (Resim 4).



Resim 4. APEC virülens genlerinin jel elektroforez görüntüsü **1.** *astA* (116 bp) **2.** *iss* (290 bp) **3.** *iutA* (302 bp) **4.** *hlyF* (450 bp) **5.** *ompT* (496 bp) **6.** *papC* (500 bp) **7.** *iroN* (553 bp) **8.** *iucD* (714 bp) **9.** *tsh* (825 bp) **10.** *vatA* (981 bp) **11.** *colV* (1180 bp) gen pozitif izolatlar **12.** Negatif Kontrol (DNA'sız master miks) **M:** 50 bp DNA ladder (Fermentas).

Patojenite için tanımlanmış olan genetik kriterlere göre en az 5 VG içeren virulent izolatlar cAPEC ve beşden az VG içeren izolatlar ise pAPEC olarak değerlendirildi (Ewers ve ark, 2005; De Carli ve ark, 2015). Bu değerlendirmeye göre, 140 APEC izolatının 86 (%61.4)'sı cAPEC ve 54 (%38.6)'ü pAPEC olarak değerlendirildi (Tablo 6).

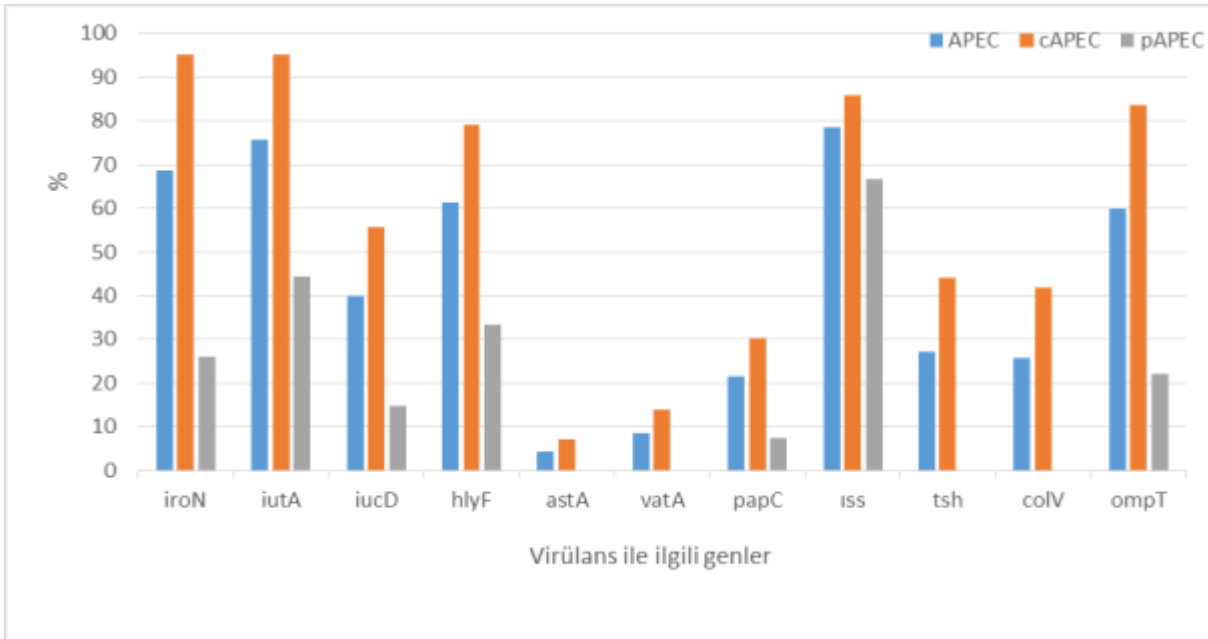
Tablo 6. İzolatların taşıdıkları virülens gen sayıları ve değerlendirme.

Virülens gen sayısı	İzolat Sayısı (%)	APEC (n=140) (%)	Değerlendirme
-	2 (1.4)		
1	14 (10.0)		
2	20 (14.3)	54	pAPEC
3	10 (7.2)	(38.6)	
4	8 (5.7)		
5	28 (20.0)		
6	24 (17.3)		
7	22 (15.7)	86	cAPEC
8	4 (2.8)	(61.4)	
9	6 (4.2)		
10	2 (1.4)		

Toplam 140 APEC izolatının 11 virülens geninin incelenmesi sonucunda izolatların sırasıyla: 110 (%78.6)'u *iss*, 106 (%75.7)'sı *iutA*, 96 (%68.6)'sı *iroN*, 86 (%61.4)'sı *hylF*, 84 (%60.0)'ü *ompT*, 56 (%40.0)'sı *iucD*, 38 (%27.1)'i *tsh*, 36 (%25.7)'sı *colV*, 30 (%21.4)'u *papC*, 12 (%8.6)'si *vatA*, 6 (%4.3)'sı da *astA* genini taşıyordu (Tablo 7, Şekil 3).

Tablo 7. APEC, cAPEC ve pAPEC izolatlarının virülens gen dağılımları.

	APEC (n=140) (%)	cAPEC (n=86) (%)	pAPEC (n=54) (%)
<i>iutA</i>	106 (75.7)	82 (95.3)	24 (44.4)
<i>iroN</i>	96 (68.6)	82 (95.3)	14 (25.9)
<i>iucD</i>	56 (40.0)	48 (55.8)	8 (14.8)
<i>hlyF</i>	86 (61.4)	68 (79.1)	18 (33.3)
<i>vatA</i>	12 (8.6)	12 (14.0)	0 (00.0)
<i>astA</i>	6 (4.3)	6 (7.0)	0 (00.0)
<i>tsh</i>	38 (27.1)	38 (44.2)	0 (00.0)
<i>papC</i>	30 (21.4)	26 (30.2)	4 (7.4)
<i>iss</i>	110 (78.6)	74 (86.0)	36 (66.7)
<i>ompT</i>	84 (60.0)	72 (83.7)	12 (22.2)
<i>colV</i>	36 (25.7)	36 (41.9)	0 (00.0)



Şekil 3. APEC, cAPEC ve pAPEC izolatlarının virülens gen dağılımlarının karşılaştırılması.

Toplam 86 cAPEC izolatının 82 (%95.3)'si *iutA*, 82 (%95.3)'si *iroN*, 74 (%86.0)'ü *iss*, 72 (%83.7)'si *ompT*, 68 (%79.1)'i *hlyF*, 48 (%55.8)'i *iucD*, 38 (%44.2)'i *tsh*, 36 (%41.9)'sı *colV*, 26 (%30.2)'sı *papC*, 12 (%14.0)'sı *vatA*, 6 (%7.0)'sı *astA* genini taşıyordu (Tablo 7, Şekil 3). cAPEC olarak değerlendirilen 86 izolat 30 virülens genotipi mevcuttu. 86 izolatın 28'i 5, 24'ü 6, 22'si 7, 4'ü 8, 6'sı 9, 2'i 10 virülens geni taşıyordu (Tablo 8).

Tablo 8. cAPEC izolatlarının virülens gen profilleri.

