

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANATLI ORİJİNLİ *ESCHERİCHİA COLİ*
SUŞLARININ VİRÜLENS ÖZELLİKLERİNİN
FENOTİPİK VE MOLEKÜLER METOTLARLA
BELİRLENMESİ**

Zafer CANTEKİN

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Müjgan İZGÜR

2008-ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANATLI ORİJİNLİ *ESCHERİCHİA COLİ*
SUŞLARININ VİRÜLENS ÖZELLİKLERİNİN
FENOTİPİK VE MOLEKÜLER METOTLARLA
BELİRLENMESİ**

Zafer CANTEKİN

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Müjgan İZGÜR

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilim İnsanı Yetiştirme Projesi
(BİYEP, 2005K-120140-6) tarafından desteklenmiştir.


2008-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/03/2008


Prof. Dr. Nejat AYDIN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Müjgan İZGÜR
Ankara Üniversitesi


Prof. Dr. Mehmet ATEŞ
Selçuk Üniversitesi


Prof. Dr. Feray ALKAN
Ankara Üniversitesi


Prof. Dr. Mehmet AKAN
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	2
1.1.1. <i>E. coli</i> 'nin Virülens Özellikleri	5
1.1.1.1. Adezinler	5
1.1.1.1.1. F1 Fimbrialar (Tip 1)	5
1.1.1.1.2. P fimbrialar, S fimbrialar ve afimbrial adezinler	7
1.1.1.1.3. Curli Fimbrialar	9
1.1.1.1.4. Isıya Duyarlı Hemaglutininler	9
1.1.1.2. Serumun Bakterisidal Etkilerine Karşı Dirençlilik	10
1.1.1.3. Aerobaktin Demir Elde Etme Sistemi	10
1.1.1.4. Toksinler	11
1.1.1.5. Hemolizin	12
1.1.1.6. Hareketlilik	12
1.1.1.7. Kapsüler Antijen	12
1.1.1.8. Kolisin V Plazmid	13
1.1.1.9. Kongo Red İle Boyanma	13
1.1.1.10. Asit Toleransı	13
1.2. Epidemiyoloji	13
1.3. Patogenez	15
1.4. Semptomlar	17
1.5. Teşhis	18
1.6. Ayırıcı Teşhis	18
1.7. Laboratuvar Muayeneleri	19
1.7.1. Bakteriyoskopi	19
1.7.2. Kültür	19
1.7.3. Serolojik Testler	20
1.7.4. Toksin özellikleri	20
1.7.5. Moleküler Teşhis	21
1.7.6. Hayvan Deneyleri	22
1.8. Sağaltım	23
1.9. Koruma	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	25
2.1. Örneklerin Toplanması	25
2.2. Besiyerleri	25
2.3. Kullanılan Cihaz ve Gereç Listesi	28
2.4. Standart Suşlar	29
2.5. Hücre Kültürleri	29
2.6. İzolasyon ve İdentifikasyon	29
2.7. Virülens Faktörlerinin Araştırılması	30

2.7.1. Hemoliz Testi	30
2.7.2. Aerobaktin (Sidereforlar) Araştırılması	30
2.7.3. Toksin (Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1) Analizleri	30
2.7.4. Hemaglutinasyon Testi	31
2.7.5. Serum Dirençliliği	32
2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	32
2.8.1. DNA Ekstraksiyonu	33
2.8.2. PCR Karışımının Hazırlanması	33
2.8.3. DNA Amplifikasyonu	35
2.8.4. Agaroz Jel Elektroforez	36
2.8.4.1. Agaroz Jelin Hazırlanması	36
2.8.4.2. Elektroforez İşlemi	36
2.8.5. Görüntüleme İşlemi	36
3. BULGULAR	37
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	37
3.2. Virulens Faktörlerine Ait Bulgular	37
3.2.1. Hemoliz Bulguları	37
3.2.2. Aerobaktin Bulguları	38
3.2.3. Toksin Bulguları	38
3.2.4. Hemaglutinasyon Bulguları	39
3.2.5. Serum Dirençliliği Bulguları	39
3.3. PCR Bulguları	39
3.4. Fenotipik ve PCR Bulguların Karşılaştırması	43
4. TARTIŞMA	46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
ÖZET	57
SUMMARY	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	68

ÖNSÖZ

Kanatlı üretimi tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de hayvancılık sektöründe önemli bir yer almaktadır. Üretimin yoğun olarak yapılması nedeniyle kanatlılarda bakteriyel etkenlerin neden olduğu infeksiyonlar önemli ekonomik zararlara neden olmaktadır. Ekonomik zararlar iki başlık altında değerlendirilebilir. Bunlardan biri hastalıklarda oluşan ölüm ve büyüme geriliği diğeri ise sağaltım masraflarıdır. Bunlara ilave olarak sağaltım amaçlı kullanılan antibiyotiklerin kalıntı bırakması ve insan sağlığını olumsuz etkilemesi de önemli olan diğeri bir sorundur. Kanatlılarda bakteriyel etiyojilerine göre hastalıklar düşünüldüğünde ilk sıralarda *E.coli*’lerin neden olduğu infeksiyonlar gelmektedir.

E. coli’de virülens, bir veya daha fazla faktörün birlikte etkisiyle oluşmaktadır. Herhangi bir etkenin virülens özelliklerinin incelenmesindeki pratik amaç, infeksiyonu önlemek için spesifik anti-virülens mekanizmalarını geliştirmektir. İnsan ve hayvanlarda hastalık yapan *E. coli*’ler ve onların virülens özellikleri yoğun şekilde çalışılmıştır. *E. coli*’ler yaptıkları infeksiyonlar ve sahip oldukları virülens özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Son yıllarda kanatlı hayvan endüstrisinin gelişmesiyle birlikte bu etkenler içinde kanatlı hayvanlarda infeksiyon yapan ve kanatlı endüstrisi açısından büyük ekonomik kayıplara neden olan kanatlı patojenik *E. coli*’ler (APEC) adı verilen bir grup üzerine çalışmalar artmıştır. Ülkemizde ise kanatlı patojenik *E. coli*’ler ve bunların sahip oldukları virülens özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sınırlıdır.

Bu çalışmada, hastalıklı kanatlı hayvanlardan izole edilen 200 adet *E. coli* suşunda, özellikle ekstra-intestinal infeksiyonlar için önemli olan virülens faktörlerinden; serum direnci, aerobaktin demir elde etme sistemleri, mannoz duyarlı hemaglutinasyon (tip 1 fimbrialar) ve mannoz dirençli hemaglutinasyon (P fimbrialar, S fimbrialar ve afimbrial adezinler) özellikleri, alfa-hemoliz ve sitotoksik nekrotizan faktör 1 gibi virülens özelliklerinin fenotipik yöntemlerle araştırılması ve bu özellikleri kodlayan genlerin moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bana yol gösteren, yardım ve ilgilerini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Müjgan İZGÜR ve tez izleme komitesi üyesi hocalarım sayın Prof. Dr. Mehmet AKAN ve sayın Prof. Dr. Feray ALKAN’a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı hocam sayın Prof. Dr. Nejat AYDIN ve öğretim üyeleri; Prof. Dr. Serdar DİKER, Prof. Dr. Hakan YARDIMCI ve Prof. Dr. Ömer M. ESENDAL’a, tez çalışmalarımdaki katkıları için Viroloji Anabilim Dalı Başkanlığına ve Araş. Gör. Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU’na teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

afa	afimbrial adezin geni
APEC	<i>Avian Pathogenic Escherichia coli</i>
bp	base pair
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
CFA	Kolonizasyon Faktör Antijen Agar
cm	Santimetre
Cnf 1	Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1
DNA	Deoksiribonükleik asit
EHEC	Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvazif <i>E. coli</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMB	Eosin Methylen Blue Agar
EPEC	Enteropatojenik <i>E. coli</i>
fim	Tip 1 fimbriaları kodlayan gen
g	Gram
hlyA	alfa-hemolizin
iucD	demir sidereforlarını kodlayan gen
KH ₂ PO ₄	Patasyum Hidrojen Fosfat
Kob	Koloni oluşturan birim
LB	Luria Bertani
LT	Labil Toksin
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
ml	Mililitre
MLEE	Multilokus Enzim Elektroforezi
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MnCl ₂	Mangan Klorür
MRHA	Mannoz Resistans Hemaglutinasyon
MSHA	Mannoz Sensitif Hemaglutinasyon
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
Na ₂ HPO ₄	Di-Sodyum Hidrojen Fosfat
NaCl ₂	Sodyum Klorür
NH ₄ Cl	Amonyum Klorür
pap	Piyolonefritis ilişkili fimbrialar (P fimbrialar)'ı kodlayan gen
PBS	Pepton Buffer Saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
pmol	pikomol
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
sfa	S fimbriaları kodlayan gen
ST	Stabil Toksin