Genotip Sayısı	Virülens Genotipi	Virülens gen sayısı	İzolat Sayısı
1	<i>hylF, iucD, iutA, iroN, ompT</i>	5	2
2	<i>hylF, iucD, iutA, iroN, iss</i>	5	2
3	<i>iucD, iutA, iroN, ompT, iss</i>	5	2
4	<i>astA, hylF, iroN, ompT, iss</i>	5	2
5	<i>hylF, iutA, iroN, ompT, iss</i>	5	4
6	<i>tsh, iutA, iroN, ompT, iss</i>	5	2
7	<i>tsh, hylF, iutA, ompT, iss</i>	5	2
8	<i>tsh, iutA, iroN, ompT, iss</i>	5	2
9	<i>papC, hylF, iutA, ompT, iss</i>	5	2
10	<i>papC, vatA, hylF, iroN, iss</i>	5	2
11	<i>colV, iutA, iroN, ompT, iss</i>	5	6
12	<i>colV, hylF, iucD, iutA, iroN, ompT</i>	6	4
13	<i>tsh, hylF, iucD, iutA, iroN, ompT</i>	6	2
14	<i>hylF, iucD, iutA, iroN, ompT, iss</i>	6	4
15	<i>papC, hylF, iucD, iutA, iroN, iss</i>	6	2
16	<i>tsh, hylF, iucD, iutA, iroN, iss</i>	6	2
17	<i>astA, hylF, iucD, iutA, iroN, ompT</i>	6	2
18	<i>colV, astA, iutA, iroN, ompT, iss</i>	6	2
19	<i>colV, hylF, iutA, iroN, ompT, iss</i>	6	4
20	<i>tsh, papC, hylF, iutA, iroN, ompT</i>	6	2
21	<i>papC, hylF, iucD, iutA, iroN, ompT, iss</i>	7	2
22	<i>colV, hylF, iucD, iutA, iroN, ompT, iss</i>	7	4
23	<i>vatA, hylF, iucD, iutA, iroN, ompT, iss</i>	7	2
24	<i>tsh, hylF, iucD, iutA, iroN, ompT, iss</i>	7	6
25	<i>tsh, papC, hylF, iucD, iutA, iroN, iss</i>	7	4
26	<i>tsh, papC, colV, iutA, iroN, ompT, iss</i>	7	4
27	<i>tsh, colV, hylF, iucD, iutA, iroN, ompT, iss</i>	8	4
28	<i>tsh, papC, colV, vatA, hylF, iucD, iutA, iroN, iss</i>	9	2
29	<i>tsh, papC, colV, vatA, hylF, iutA, iroN, ompT, iss</i>	9	4
30	<i>tsh, papC, colV, vatA, hylF, iucD, iutA, iroN, ompT, iss</i>	10	2

Toplam 54 pAPEC izolatının 36 (%66.6)'sı *iss*, 24 (%44.4)'ü *iutA*, 18 (%33.3)'i *hylF*, 14 (%25.9)'ü *iroN*, 12 (%22.2)'si *ompT*, 8 (%14.8)'i *iucD*, 4 (%7.4)'ü *papC* genini taşıyordu. pAPEC izolatlarının hiç birisi *tsh*, *colV*, *vata*, *astA* genini taşımıyordu (Tablo 8, Şekil 3). pAPEC olarak değerlendirilen 54 izolat 17 virülens genotipi taşıdığı saptanırken; bu izolatlardan 2'si herhangi bir virülens genine sahip değildi. Geriye kalan 52 izolatın 14'ü 1, 20'si 2, 10'u 3, 8'i 4 virülens geni taşıyordu (Tablo 9).

Tablo 9. pAPEC izolatlarının virülens gen profilleri.

Genotip Sayısı	Virülens Genotipi	Virülens gen sayısı	İzolat Sayısı
1	-	0	2
2	<i>iss</i>	1	10
3	<i>iutA</i>	1	4
4	<i>hylF</i> , <i>iroN</i>	2	2
5	<i>hylF</i> , <i>iss</i>	2	2
6	<i>ompT</i> , <i>iss</i>	2	2
7	<i>iroN</i> , <i>iss</i>	2	4
8	<i>iutA</i> , <i>iss</i>	2	4
9	<i>hylF</i> , <i>iutA</i>	2	6
10	<i>iucD</i> , <i>iutA</i> , <i>iss</i>	3	4
11	<i>hylF</i> , <i>iroN</i> , <i>ompT</i>	3	2
12	<i>papC</i> , <i>ompT</i> , <i>iss</i>	3	2
13	<i>hylF</i> , <i>iutA</i> , <i>iss</i>	3	2
14	<i>hylF</i> , <i>iroN</i> , <i>ompT</i> , <i>iss</i>	4	2
15	<i>iucD</i> , <i>iutA</i> , <i>ompT</i> , <i>iss</i>	4	2
16	<i>hylF</i> , <i>iucD</i> , <i>iutA</i> , <i>iroN</i>	4	2
17	<i>papC</i> , <i>iroN</i> , <i>ompT</i> , <i>iss</i>	4	2

4.3. İstatistiksel Analiz

cAPEC ve pAPEC izolatları arasındaki virülens genlerinin sıklığını karşılaştırmak için Ki-Kare (χ^2) testi kullanıldı.

Tablo 10. cAPEC ve pAPEC izolatlarında virülens gen dağılımının karşılaştırılması.

Gen	APEC (n=140)		cAPEC (n=86)		pAPEC (n=54)		P	χ^2
	+	-	+	-	+	-		
<i>iroN</i>	96	44	82	4	14	40	0.000***	74.183
<i>iutA</i>	106	34	82	4	24	30	0.000***	46.746
<i>iucD</i>	56	84	48	38	8	46	0.000***	23.233
<i>hlyF</i>	86	54	68	18	18	36	0.000***	29.285
<i>astA</i>	6	134	6	80	0	54	0.047*	3.936
<i>vatA</i>	12	128	12	74	0	54	0.004***	8.241
<i>papC</i>	30	110	26	60	4	50	0.001***	10.264
<i>tsh</i>	38	102	38	48	0	54	0.000***	32.75
<i>colV</i>	36	104	36	50	0	54	0.000***	30.429
<i>iss</i>	110	30	74	12	36	18	0.007**	7.400
<i>ompT</i>	84	56	72	14	12	42	0.000***	52.274

İstatistiksel analiz, cAPEC ve pAPEC suşları arasında tüm virülens genlerinin dağılımının önemli olduğunu gösterdi. pAPEC'lere kıyasla cAPEC izolatları arasında beş virülens geninin yüksek frekansı (*iss*, *ompT*, *hlyF*, *iroN* ve *iucD*) saptandı (Tablo 10).

4.4. Antibiyotik Dirençlilik

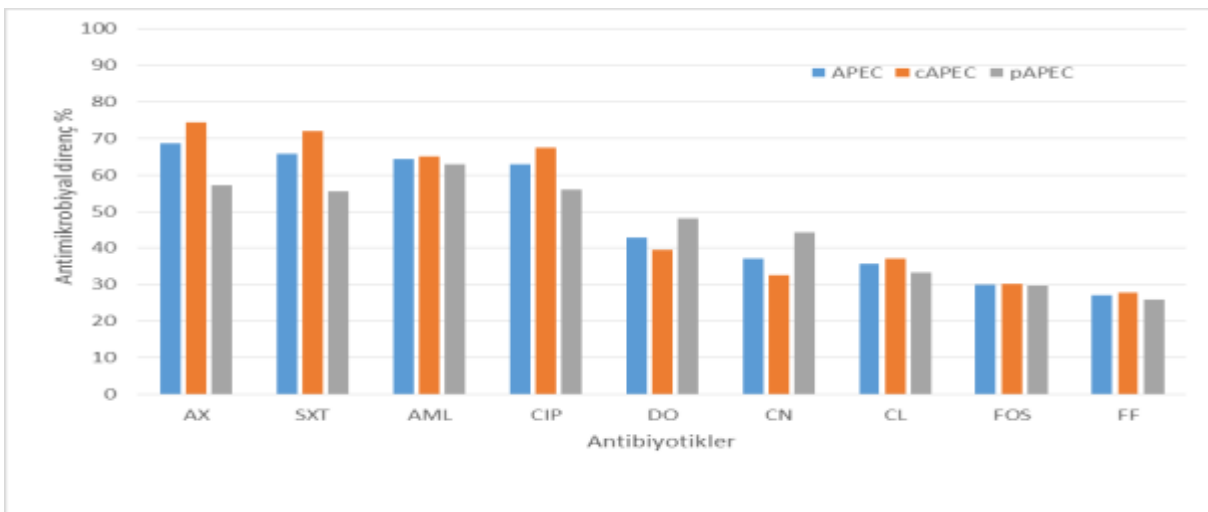
Tüm APEC izolatlarının 96 (%68.6)'sı amoksisiline, 92 (%65.7)'si trimetoprim sulfamethoksazol, 90 (%64.3)'ü amoksisilin klavulanik asite, 88 (%62.9)'ü siprofloksasine, 60 (%42.9)'ü doksisisikline, 52 (%37.1)'i gentamisine, 50 (%35.7)'si sefaleksine, 42 (%30.0) fosfomisine, 38 (%27.1)'i florfenikole dirençli tespit edildi (Tablo 11, Şekil 4).

Seksen altı cAPEC izolatının 64 (%74.4)'ü amoksisiline, 62 (%72.1)'i trimetoprim sulfamethoksazol, 58 (%67.4)'i siprofloksasine, 56 (%65.1)'i amoksisilin klavulanik asite, 34 (%39.5)'ü doksisisikline, 32 (%37.2)'si sefaleksine, 28 (%32.6)'sı gentamisine, 26 (%30.2)'sı fosfomisine, 24 (%27.9)'ü florfenikole dirençli tespit edildi (Tablo 11, Şekil 4).