TBE	Tris Borat Edta
traT	Yüzey proteinlerini kodlayan gen
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Trypticase Soy Buyyon
tsh	Isiya duyarlı hemaglutininler
Vero	Yeşil Maymun Böbrek Hücresi
VTEC	Verotoksijenik <i>E. coli</i>

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. İzole edilen <i>E. coli</i> suşlarının Hemoliz (hlyA, 1177 bp) PCR bulguları	40
Şekil 3.2. İzole edilen <i>E. coli</i> suşlarının Aerobaktin (IucD, 602 bp) PCR bulguları	40
Şekil 3.3. İzole edilen <i>E. coli</i> suşlarının Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1 (cnf 1, 498 bp) PCR bulguları	41
Şekil 3.4. İzole edilen <i>E. coli</i> suşlarının Tip 1 fimbria (fimH, 508 bp) PCR bulguları	41
Şekil 3.5. İzole edilen <i>E. coli</i> suşlarının P fimbria (PapEF, 336 bp) PCR bulguları	42
Şekil 3.6. İzole edilen <i>E. coli</i> suşlarının P fimbria (PapC, 328 bp) PCR bulguları	42
Şekil 3.7. İzole edilen <i>E. coli</i> suşlarının Afimbrial adezin (Afa,750 bp) PCR bulguları	42
Şekil 3.8. İzole edilen <i>E. coli</i> suşlarının S fimbria (Sfa, 410bp) PCR bulguları	42
Şekil 3.9. İzole edilen <i>E. coli</i> suşlarının Serum direnci (TraT, 307 bp) PCR bulguları	42
Şekil 3.10. Virülens genlerine ait spesifik bantlar	45

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. İncelenen meteryallere ait bilgiler	25
Çizelge 2.2. Primerlerin baz dizileri, bağlandıkları spesifik gen bölgeleri ve PCR ürünlerinin uzunlukları	34
Çizelge 3.1. İncelenen <i>E.coli</i> suşlarının orijinleri	37
Çizelge 3.2. İncelenen <i>E.coli</i> suşlarında virülens özelliklerinin fenotipik bulguları	38
Çizelge 3.3. Farklı eritrositlere göre HA bulguları	39
Çizelge 3.4. Araştırılan virülens özelliklerine ait fenotipik ve moleküler bulgular	44

1. GİRİŞ

Escherichia coli ilk olarak bakteriyolog Dr. Theodor Escherich tarafından 1885 yılında ishalleri bir çocuğun dışkılarından izole edilmiş ve “*Bacterium (Bacillus) coli commune*” olarak isimlendirilmiş olup, şu anki adı 1919 yılında Castellani ve Chalmers tarafından verilinceye kadar bu ad kısaltılarak *Bacterium coli* olarak kullanılmıştır (Barnes ve Gross, 1997).

Ölen kanatlıların kalp, karaciğer ve dalağında ilk defa *E. coli* izolasyonu Lignieres tarafından 1894 yılında rapor edilmiş ve bu izolatın kanatlı hayvanlar için patojen olmasına karşın kobay ve tavşanlar için patojen olmadığı bildirilmiştir. Daha sonra buna benzer infeksiyonlar orman tavuğu, güvercinler, kuğular, hindiler, bildircin ve tavuk sürülerinde 1894-1922 yılları arasında bildirilmiştir. Koliseptiseminin ilk tanımlanması tavukların taşınma esnasında kolera benzeri bir hastalıktan ölmesi üzerine yapılan çalışmaya dayanan bir yayında 1907 yılında açıklanmıştır. O zamanki şartlar altında etken “*Bacterium (Escherichia) coli*” olarak tanımlanmış ve etkenin bağırsağı terk ederek açlık, susuzluk, soğuk ve kötü havalandırma gibi kötü koşullar altında hayvanların direnci zayıflayınca virulent olarak tavuklarda hastalığa neden olduğu düşünülmüştür. Kuşlarda görülen infeksiyöz astım (dermansızlık) ve felç hastalığında 1923 yılında *E. coli* izole edilmiştir. 1938 yılında aynı kuluçkahaneden gelen civcivlerde 10 günlükten küçük yaşta pullorum benzeri bir hastalık %15-40 arasında kayba neden olmuş ve civcivlerde perikarditis, perihepatitis ve karaciğerde beyaz renkli odaklar olduğu belirlenmiştir. Bu organlardan yapılan ekimler sonucunda *E. coli* izole edilmiş ve uygun olmayan kuluçka makinalarından çıkan civcivlerde zayıflamaya neden olduğu ve onların infeksiyona duyarlılığını artırdığı görüşü öne sürülmüştür. 1938 ve 1965 yılları arasında koligranüloma ve hava kesesi yangısı, artrit, parmak apseleri, omfalitis, panoftalmitis, peritonitis ve salpingitis de *E. coli*'nin rolü belirlenmiş ve infeksiyonların aşılama ya da doğal viral infeksiyonu takiben olduğu saptanmıştır (Barnes ve Gross, 1997).

Günümüzde *E. coli* infeksiyonları kanatlı endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olurlar. Kolibasillozis kanatlı hayvanlar üzerine yapılan araştırmalarda en sık rapor edilen hastalıktır. İngiltere kesimhanelerinde yapılan bir çalışmaya göre, hastalıktan dolayı tüketime uygun bulunmayan broiler karkaslarının %43'ünün kolibasillozisin karakteristik özellikleri olan perikarditis, perihepatitis ve hava kesesi yangısı gibi hastalık lezyonlarından dolayı imha edildiği belirtilmiştir. İngiltere de kolibasillozisten kaynaklanan kayıpların miktarı, imhanın diğer nedenleri ya da taşımadan kaynaklanan diğer kayıplar ile kıyaslandığında yıllık olarak 5 ya da 6 milyon Euro'dur. Buna büyümenin gecikmesindeki kayıplar, hayvan ölümleri ve antibiyotik uygulama masrafları ve hastalığa ilişkin değişik uygulamalar eklenebilir (Yogaratanam, 1995).

1.1. Etiyoloji

Escherichia coli Bacteria aleminin, Proteobacteria bölümü, Gamma proteobacteria sınıfı, Enterobacteriales takımı, Enterobacteriaceae ailesi, Escherichia cinsi içinde bir türdür. Escherichia cinsi, aerobik veya anaerobik olarak üreyen ve karbon kaynaklarını kullanabilen organizmaları kapsar. Bu cins içinde diğer türler de tanımlanmıştır, ancak *E. coli* bunlar arasında en yaygını ve en önemlisidir (Winn ve ark., 2006).

E. coli Gram negatif, aside dirençli olmayan, uniform boyanan, spor oluşturmeyen, 0,6x3,0 µm ebatlarında çomak şekilli bir bakteridir. Organizmanın ölçüleri ve şekli değişebilir. Çoğu suş peritirik flagellaları ile hareketlidir. *E. coli* laboratuvar besiyerlerinde 18-44°C'de ürer. Üreme süresi ve üreme periyodunda organizmaların sayısı ısıya bağlıdır. Nutrient agarda 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra küçük, konveks, düzgün ve renksiz koloniler oluştururlar. MacConkey agarda parlak pembe, EMB agarda ise, koyu yeşil siyah metalik parıldamalı koloniler görülür. Tergitol-7 agarda sarı renk oluşturur. Koloniler genellikle 1-3 mm çapında ve granüler yapıdadır. Kanlı agarda memeli orijinlilerin hemoliz yapma özelliği yaygın iken kanatlı orijinli olanlarda bu özellik fazla görülmez. *E. coli* sıvı

besiyerlerinde kısa sürede bulanıklık oluşturur (Barnes ve Gross, 1997; İzgür, 2006; Winn ve ark., 2006).