Elli dört pAPEC izolatının 32 (%57.1)'si amoksisiline, 34 (%63.0)'ü amoksisilin klavulanik asite, 30 (%55.6)'ü trimetoprim sulfamethoksazol ve siprofloksasine, 26 (%48.1)'sı doksisisikline, 24 (%44.4)'ü gentamisine, 18 (%33.3)'i sefaleksine, 16 (%29.6)'sı fosfomisine, 14 (%25.9)'ü florfenikole dirençli tespit edildi (Tablo 11, Şekil 4).

Tablo 11. Tüm izolatların antibiyotiklere duyarlılık ve direnç durumları.

Antibiyotik	Toplam (n=140, %100.0)		cAPEC (n=86, %61.4)		pAPEC (n=54, %38.6)	
	R	S	R	S	R	S
Amoksisilin	96 (68.6)	42 (30.0)	64 (74.4)	22 (25.6)	32 (57.1)	20 (35.7)
Trimetoprim	92 (65.7)	44 (31.4)	62 (72.1)	24 (27.9)	30 (55.6)	20 (35.7)
Sulfametoksazol	90 (64.3)	36 (25.7)	56 (65.1)	22 (25.6)	34 (63.0)	14 (25.9)
Amoksisilin Klavulanik	88 (62.9)	36 (25.7)	58 (67.4)	22 (25.6)	30 (55.6)	14 (25.9)
Doksisiklin	60 (42.9)	70 (50.0)	34 (39.5)	46 (53.5)	26 (48.1)	24 (44.4)
Gentamisin	52 (37.1)	78 (55.7)	28 (32.6)	54 (62.8)	24 (44.4)	24 (44.4)
Sefaleksim	50 (35.7)	66 (47.1)	32 (37.2)	36 (41.9)	18 (33.3)	30 (55.6)
Fosfomisin	42 (30.0)	88 (62.6)	26 (30.2)	54 (62.8)	16 (29.6)	34 (63.0)
Florfenikol	38 (27.1)	80 (57.1)	24 (27.9)	48 (55.8)1	14 (25.9)	32 (57.1)

**Şekil 4.** APEC, cAPEC ve pAPEC izolatlarının antibiyotik direnç oranları.

4.1.1. cAPEC ve pAPEC İzolatlarında Çoklu Antibiyotik Dirençlilik Durumularının Karşılaştırılması

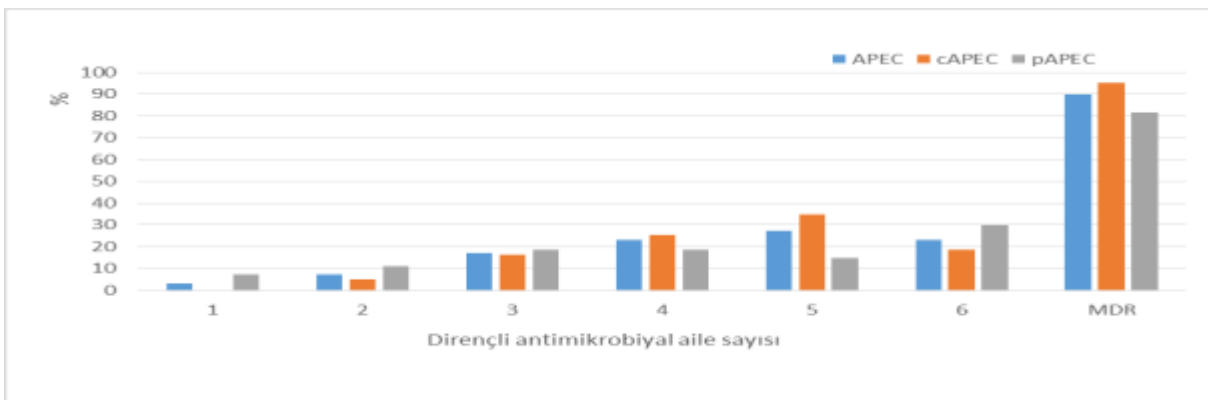
Toplam 140 APEC izolatının 4 (%2.98)'ü bir, 10 (%7.1)'u iki, 24 (%17.1)'ü üç, 32 (%22.9)'si dört, 38 (%27.1)'i beş, 32 (%22.9)'si altı antibiyotiğe dirençli iken; izolatların 126 (%90.0)'sı çoklu antibiyotik direncine sahip idi (Tablo 12, Şekil 5).

Toplam 86 cAPEC izolatının 4 (%4.6)'ü iki, 10 (%7.1)'u iki antibiyotiğe1 (%16.3)'ü üç, 22 (%25.5)'si dört, 30 (%34.8)'i beş, 16 (%18.5)'sı altı antibiyotiğe dirençli iken; izolatların 82 (%95.1)'si çoklu antibiyotik dirençli idi (Tablo 12, Şekil 5).

Toplam 54 pAPEC izolatının 4 (%7.4)'ü bir, 6 (%11.1)'sı iki, 10 (18.5) üç ve dört, 8 (%14.8)'i beş, 16 (29.7)'sı altı antibiyotiğe dirençli iken; 44 (%81.5)'ü izolatta çoklu antibiyotik direnci mevcut idi (Tablo 12, Şekil 5).

Tablo 12. APEC, cAPEC ve pAPEC izolatlarının antibiyotik dirençlilik durumları.

Antimikrobiyal Aile Sayısı	APEC (n=140) (%)	cAPEC (n=86) (%)	pAPEC (n=54) (%)
1	4 (2.9)	-	4 (7.4)
2	10 (7.1)	4 (4.9)	6 (11.1)
3	24 (17.1)	14 (16.3)	10 (18.5)
4	32 (22.9)	22 (25.5)	10 (18.5)
5	38 (27.1)	30 (34.8)	8 (14.8)
6	32 (22.9)	16 (18.5)	16 (29.7)
MDR Sayısı	126 (90.0)	82 (95.1)	44 (81.5)



Şekil 5. APEC, cAPEC ve pAPEC izolatlarında dirençli antimikrobiyal aile oranları.

5. TARTIŞMA

Modern kümes hayvanları üretim uygulamaları bulaşıcı hastalıkların ortaya çıkması ve yayılması için uygun şartlar sağlamaktadır. Kolibasillozis, *E. coli*'nin neden olduğu lokalize veya sistemik bir enfeksiyondur ve yurdumuzda olduğu kadar (Ocak ve ark, 2018) sıklıkla dünyanın başlıca kümes hayvanı üreten ülkelerinde bildirilmektedir (Mohamed ve ark, 2014; Vhm ve ark, 2017; Subedi ve ark, 2018; Azam ve ark, 2019). Ekstraintestinal hastalık ile karakterize olan kolibasillozis genellikle 3 ila 12 haftalık broyler tavuklarında görülür ve hastalığın ciddiyetine bağlı olarak %20-%40 ölümden sorumludur (Nolan ve ark, 2013).

Kolibasillozis, enfekte eden bakteri olan *E. coli*'nin, konakçıda adezyon ve çoğalmasına imkan veren spesifik genler tarafından kodlanan virülens faktörleri ortaya çıktığında görülür. APEC izolatlarının karakterizasyonu, kolibasillozisin patogenezi anlamak ve hastalık için etkili önleme ve kontrol stratejilerine ulaşmak için gereklidir (Lutful Kabir, 2010). APEC izolatlarını tanımlamak için tanısal stratejiler *E. coli*'nin çeşitli virülens genlerinin saptanmasına dayanmıştır (Schouler ve ark, 2012). Yurdumuzda APEC ve bunların sahip oldukları virülens faktörlerinin belirlenmesi amacı ile az sayıda çalışma yapılmıştır ve APEC izolatlarının virülens genotipleri hakkında spesifik bilgi bulunmadığından, kolibasillozun kontrolünün başarısını tahmin etmek de zordur. Bu nedenle bu çalışmada APEC ile ilişkili önemli 11 virülens gen [sideroforlar (*iucD*, *iroN*, *iutA*), toksinler (*astA*, *vatA*, *hlyF*), adezinler (*papC*, *tsh*), serum direncini (*iss*, *ompT*) ve kolisin (*colV*)] ve izolatların antibiyotik direnç profillerinin incelenmesi amaçlandı.

Bu çalışmada kolibasillozis şüpheli broylerlerden %80.1 (140/171) *E. coli* izole edildi. Bu oran, daha önce yapılmış olan çalışmalarda, %100.0 (Subedi ve ark, 2018) ile %53.4 (Ibrahim ve ark, 2019) arasında değişmektedir. Örneklerin %19.9 (31/171)'inden etken izolasyonu yapılamadı. Bu durumun muhtemel iki nedeni olabilir: çalışmada materyal alınan broylerlere antibiyotik kullanılmış olabilir veya bu kanatlılar viral bir solunum sistemi hastalığı geçiriyor olabilirler.

Kolibasillozis, sadece APEC olarak bilinen *E. coli*'nin patojenik suşları ile enfekte olan kanatlılarda görülür. Kanatlı hayvanlardan elde edilen çoğu APEC, sadece kuşlara bulaşan ve insanlar veya diğer hayvanlar için düşük bir hastalık riskini temsil eden patojenler olarak tanımlanmış spesifik klonal tiplerdir. Bununla birlikte, bu mikroorganizmalar, herhangi bir türün (genellikle ekstra-intestinal patojenik *E. coli*, ExPEC olarak bilinir) bağırsak yolları

dışındaki hastalıklarla ilişkili diğer *E. coli* suşları ile ortak özellikleri paylaşırlar. Buna karşın, patojenik olmayan suşlar (AFEC) kolibasilozisli olmayan kanatlılar da dahil olmak üzere sindirim sisteminde bulunur (Johnson ve ark, 2008). Patojenik suşların, kromozomal veya daha sıklıkla plazmid yerleşimli patojenite adalarında kümelenmiş kendine özgü bir gen kümesine sahip olduğu ve dışkıdan izole edilen suşlardan farklı olduğunu gösterilmiştir (Johnson ve ark, 2008). Bu patojenite genleri virülens faktörleri olarak adlandırılır ve kolibasiloz ile ilişkili *E. coli* suşlarında bulunmaktadır (Knöbl ve ark, 2008).

Kanatlı kolibasilozisinin tanısı, etkilenen dokulardaki klinik bulgulara, tipik patolojik lezyonlara ve *E. coli* kültürüne dayanır. APEC izolasyon yönteminin ana sıkıntısı, tüm kanatlılarda fekal suşların varlığı olup, bazı durumlarda patojenik olmayan *E. coli*'nin izolasyonu ve karakterizasyonu ile sonuçlanmasıdır. Daha önce yapılan araştırmalarda APEC tanımlanmış ve APEC'in tanımlanmasında moleküler markerler olarak kullanılabilir VG incelenmiştir. İlk olarak, 38 çalışılan genin 9'unun (*iutA*, *iss*, *ompT*, *iroN*, *tsh*, *cvaC*, *sitA*, *fyuA*, *irp-2*), APEC'de AFEC izolatlarına göre daha sık olduğu gösterilmiştir (Rodriguez-Siek ve ark, 2005). Yazarlar ayrıca *E. coli* suşlarının APEC olarak değerlendirilebilmesi için genetik kriterlere en az 5 virülens genine sahip olması gerektiğini de önermişlerdir (Ewers ve ark, 2005; De Carli ve ark, 2015). Başka bir çalışmada ise daha kapsamlı olarak 46 gen araştırılmış ve sonuçlar virülens ile daha fazla ilişkili olan beş genininin (*iroN*, *iutA*, *iss*, *hlyF* ve *ompT*) hepsini birlikte taşıyan APEC izolatlarının virülensinin yüksek olduğunu göstermiştir (Johnson ve ark, 2008).

Demir *E. coli* sağkalımı için vazgeçilmez bir elementtir. Düşük demir konsantrasyonu APEC'yi demir alım proteinlerini sentezlemeye zorlar. Demir alım genleri ayrıca reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini önleyerek immün hücrelerde oksidatif strese karşı yüksek direnç sağlar (Janßen ve ark, 2001). Hayvanlarda demir, manganez, çinko ve diğer besinler, laktoferrin ve transferrin gibi çeşitli depolama moleküllerinde tutulur ve bu da onları patojenlere karşı kullanılamaz hale getirir. Enfeksiyon sırasında polimorfonükleer lökositler (PML) laktoferrin üretimini düzenler. Bu, bakteriler için mevcut olan serbest demiri azaltır ve PML için laktoferrin içeren demir mevcudiyetini artırır. Laktoferrin-demir kompleksi, immün hücrelerde önemli bir rolü olan ROS üretimini indükler. Ekstraintestinal enfeksiyon bölgelerinde demir düşük konsantrasyonlarda mevcut olduğu için APEC suşları, konakçıdan demiri ayırmak için birçok strateji geliştirmiştir (Lynne ve ark, 2006). Dahası, demir kazancı bakterileri konak humoral bağışık yanıtından korur ve bu genlerin birikmesi APEC enfeksiyonu için potansiyel bir risk faktörüdür (Janßen ve ark, 2001). Bu nedenlerden dolayı, birden fazla demirle ilgili genin bakteride bulunması APEC'in farklı koşullarda hayatta

kalmasını sağlayabilir. APEC'nin çoğunda demir ile ilişkili genlerin ortaya çıkması, ayrıca demir edinme proteinlerinin APEC patojenitesinde, özellikle sepsise neden olan bakterilerde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Paixao ve ark, 2016).

İlk olarak ishal ajanı olarak bilinen EAEC suşlarında görülen EAST1 (enteroagregatif *E. coli* ısıya dayanıklı enterotoksin 1 için) toksinini *astA* geni kodlar. EAST1'in patogenezdaki rolü tam olarak belirlenememiş olmasına rağmen, bu toksinin varlığı APEC izolatlarında bildirilmiştir (Ménard ve Dubreuil, 2002).

P fimbria, piyelonefrit ilişkili pilus (*pap*) operon tarafından kodlanır, a-D-galaktopiranosil-1,4-p-D-galaktopiranosid reseptörleri ile etkileşir (Lane ve Mobley, 2007) ve *papC* geni kromozomal bir patojenite adasında bulunur (Janßen ve ark, 2001). Bir başka adezin olan sıcaklığa duyarlı hemaglutinin (*tsh*), kırmızı kan hücrelerine yapışan ve ayrıca hücre dışı matriks proteinlerine bağlanan bir ototransporter proteindir. En başta kanatlı eritrositlerinin aglütinasyonuna neden olan, hava akıntısı ve kolistisemiye yol açan enfeksiyonlardan sorumludur (Nolan ve ark, 2013).

Serumda hayatta kalma ve üreyebilme kabiliyeti, serbest demir konsantrasyonunun son derece düşük olduğu durumlarda APEC suşları için önemli bir virülens belirleyici gibi görünmekte ve kolibasiloz patogenezinde rol oynamaktadır (Nolan ve ark, 2013).

Bu çalışmada tespit edilen virülens genlerinin sıklığı diğer çalışmalarla karşılaştırılabilir. Kwon ve ark. tarafından 2008 yılında yapılmış bir çalışmada 18 APEC suşunda sekiz genin varlığını araştırmış ve virülens genlerinin sıklığını şu şekilde bulmuştur: *iss* (%100), *tsh* (%94), *vat* (%89), *iucD* (%83), *astA* (%56), *cva/cvi* (%16) ve *papC* (%11) (Kwon ve ark, 2008). Başka bir çalışmada De Carli ve ark. (2015) APEC suşları arasında yüksek sıklıkta virülens genleri (*hlyF* %100, *iroN* % 98.8, *ompT* %100, *iss* %96.3, *iutA* %81.5) bildirmiştir. Daha önceki yapılmış çalışmalara (Johnson ve ark, 2008b; De Carli ve ark, 2015) paralel olarak bu çalışmada da APEC izolatları arasında serumda sağ kalım, toksin ve demir kazanımı ile ilgili beş virülens geninin yüksek frekansı (*iss*, *ompT*, *hlyF*, *iroN* ve *iucD*) saptandı.