E. coli glikoz, maltoz, mannitol, ksiloz, gliserol, ramnoz, sorbitol ve arabinozdan asit ve gaz oluşturur, fakat dekstrin ve inositolü ayrıştırıramaz. İzolatların çoğu laktozu fermente eder. Adenitol, sukroz, salisin, rafinoz ve dulsitol fermentasyonu değişkendir. *E. coli* indol üretir, metil red pozitifdir ve nitratı nitrite indirger. Voges Proskauer ve Oksidaz negatiftir ve Kligner's Iron agarda hidrojen sülfid oluşturmazlar. Kanatlı *E. coli* suşları da diğer kaynaklardan izole edilenler ile benzer biyokimyasal özelliklere sahiptir (Barnes ve Gross, 1997; Winn ve ark., 2006).

Dulsitol ve salisin fermentasyonu gibi bazı biyokimyasal özelliklerin APEC(Avian Patojenik *Escherichia coli*) ile ilişkili oldukları düşünülmüş, ancak gerçekte bu özelliklerin suşların virülensinden çok serotipleri ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Örnek olarak ABD'nin Delaware eyaletinde 1981 ve 1983 yılları arasında görülen kolibasilozisten sorumlu *E. coli* O35 serotipinin adenitol fermentasyonu ile pozitif korelasyonu verilebilir (Cloud ve ark., 1985).

E. coli'nin fiziksel ve kimyasal etkenlere duyarlılık durumları diğer Gram negatif bakterilerinkine benzer. Termal inaktivasyon ısısı süreye bağlı olarak organizmaların sayısını %90 oranında azaltır. Suşların çoğu 60°C'de 30 dk da, 70°C'de 2 dk da inaktive olur. Organizmalar düşük ısıda ve dondurulmuş ortamlarda uzun süre canlı kalabilirler. Üreme pH 4,5'den aşağıda ve 9,0'dan yukarıda inhibe olur. Üremeyi inhibe etmek için organik asitler inorganik asitlerden daha etkilidir. Ortamda %8,5 üzerindeki tuz yoğunluğu üremeyi baskılar. Stabilize klorin dioksit ürünü su dezenfektanı olarak yüksek etkilidir (Himathongkham ve ark., 2000).

Somatik "O" antijenleri lipopolisakkarit özelliğinde olup, ısıya dirençli yüzey antijenleridir. Bu yüzey antijenleri ile hazırlanan spesifik O antiserumları kullanılarak makroaglutinasyon ve mikroaglutinasyon testleri ile ortaya konulur. O antiserumları yüksek titrelerde antijeni aglutine ederler ve etkenlerin O serotipleri, antijen-antikor karışımı 50°C'de 24 saat inkübe edildiğinde belirlenir. Kapsüler ve fimbrial antijenlere sahip *E. coli* suşlarında bu antijenler somatik "O" antijenlerinin

belirlenmesinde güçlülere neden olduğundan, izolatların 120°C’de 2 saat ısıtıldıktan sonra teste tabi tutulması önerilir (İzgür, 1997; Winn ve ark., 2006).

Kapsüler “K” antijenleri %2 oranında polimerik asitler içeren şekerlerdir ve bunlar virülensle ilişkilidirler. Hücre yüzeylerinde bulunurlar, O aglutinasyonunu engellerler ve 100°C’de 1 saat ısıtma ile uzaklaştırılırlar. Çok az suş 121°C’de 2,5 saat ısıtmayı gerektirir. Isıya duyarlılık temelinde K antijenleri A ve B formlarına ayrılır. Antiserum canlı organizmaların intravenöz inokülasyonu ile tavşanlarda hazırlanır. Tüp aglutinasyon titreleri 37°C’de 2 saat veya 4°C’de bir gece inkübasyon sonucunda belirlenir. Bu antijenlerin çoğu uygun bir şekilde sulandırılan serum kullanılarak lam aglutinasyon ile belirlenebilir (Winn ve ark., 2006).