Bu çalışmada, cAPEC ve pAPEC izolatları arasında on bir virülens geninin sıklığı ve bu genlerin izolatların patojenitesindeki rolleri değerlendirildi. Virülensla ilişkili genlerin, pAPEC izolatlarına kıyasla cAPEC suşları arasında daha sık görüldüğü saptandı. APEC suşlarında en yüksek oranda bulunan altı gen *iss* (%78.6), *iutA* (%75.7), *hlyF* (%61.4), *ompT* (%60.0), *iucD* (%40.0) olmakla birlikte; hepsi, virülensı yüksek olan cAPEC izolatlarında daha yüksek oranda bulunuyordu ve bu genlerin hepsi virülensı daha düşük olarak kabul edilen pAPEC izolatlarında da mevcuttu. Bu altı genin cAPEC izolatlarında yüksek oranlarda bulunması bu

genlerin virülens katkıda bulunduğunu ve bu genlerin diğer temel virülens özelliklerini desteklediğini göstermektedir. Ek olarak, hem cAPEC'de hem de pAPEC'de *papC* tespit oranı daha düşüktü. Her ne kadar P fimbria, bakterinin konağın savunmasını kaçırmayı teşvik etse de, APEC için temel bir virülens özelliği olmayabilir (Vandekerchove ve ark, 2005). Öte yandan *tsh* (%27.1), *colV* (%25.7), *vatA* (%8.6), *astA* (%4.3) genlerinin yalnızca yüksek virulent olarak kabul edilen cAPEC izolatlarında bulunması ancak pAPEC izolatlarında bulunmaması bu dört genin cAPEC izolatlarının temel virülens özellikleri olarak çok önemli olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, on bir virülens geni, cAPEC izolatlarında 30 pAPEC izolatlarında ise 17 farklı virülens genotipi taşıyordu.

E. coli suşları hem insan ve hayvanlarda fizyolojik mikrobiyotanın bir parçasıdır aynı zamanda aynı zamanda sıklıkla antimikrobiyal direnç de kazanmaktadırlar (Aarestrup ve ark, 2008). Antibiyotik direnci, küresel halk sağlığı için ciddi bir sorun teşkil etmekte olup, hayvan sağlığı ve gıda güvenliği üzerinde önemli bir etkiye neden olmaktadır (Aarestrup, 2004). Antimikrobiyal ajanların yanlış kullanımı, antibiyotik direnç oranının artmasıyla dirençli mikroorganizmaların seçilmesine yol açabilmektedir. Kanatlı hayvan endüstrisi geniş bir yelpazede büyüme destekçisi ve hastalık önleyici olarak antibiyotikler tüketmektedir, çünkü kullanımlarını sadece birkaç düzenleme kontrol etmektedir. Bununla birlikte, ayırt edici olmayan antibiyotik kullanımı, ilaç dirençli suşların ortaya çıkması için seçici bir baskı sağlamıştır ve yetiştiriciler için tedavi başarısızlığına ve potansiyel ekonomik kayıplara yol açabilir (Shrestha ve ark, 2017).

Penisilinler, folat yolu inhibitörleri, tetrasiklinler, kinolonlar, sulfonamidler, broyler sürülerinde *E. coli* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılırlar (Zhao ve ark, 2005). Çeşitli çalışmalarda hayvanlardan izole edilen antibiyotik dirençli bakterilerin doğrudan temas, etin veya çevresel yolların kontaminasyonu yoluyla insanlara da bulaşabileceği vurgulanmıştır (Woolhouse ve ark, 2014). Genel endişe, hayvanlarda uygulanan antibiyotiklerin insanlarda terapötik faydası olan durumlara da etkisi olacağı yönündedir. Antibiyotik direnci açısından ülkeler ve hatta bölgeler arasında farklılıklar vardır. Broylerlerden elde edilen APEC'lerin antimikrobiyal direnç profillerindeki farklılıklar her coğrafi bölgedeki antimikrobiyal ilaç kullanım alışkanlıklarının farklı olmasından kaynaklanabilir.

Bu çalışmada, incelenen dokuz antibiyotikten, hiçbiri APEC izolatlarına karşı %100 etki göstermedi. APEC izolatlarının en yüksek (%68.6) amoksisiline ve en düşük (%27.1) florfenikole dirençli olduğu tespit edildi. Test edilen APEC izolatları trimethoprim sulfamethoksazol, amoksisilin klavulanik asitve siprofloksasine %60'dan fazla yani yüksek

seviyede dirençliydi. Doksisisiklin, gentamisin, sefaleksin, fosfomisin ve florfenikol dirençleri ise orta düzeyde idi. *E. coli* suşlarının bu antibiyotik direnç oranları önceki çalışmalardan biraz düşük olamakla birlikte uyumludur (Subedi ve ark, 2018; Ibrahim ve ark, 2019).

Hem hayvanlarda hem de insan hastalıklarında tedavi sorunlarına yol açan MDRne sahip olan patojenler önemli bir sorundur (Collignon ve ark, 2005). Bu çalışmada APEC izolatlarının %90.0 (cAPEC izolatlarının %95.1'i ve pAPEC %81.5'i) MDR idi. APEC'deki MDR yaygınlığı Kore'de (Kim ve ark, 2007), Bangladeş (Martin ve ark, 2017) ve Nepal (Subedi ve ark, 2018)'de yapılmış olan çalışmalarla da bildirilmiştir. Bu durum, profilaksi veya enfeksiyon için antibiyotiklerin ayrımcı olmayan ve kötü amaçlı bir şekilde uygulanmasının güçlü bir göstergesidir.

Özet olarak, diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında bu çalışmada hem virülens gen (Kwon ve ark, 2008; De Carli ve ark, 2015; Subedi ve ark, 2018) hem de antibiyotik direnç (Martin ve ark, 2017; Subedi ve ark, 2018) paternlerindeki farklı bulgular, izolatların elde edildiği coğrafi bölgelerin farklılığından ve farklı klinik tablolardan izole edilmesinden kaynaklanabilir.

Özellikle MDRne sahip APEC'i kontrol etmek önemlidir çünkü bu suşlar çoklu ilaç direnç genlerinin insana özgü *E. coli*'ye veya *Staphylococcus aureus* ve *Shigella* suşları gibi diğer bakterilere aktarılması için potansiyel bir kaynak olduğundan, hem insanlar hem de diğer evcil hayvanlara ciddi tehlike oluşturur (Ewers ve ark, 2005). Bu patojen günlük tüketilen gıdalarla da doğal olarak bulaşabildiğinden ciddi bir halk sağlığı ve gıda biyogüvenliği sorunu olarak düşünülmelidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada kolibasillozis şüpheli broylerlerden yüksek oranda (%80.1) *E. coli* izolasyonu yapılmış olması, materyal alınan işletmelerde *E. coli*'nin solunum sistemi hastalıklarının epidemiyolojilerinde önemli role sahip olduğunu ortaya koymuştur.

E. coli'nin fenotipik olarak identifikasyonu pratik ve kolay olmakla birlikte etkenin tür düzeyinde identifikasyonunun doğrulanmasında moleküler yöntemlerin kullanılması faydalıdır.

Kolibasillozun tanısı rutin olarak patolojik incelemelere, klinik belirtilere ve örneklerden *E. coli*'nin izolasyonuna dayanmaktadır. Bu geleneksel araştırma yaklaşımları her zaman patojenik olmayan *E. coli*'yi rapor etme riski taşır. cAPEC izolatlarını hızlı bir şekilde ayırt etmek için PZR yöntemi ile virülens genlerinin incelenmesi, bir günlük civcivlere APEC suşlarının derialtı inokulasyonu ile gerçekleştirilen, patojenite testi yöntemine göre tanı için daha pratik ve faydalıdır.

APEC'in patojenitesine katkıda bulunan spesifik bir virülens faktörü olmamakla birlikte; APEC izolatlarını tanımlamak için tanısal stratejiler *E. coli*'nin çeşitli virülens genlerinin saptanmasına dayanmaktadır. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda virülan APEC suşlarının genetik kriterlere göre en az beş VG taşıması gerektiği (Ewers ve ark, 2005) ve virülens ile daha fazla ilişkili olan beş geni taşıyan izolatların virülensinin da yüksek olduğu gösterilmiştir. Buna göre PZR ile APEC izolatlarında tespit edilen genlerin sayısı virülenslerinin güvenilir bir endeksi olarak kullanılabilir. Bu nedenle en az beş veya daha fazla virülens geni taşıyan izolatlara yüksek derecede virulent primer patojenler (cAPEC), daha az virülens geni taşıyanlar ise sekonder enfeksiyonlara neden olan düşük virülensa sahip sekonder patojenler (pAPEC) olarak kabul edilebilir.

Bu değerlendirme kriterine göre 140 *E. coli* izolatı arasından 86 (%61.4)'sı cAPEC ve 54 (%38.6)'ü pAPEC izolatı ayırt ettik. İncelenen cAPEC izolatları pAPEC izolatları ile karşılaştırıldığında kritik öneme sahip olan *iss*, *ompT*, *hlyF*, *iroN* ve *iucD* genlerini taşıma eğiliminde oldukları saptandı. Ancak, umut verici antijenler olarak bu genlerin kolibasilloze karşı etkili bir aşı için potansiyeli değerlendirmek için daha fazla araştırma yapılması gerekir.

Bu çalışma aynı zamanda, 47 tane virülens genotipi saptanması sebebi ile cAPEC ve pAPEC suşlarını ayırt edebilen virülens genlerinin tekdüze ve kesin bir kombinasyonunun olmadığını ortaya koymuştur. Ek olarak, sadece cAPEC suşlarında tespit edilen *tsh*, *vatA*,

astA ve *colV* genleri, cAPEC izolatlarının önemli VG olarak düşünülebilir.

Bu çalışmada APEC izolatlarının amoksisilin, trimethoprim sulfamethoksazol, amoksisilin klavulanik asit, ve siprofloksasine yüksek düzeyde; doksisiklin, gentamisin, sefaleksim, fosfomisin, florfenikole ise orta düzeyde direnç gösterdiği saptandı. Bu nedenle bu antibiyotiklerin APEC'lerin neden oldukları enfeksiyonların tedavisinde bundan sonraki kullanılmaları doğru bir seçenek olarak görünmemektedir.

Antibiyotiklerin gelişigüzel ve uygunsuz olarak kullanılmalarına bağlı olarak duyarlı mikroorganizmaların yerini dirençli olanlar almakta ve bu durum da MDRne sahip olan bakterilerin neden oldukları hastalıklarda tedavi seçeneklerini sınırlandırmaktadır. Bu çalışmada, izolatların MDR oranları da oldukça yüksek düzeyde (%90.0) oldukları saptandı. Materyal alınan işletmelerde APEC'lerde MDR izolat sayısının fazla olması materyal alınan işletmeler açısından önemli bir direnç probleminin bulunduğu göstermektedir. Bu bulgular, kanatlı çiftliğinde antibiyotiklerin yanlış kullanımının ve APEC salgınının kontrol altına alınması için gözetim ve müdahale sistemine ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Patojen mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı çoklu direnç özelliklerinin artması, amoksisilin klavulanik asit, trimethoprim sulfamethoksazol, ampisilin, tetrasiklin ve gentamisin gibi antibiyotik gruplarının insan enfeksiyonlarının da tedavisinde kullanılıyor olması ilerde insan hastalıklarının tedavisinde kullanılacak antibiyotikleri sınırlandırabilir. Bu nedenle bilinçsiz antibiyotik kullanımının önüne geçilmesi kadar sıkı biyogüvenlik önlemlerinin alınması, doğru yönetim, etkin aşılama programlarının uygulanması gibi stratejiler çiftlik hayvanlarında kolibasillozisin azaltılmasına katkıda bulunacaktır. APEC izolatları arasında çoklu antibiyotik dirençli olan izolatların bulunması, hem insan sağlığı hem de kanatlı hayvan endüstrisini etkileyen önemli bir sağlık sorunudur.

Bu çalışmada, izolatların çoklu demir taşıma sistemlerine sahip olmalarının APEC'in yaşamında önemli bir rol oynayabileceği ve virülans genotiplerinin tanımlandığı virülans gen bazlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesinin gelecekteki aşılama çalışmaları için yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır. Virülans genlerinin *E. coli* izolatlarındaki önemi, bu genlerin ekspresyonunun in vivo ve in vitro olarak incelenmesi ile daha iyi anlaşılabilir. Özellikle, çoklu antibiyotiğe dirençli APEC suşlarının virülans genlerinin düzenli olarak incelenmesi, kolibakillozisin riskini azaltmak için bir koruma programının uygulanması açısından gereklidir.

KAYNAKLAR

Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2008, 6, 733-750.

Aarestrup FM. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 2004, 51, 380-388.

Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiñones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* 2003, 27, 215–237.

Arp LH, Jensen AE. Piliation, hemagglutination, motility, and generation time of *Escherichia coli* that are virulent or avirulent of turkeys. *Avian Diseases* 1980, 24, 153-161.

Assadian O. From antiseptics to antibiotics – and back? *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 2007, 2, 1-5.

Azam M, Mohsin M, Rahman S, Saleemi MK. Virulence-associated genes and antimicrobial resistance among avian pathogenic *Escherichia coli* from colibacillosis affected broilers in Pakistan. *Tropical Animal Health and Production* 2019, 51, 1259-1265.

Balcazar JL. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLOS Pathogens* 2014, 10, 1-4.

Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology* 2008, 153, 347-357.

Bentley R, Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiology Reviews* 19, 46, 241-280.

Berkhoff HA, Vinal AC. Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive *Escherichia coli* for poultry. *Avian Diseases* 1986, 30, 117-121.

Bolin CA, Jensen AE. Passive immunization with antibodies against iron-regulated outer membrane proteins protects turkeys from *Escherichia coli* septicemia. *Infection and Immunity*

1987, 55, 1239–1242.

Bonnet R. Growing group of extended spectrum: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004, 48, 1-1.

Boyd EF, Hartl DL. Recent horizontal transmission of plasmids between natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology* 1997, 179, 1622–1627.

Brocchi M, Ferreira A, Lancellotti M, Stehling EG, Campos TA, Nakazato G, Castro AFP, Silveira WD. Typing of avian pathogenic *Escherichia coli* strains by REP-PZR. *Brazilian Journal of Veterinary Research* 2006, 26, 69-73.

Brown-Jaque M., Calero-Cáceres W, Muniesa M. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid* 2015, 79, 1-7.

Bywater R, Silley P, Simjee S. Antimicrobial breakpoints – definitions and conflicting requirements. *Veterinary Microbiology* 2006, 118, 158-159.

Campos AT, Stehling EG, Ferreira A, Pestana de Castro AF, Brocchi M, Dias da Silveira W. Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of avian *Escherichia coli* strains. *Veterinary Microbiology* 2005, 106, 275-285.

Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology* 2006, 9, 466-475.

Carvalho de M, Irono AC, Vidotto MC. Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction. *Avian Diseases* 2001, 45, 173-181.

Chain E, Florey HW, Adelaide MB, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Ewing J, Sanders AG. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2005, 439, 23-26.

Chen J, Griffiths NW. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Letters in Applied Microbiology* 1998, 27, 369-371.

Clements A, Yoereyung JC, Constantiniu N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 2012, 3, 71-87.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *CLSI* 2012, M100-S22, 32, 3, Table 2A.

Collignon P, Wegener HC, Braam P, Butler CD. The routine use of antibiotics to promote animal growth does little to benefit protein undernutrition in the developing world. *Clinical Infectious Diseases* 2005, 41, 1007-1013.

Collinson SK, Doig PC, Doran JL, Clouthier S, Trust TJ, Kay WW. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella* Enteritidis to fibronectin. *Journal of Bacteriology* 1993, 175, 12-18.

De Carli S, Ikuta N, Lehmann FK, da Silveira VP, de Melo Pedrebon G, Fonseca AS, Lunge VR. Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil. *Poultry Sciences* 2015, 94, 2635-2640.

Delicato ER, Brito BG, Gaziri LCJ, Vidotto MC. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology* 2003, 94, 2, 97-103.

Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research* 1999, 30, 299-316.

Díaz-Sánchez S, Sánchez S, Ewers C, Höfle U. Occurrence of avian pathogenic *Escherichia coli* and antimicrobial-resistant *E. coli* in red legged partridges (*Alectoris rufa*): sanitary concerns of farming. *Avian Pathology* 2012, 41, 337-344.

Dozois CM, Daigle F, Curtis R. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, 100, 247-252.

Dozois CM, Dho-Moulin M, Bre A, Fairbrother JM, Desautels C, Curtiss R. Relationship between the *Tsh* autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *Tsh* genetic region. *Infection and Immunity* 2000, 68, 7, 4145-4154.