Flagellar “H” antijenlerini çalışmak için suşlar hareketi artıran koşullar altında üretilmelidir. H antijenleri *E. coli* izolatlarının antijenik identifikasyonlarında sık kullanılmazlar ve patojenite ile ilişkili değildirler ve 100°C’de ısı ile yıkımlanabilen proteinlerdir. Tüp aglutinasyon testleri 50°C’de 2 saat inkübasyondan sonra yapılmalıdır (Winn ve ark., 2006).

Fimbrial “F” antijenleri (pilus antijenleri) hücrelere bağlanmada önemlidirler ve bakterilerin üreme ortamlarına bağlı olarak sentezlenirler. Fimbrialar ortamda D-mannoz varlığında aglutinasyon yapıp yapmamalarına bağlı olarak mannoz duyarlı ve mannoz dirençli olarak sınıflandırılırlar. Fimbrial antijenlerin varlığının belirlenmesi için çeşitli testler geliştirilmiştir (Winn ve ark., 2006).

E. coli, önceleri sadece fekal kontaminant bir etken olarak kabul edilmiş, ancak insan ve hayvanlarda ölüme yol açabilen patojen tiplerinin belirlenmesi ile birlikte *E. coli*’ye karşı bakış açısı değişmiştir. Etken sıcakkanlı canlıların normal gastrointestinal florasının bir üyesidir. Ancak bazı *E. coli* suşlarının insan ve hayvanlarda özellikle intestinal infeksiyonların yanı sıra üriner sistem infeksiyonları, septisemi ve meningitis gibi ekstraintestinal infeksiyonlara da neden olduğu belirlenmiştir (Orskov ve Orskov, 1985).

1.1.1. *E. coli*'nin Virülens Özellikleri

Ekstra-intestinal *E. coli*'ler de daha önce belirlenmiş olan virülens faktörlerinin bir kısmı kanatlılardan izole edilen *E. coli* suşlarında da saptanmıştır. Bunlar arasında adezinler (Tip 1 Fimbrialar, P fimbrialar, S fimbrialar, afimbrial adezinler, Curli fimbrialar, Isıya Duyarlı Hemaglutininler), serumun bakterisidal etkilerine karşı dirençlilik, aerobaktin demir elde etme sistemi, toksinler, hemolizin, hareketlilik, kapsüler antijen, kolisin V plazmidi, kongo red ile boyanma ve asit toleransı APEC suşlarının içerdiği en önemli virülens faktörleri olarak belirlenmiştir. Ek olarak diğer virülens faktörlerinin varlığını belirlemek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır (La Ragione ve Woodward, 2002).

1.1.1.1. Adezinler; APEC'lerde önemli bir virülens özelliği fimbriyalardır. Fimbrialar konak dokularına bağlanarak etkenin kolonizasyonunu sağlarlar. Bu fimbrialar insan ve çeşitli hayvanların eritrositlerine bağlanarak hemaglutinasyon oluştururlar. Fimbriaların eritrositlere bağlanma özelliklerinden yararlanılarak varlıkları in-vitro testlerle belirlenebilir. Hemaglutinasyon özelliğinin, ortamda D-mannoz varlığında kaybolup kaybolmamasına göre fimbrialar mannoz sensitif (tip 1 fimbria) ve mannoz resistans (P fimbria, S fimbria ve afimbrial adezinler) adezinler olarak sınıflandırılabilirler (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999).

1.1.1.1.1. F1 Fimbrialar (Tip 1); Tavukların solunum kanalı epitel hücrelerine *E. coli*'nin bağlanma yeteneğinde bir virülens faktörünün rol oynayabileceğinin kanıtı; hindilerde virülent ve fimbriyalı bir suşun avirülent ve daha az fimbriyalı bir suşa göre trake'den temizlenmesinin daha güç olduğu gözlemlendiğinde ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar virülent *E. coli* suşlarının avirülentlere oranla tavuk trakesinde daha iyi kolonize olduğu ve bu özelliğini de tip 1 fimbrialar sayesinde gerçekleştirdikleri yönündedir. Tip 1 fimbriaların farinks ve trake epitel hücrelerine bağlanması hem in-vivo hemde in-vitro olarak gösterilmiştir (Dho-Moulin ve Lafont, 1984). Bir diğer çalışmada ise APEC suşlarının tavuk trake epitel hücrelerine spesifik bağlanmasının spesifik anti-tip 1 fimbria serumu ve tip 1 fimbrial adezinin hücresel reseptörü D-mannoz ile bloke edildiği belirlenmiştir (Gyimah ve Panigrahy, 1988).

Tip 1 fimbria *fimA* adı verilen bir ana proteinden ve *fimF*, *fimG* ve *fimH* yardımcı proteinlerinden oluşmuştur. Bunlar *E. coli* kromozomunda lokalize olan *fim* gen yığını tarafından kodlanmaktadır. Bu yığın 9 genden oluşmakta ve bunların 7 tanesi ekspresyon promotorunu da içeren eklenebilir bir element tarafından gerçekleştirilen tek bir operonda yer almaktadır. Tip 1 fimbrialar patojenik *E. coli*'lerde patojen olmayan kanatlı *E. coli* suşlarına oranla daha fazla bulunmaktadır. Dozois ve ark. (1992), *fimD* geninin varlığını 112 APEC izolatında %74 oranında bulmuşlar, fakat sağlıklı hayvanlardan izole edilen suşlarda sadece %55 oranında olduğunu belirlemişlerdir. Wooley ve ark. (1992), tip 1 fimbriaları kommensal suşların %57,5'sinde saptamalarına rağmen APEC suşlarının %100'ünde belirlediklerini bildirmişlerdir.

APEC'te tip 1 fimbriaların birçok varyantı tanımlanmış ve bunların suşların serotipleri ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bunlar klasik tip 1A fimbriyalardan temel fimbrial alt ünitelerinin moleküler ağırlığı ve immunolojik reaktivitesine göre ayrılmışlardır. Son zamanlarda bir APEC izolatının *fimA* geni üzerinde 4 değişken bölge saptanmış ki bunların en az 2 bölgesinin O2 serogrubuna ait izolatlara spesifik olabileceği düşünülmüştür. APEC suşlarına bağlı olarak *fimH* adezininin fimbriyanın ucunda veya fimbria boyunca başka bölgede yer aldığı belirlenmiştir. Bu farklı lokalizasyonların önemi bilinmemektedir (Suwanichkul ve Panigrahy, 1986; Dhoul-Moulin ve ark., 1990).

In-vivo olarak ise, tip 1 fimbria çoğunlukla trake, akciğerler ve hava keselerinde eksprese edilmiş ancak bunların ekspresyonu kanda veya başka bir organda saptanamamıştır. Bu durumun tip 1 fimbrialar'ın ekspresyonunun in-vivo çevresel koşullara bağlı olarak regülatör genler tarafından engellenmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür (Dozois ve ark., 1994; Pourbakhsh ve ark., 1997).

Tip 1 fimbriaların APEC infeksiyonlarındaki rolü tam olarak açıklanamamıştır. Marc ve ark. (1998), tip 1 fimbriaları kodlayan *fim* operonu çıkarılmış mutant bir suş kullanarak yaptığı çalışmada, mutant suşun trake ve hava keselerine kolonize olduğu ancak akciğerlere kolonize olmadığını göstermişlerdir.

Tip 1 fimbriaların APEC infeksiyonlarındaki rolü her ne kadar tartışılabilir olsa da APEC suşlarının immun sistemle olan ilişkisinde rol oynayabilecekleri ve bu nedenle tip 1 fimbriaların *E. coli*'leri fagositozdan koruyabileceği düşünülmüştür. Diğer çalışmalar ise, serumun bakterisidal etkilerine karşı direncin tip 1 fimbrialar ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Dozois ve ark., 1992; Wooley ve ark., 1992). Son olarak tip 1 fimbriaların *fimH* adezinleri vasıtasıyla mastosit aktivatörü olabileceği ve bu aktivasyonun bakterinin fagositozuna ve infeksiyon bölgesinde nötrofil toplanmasına yol açabileceği gösterilmiştir. Pourbakhsh ve ark. (1997), çok virulent olan APEC suşlarının tip 1 fimbria eksprese etmediklerinde, makrofajların bakterisidal etkilerine karşı dirençli olduklarını, ancak bu fimbriayı eksprese ettiklerinde ise duyarlı olduklarını göstermişlerdir. Tip 1 fimbriaların APEC'in virülensi üzerindeki etkileriyle ilgili daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir. Bu konu diğer ekstra-intestinal patojenik *E. coli*'ler, örneğin üriner sistem infeksiyonlarına yol açanlarda da halen tartışılmaktadır.