Dozois CM, Fairbrother JM, Harel J, Bosse M. *Pap* and *pil* related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1992, 60: 2648–2656.

European Union. Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. 2005, http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1687_en.htm.

Ewers C, Antao AM, Diehl I, Philipp HC, Wieler LH. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Applied and Environmental Microbiology* 2009, 75, 184-192.

Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary Microbiology* 2004, 104, 91-101.

Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Phillip HC, Wieler LH. Rapid detection of virulence associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Diseases* 2005, 49, 269-273.

Ewers C, Li G, Wilking H, Kießling S, Alt K, Antão EM, Laternus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, Böhnke U, Steinrück H, Philipp HC, Wieler LH. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology* 2007, 297, 163-176.

Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. *Clinical Infectious Diseases* 2008, 46, 1121-1122.

Germon P, Chen YH, Blanco JE, Bree A, Schulder C, Huang SH, Moulin Schouler M. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 2005.151, 1179-1186.

Giufre M, Graziani C, Accogli M, Luzzi I, Busani L, Cerquetti M. *Escherichia coli* of human and avian origin: Detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012, 67, 860-867.

Graham JE, Clark-Curtiss JE. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 96, 11554-11559.

Gyimah JE, Panigrahy B. Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of pathogenic *Escherichia coli* to chicken tracheal epithelium. *Avian Diseases* 1988, 32, 74-78.

Gyles CL. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal Health Research Reviews* 2008, 9, 2, 149-158.

Hardy G. Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriological Reviews* 1975, 39, 464-515.

Hensel M, Shea JE, Gleeson C, Jones MD, Dalton E, Holden DW. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 1995, 269, 400-403.

Ibrahim RA, Cryer TL, Lafi SQ, Basha E, Good L, Tarazi YH. Identification of *Escherichia coli* from broiler chickens in Jordan, their antimicrobial resistance, gene characterization and the associated risk factors. *BMC Veterinary Research* 2019, 15, 159: 2-16.

Ideses D, Gophna U, Paitan Y, Chaudhuri RR, Pallen MJ, Ron EZ. A degenerate type III secretion system from septicemic *Escherichia coli* contributes to pathogenesis. *Journal of Bacteriology* 2005, 187, 8164-8167.

Jann K, Jann BJ. Capsules of *Escherichia coli*. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli: Mechanisms of virulence*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1977, 113-143.

Janßen T, Schwarz C, Preikschat P, Voss M, Philipp H, Wieler LH. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *International Journal of Medical Microbiology* 2001, 291, 371-378.

Janssen T, Schwarz C, Preikschat P, Voss M, Philipp HC, Wieler LH. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *International Journal of Medical Microbiology* 2001, 291, 371-378.

Johnson JR, Kuskowski, MA, Smith K, O'Bryan TT, Tatini S. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *Journal of Infectious Diseases* 2005, 191, 1040-1049.

Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamele P, Johnson SJ, Doetkott C, Skyberg JA, Lynee AM, Johnson JR, Nolan LK. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *Journal of Bacteriology* 2007, 189, 3228-3236.

Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK. Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. *Journal of Bacteriology* 2006, 188, 5975-5983.

Johnson TJ, Wannemuehler Y, Nolan LK. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 2008, 74, 2360-2369.

Kallenius G, Mollby R, Svenson SB, Winberg J, Hultberg H. Identification of a carbohydrate receptor recognized by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection* 1980, 8, :288-293.

Kariyawasam S, Johnson TJ, Nolan LK. The *pap* operon of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1 is located on a novel pathogenicity island. *Infection and Immunity* 2006, 74, 744-749.

Keen EC, Bliskovsky VV, Malagon F, Baker JD, Prince JS, Klaus JS, Adhya SL. Novel “superspreader” bacteriophages promote horizontal gene transfer by transformation. *mBio* 2017, 8, 12–16.

Kemmett K, Humphrey T, Rushton S, Close A, Wigley P, Williams NJ. A longitudinal study simultaneously exploring the carriage of APEC virulence associated genes and the molecular epidemiology of faecal and systemic *E. coli* in commercial broiler chickens. *PLOS One* 2013, 8, 1-10.

Kim TE, Jeong YW, Cho SH, Kim SJ, Kwon HJ. Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in Korean avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2007, 45, 3309-3315.

Knöbl T, Godoy SN, Matushima ER, Guimarães MB, Ferreira AJP. Characterization molecular dos fatores de virulencia de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviaria. *Brazilian Journal of Veterinary Research* 2008, 45, 54-60.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM. Schreckenberger PC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia, Lippincott, USA, 1997.

La Ragione RM, Sayers AR, Woodward MJ. The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old-chick model. *Epidemiology and Infection* 2000, 124, 351-363.

La Ragione RM, Woodward MJ. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Research in Veterinary Sciences* 2002, 73: 27-35.

Laehnemann, D, Peña-Miller R, Rosenstiel P, Beardmore R, Jansen G, Schulenburg H. Genomics of rapid adaptation to antibiotics: Convergent evolution and scalable sequence amplification. *Genome Biology and Evolution* 2014, 6, 1287–1301.

Lafont JP, Dho M, Dhauteville HM, BRee A, Sanonetti PJ. Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1987, 55, 193-197.

Lane MC, Mobley HL. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney International* 2007, 72, 19-25.

Li Y, Chen L, Wu X, Huo S. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Poultry Science* 2013 94, 601-611.

Lutful Kabir SM. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2010, 7, 89-114.

Lynne AM, Foley SL, Nolan LK. Immune response to recombinant *Escherichia coli* Iss protein in poultry. *Avian Diseases* 2006, 50, 273-276.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 2012, 18, 268-81.

Maniatis T, Sambrook J. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, USA,1989.

Matin MA, Islam MA, Khatun MM. Prevalence of colibacillosis in chickens in greater Mymensingh district of Bangladesh. *Veterinary World* 2017, 10, 29-33.

Mauer JJ, Lee MD, Lobsinger C, Brown T, Maiter M, Thayer SG. Molecular typing of avian *Escherichia coli* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *Avian Diseases* 1998, 42, 431-51.

McGann P, Snesrud E, Maybank R, Corey B, Ong AC, Clifford R, Hinkle M, Whitman T, Lesho E, Schaecher KE. *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *bla* CTX-M on a novel IncF plasmid: First report of *mcr-1* in the USA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016, 60, 4420-4421.

Mellata M, Dho Moulin M, Dozois CM, Curtiss R, Lehoux B, Fairbrother JM. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infection and Immunity* 2003, 71, 494-503.

Ménard LP, Dubreuil JD: Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Critical Reviews in Microbiology* 2002, 28, 43-60.

Mohamed MA, Shehata MA, Rafeek E. Virulence genes content and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from broiler chickens. *Veterinary Medicine International* 2014, 1–6.

Mokady D, Gophna U, Ron EZ. Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43, 66-73.

Mol O, Oudega B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiological Reviews* 1996, 19, 25-52.

Moore PR, Evenson A, Luckey TD, McCoy E, Elvehjem EA, Hart EB. Use of sulphasuccidine, streptothricin and streptomycin in nutrition studies with the chick. *Journal of Biological Chemistry* 1946, 165, 437-441.

Morales C, Lee MD, Hofacre C, Maurer JJ. Detection of a novel virulence gene and a *Salmonella* virulence homologue among *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *Foodborne Pathogens and Diseases* 2004, 1, 160-165.

Moulin-Schouler M, Reperant M, Laurent S, Bree A, Mignon-Grasteau S, Germon P, Rasschaert D, Schouler C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *Journal of Clinical Microbiology* 2007., 45, 3366-76.

Moulin-Schouler M, Schouler C, Tailliez P, Kao MR, Bree A, Germon P, Oswald E, Mainil J, Blanco M, Blanco J. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *Journal of Clinical Microbiology* 2006, 44, 3484-3492.

Moura AC, Irino K, Vidotto M. Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction. *Avian Diseases* 2001, 45, 173-181.

Muniesa M, Colomer-Lluch M, Jofre J. Could bacteriophages transfer antibiotic resistance genes from environmental bacteria to human-body associated bacterial populations? *Mobile Genetic Elements* 2013, 3, 1-4.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiological Reviews* 1998, 11, 142-201.

Ngeleka M, Brereton L, Brown G, Fairbrother JM. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*, *pap*, *pil*, and *iuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Diseases* 2002, 46, 143-152.

Ngeleka M, Kwaga JKP, White DG, Whittam TS, Riddell C, Goodhope R, Potter AA, Allan B. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: Clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factor of isolates from diseased birds. *Infection and Immunity* 1996, 64, 3118-3126.

Nolan LK, Barnes HJ, Vaillancourt JP, Abdul-Aziz T, Logue CM. Colibacillosis. In: Swayne DE, editor. *Diseases of Poultry*. Ames: Wiley-Blackwell; 13th ed. 2013, 751-806.

Ocak F, Çöven F, Ertunç E, Eğilmez T, Türkyılmaz S. Determination of the most significant serotypes and antimicrobial susceptibilities of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Turkey. *European Poultry Science* 2018, 82, 1-12.

Okeke IN, Scaletsky ICA, Soars EH, MacFarlane LR, Torres AG. Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 2004, 42, 36-44.

Olsen RH, Frantzen C, Christensen H, Bisgaard M. An Investigation on first-week mortality in layers. *Avian Diseases* 2012, 56, 51-57.

Ørskov I, Ørskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriological Reviews* 1977, 41, 667-710.

Overdevest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Heck M, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C, van der Zwaluw K, Huijsdens X, Kluytmans J. Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 2011, 17, 1216-1222.

Paixao AC, Ferreira AC, Fontes M, Themudo P, Albuquerque T, Soares MC, Fevereiro M, Martins L, Corr MI. Detection of virulence-associated genes in pathogenic and commensal avian *Escherichia coli* isolates. *Poultry Science* 2016, 95, 1646-1652.

Peighambari SM, Hunter DB, Shewen PE, Gyles CL. Safety, immunogenicity, and efficacy of two *Escherichia coli cya crp* mutants as vaccines for broilers. *Avian Diseases* 2002, 46, 287-297.

Penadés JR, Chen J, Quiles-Puchalt N, Carpena N, Novick RP. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Current Opinion in Microbiology* 2015, 23, 171-178.

Petersen A, Christensen JP, Kuhnert P, Bisgaard M, Olsen JE. Vertical transmission of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* within an integrated broiler operation. *Veterinary Microbiology* 2006, 116, 120-128.

Pourbakhsh SA, Dho-Moulin M, Bre´e A, Desautels C, Martineau-Doize BE, Fairbrother JM. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis* 1997, 22, 6, 331-341.

Price LB, Lackey LG, Vailes R, Silbergeld E. The persistence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in poultry production. *Environmental Health Perspectives* 2007, 115, 1035-1039.

Qabajah M, Ashhab Y. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) in Palestine. *Veterinary Research* 2012, 30, 299-316.

Radwan IA-E, Sayed H, Salam H, Abd-alwanis SAA. Frequency of some virulence associated genes among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from septicemic broiler chicken. *International Journal of Advanced Research* 2014, 2, 867-874.

Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* 2005a, 151, 2097-2110.

Rodriguez-Siek, KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. *Veterinary Research* 2005b, 36, 241-256.

Rogers B, Sidjabat HE, Silvey A, Anderson TL, Perera S, Li J, Paterson DL. Treatment options for New Delhi metallo-beta-lactamase-harboring *Enterobacteriaceae*. *Microbial Drug Resistance* 2013, 19, 100-103.

Saberfar E, Pourakbari B, Chabokdavan K, Dolatshahi F. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from Iranian broiler chicken flocks, 2005-2006. *Journal of Applied Poultry Research* 2008, 17, 302-304.

Sabri M, Leveillé S, Dozois CM. A *sit*ABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology* 2006, 152, 745-758.

Sarkar S, Ulett GC, Totsika M, Phan MD, Schembri MA. Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2014, 10, 9, e94786.

Schouler C, Koffman F, Amory C, Leroy Setrin S, Mouin Schouler M. Genomic subtraction for the identification of putative new virulence factors of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain of O2 serogroup. *Microbiology* 2004, 150, 2973-2984.

Schouler C, Schaeffer B, Bre'e A. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *Journal of Clinical Microbiology* 2012, 50, 5, 1673-1678.

Shrestha A, Bajracharya AM, Subedi H, Turha RS, Kafle S, Sharma S, Neupane S, Chaudhary DK. Multi-drug resistance and extended spectrum beta lactamase producing Gram negative bacteria from chicken meat in Bharatpur metropolitan, Nepal. *BMC Research Notes* 2017, 10, 574.

Silveira WD, Ferreira A, Brocchi M, Hollanda LM, Castro AFP, Yamada AT, Lancellotti M. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Veterinary Microbiology* 2002a, 85, 47-53.

Silveira WD, Ferreira A, Lancellotti M, Barbosa IAGCD, Leite DS, Castro AFP, Brocchi M. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PZR. *Veterinary Microbiology* 2002b, 89, 323-328.

Silveira WD, Lancellotti M, Ferreira A, Solferini VN, Castro AFP, Stehling EG, Brocchi M. Determination of the clonal structure of avian *Escherichia coli* strains by isoenzyme and ribotyping analysis. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 2003, 50, 63-69.

Subedi M, Luitel H, Devkota B, Bhattarai RK, Phuyal S, Panthi P. Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. *BMC Veterinary Research* 2018, 14, 113.

Tabatabaei RR, Nasiran A. Isolation, identification and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from chicken flocks. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 2003, 2, 39-42.

Todar K. Pathogenic *E. coli*. *Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, 2007.

Turner PC, McLennan AG, Bates AD, White MRH. Moleküler Biyoloji Önemli Notlar. Nobel Yayınları, 2004.

US Food and Drug Administration. The judicious use of medically important antimicrobial drugs in food-producing animals. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM216936.pdf>, 2012.

Van Den Bogaard AE, London N, Driessen C, Stobberigh EE. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001, 47, 763-771.

Vandekerchove D, Vandemaele F, Adriaensen C, Zaleska M, Hernalsteens JP, De Baets L, Butaye P, Van Immerseel F, Wattiau P, Laevens H, Mast J, Goddeeris B, Pasmans F. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Veterinary Microbiology* 2005, 108, 75-87.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 1991, 19, 6823-6831.

Vhm L, Serrano IQ, Delgado PDP, Lev R, Olague-Marchan M, Shs R, Mal L, Af DT, Rmr S. Genes of virulence and phylogenetic group in isolates of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Archives of Medicine* 2017, 9, 1-5.

Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010, 65, 2518-2529.

White DG, Dho-Moulin M, Wilson RA, Whittam TS. Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. *Microbriological Pathogenesis* 1993b, 14, 399-409.

White DG, Wilson RA, Emery DA, Nagaraja KV, Whittam TS. Clonal diversity among strains of *Escherichia coli* incriminated in turkey colisepticemia. *Veterinary Microbiology* 1993a, 34, 19-34.

Woolhouse M, Farrar J. An intergovernmental panel on antimicrobial resistance. *Nature* 2014, 509, 555-557.

Yaguchi K, Ogitani T, Osawa R, Kawano M, Kokumai N, Kaneshige T, Noro T, Masubuchi K, Shimizu Y. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Japan. *Avian Diseases* 2007, 51, 656-62.

Yamamoto T, Echeverria P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infection and Immunity* 1996, 64, 1441-1445.

Yamamoto T, Nakazawa M. Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 1997, 35, 223-227.

Yogarathnam V. Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant. *Veterinary Record* 1995, 137, 215-217.

Zhang H, Rehman MU, Li K, Luo H, Lan Y, Nabi F, Shahzad M, Huang S, Liu X, Mehmood K, Iqbal MK and Li J. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from Tibetan piglets suffering from white score diarrhea. *Pakistan Veterinary Journal* 2017, 37, 43-46.

Zhao S, Maurer JJ, Hubert S, De Villena JF, McDermott PF, Meng J, Ayers S, English L, White DG. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Veterinary Microbiology* 2005, 107, 215-224.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : İLÇEBAYLIK, Ayhan
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Batman/01.01.1985
Telefon : 0 544 966 35 09
E-mail : ayhanicebaylik@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Aydın Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2017-Devam Ediyor
Lisans	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2005-2010

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2015-Devam Ediyor	T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Aydın İl Tarım ve Orman Müdürlüğü (İncirliova)	Veteriner Hekim
20011-2015	Hayvan Sağlığı, Yetiştiriciliği ve Su Ürünleri Şube Müdürlüğü (Bitlis)	Veteriner Hekim