1.1.1.1.2. P fimbrialar, S fimbrialar ve afimbrial adezinler; P fimbrialar, S fimbrialar (sfa) ve afimbrial adezinler (afa) insan ve farklı hayvan eritrositlerini ortamda D-mannoz varlığında hemaglutine etme özelliğindedirler. S fimbrialar ve afimbrial adezinlerin yapıları ve infeksiyonların patogenezindeki rolleri hakkındaki bilgiler sınırlı olmasına rağmen mannoz dirençli fimbrialar arasında P fimbrialar iyi çalışılmıştır. P fimbrialar ilk olarak insanların üst üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *E. coli*'lerde saptanmıştır. Bunlar bakterilerin üriner sistem epitel hücrelerine bağlanmalarını sağlamakta ve piyelonefritis oluşumunda önemli bir virülens determinantı olmaktadır. P fimbrialar, kromozomal olarak yer alan ve 11 genden oluşan *pap* gen grubu tarafından kodlanmaktadır. P fimbria *papA* adı verilen temel fimbrial alt ünitesi ve ucunda da *papG* adı verilen fimbrial adezinden oluşmaktadır. P fimbriaların en az 11 alt tipi olduğu ve bunların da temel fimbrial alt ünitelerindeki antijenik farklılıklara dayanarak ayrımlarının yapıldığı bildirilmiştir. P fimbrianın reseptör spesifitesi *papG* adezini ile sağlanmaktadır ki, bunun sınıf I, II ve III varyantı identifiye edilmiştir. Bu varyantlar glikolipidlerin globosilerinin farklı izoreseptörlerini tanımaktadırlar ve bu glikolipidler gal-gal disakkaritini içermekte ve

bunun dışında da insan ve farklı hayvan eritrositlerinin mannoz dirençli hemaglutinasyonlarına (MRHA) göre de ayırt edilebilmektedirler (Kallenius ve ark., 1981).

Çeşitli çalışmalarda APEC suşlarının da insan ve diğer hayvanlarda ekstraintestinal hastalıklara neden olan *E. coli*'lerde sıklıkla belirlenen P fimbrialara sahip oldukları saptanmış, ancak MRHA yeteneğinde olan S fimbrialar (sfa) ve afimbrial adezinlerin (afa) ise düşük düzeyde kaldığı belirlenmiştir. Achtman ve ark. (1986), septisemik tavuklardan izole edilen O2 izolatlarının %52'sinin MRHA testiyle saptanan P fimbrial adezinler eksprese ettiklerini bulmuşlardır. Dozois ve ark. (1992), septisemili hindi ve tavuklardan izole edilen 112 *E. coli* izolatıyla yaptıkları bir çalışmada MRHA ve immunfloresans yoluyla P fimbrial adezin ekspresyonunu sadece septisemik tavuklardan izole edilen O18 izolatında gözlemlemişlerdir. O1 izolatlarının birindeki P fimbrial adezinin, N-terminal aminoasit sekanslama, immunblot ve kompetitif ELISA yöntemleri kullanılarak, insanlarda üst üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *E. coli* ile ilişkili olan P fimbria'ya çok yakın olduğu gösterilmiştir (Pourbakhsh ve Fairbrother, 1994). Van den Bosch ve ark. (1993), septisemili tavuklardan izole edilen 203 *E. coli* izolatının %78'inin P fimbrial adezinler eksprese ettiklerini ELISA ile saptamışlardır.

Dozois ve ark. (1992) tarafından yapılan bir çalışmada, *pap* ilişkili DNA sekanslarının *E. coli* izolatlarında yüksek oranda gözlemlenmiş olması dikkate değer bir bulgudur. Septisemik hindilerden izole edilen suşlarda, P fimbriaları kodlayan *pap* genlerini bulunduran izolatların 1 günlük yaştaki civcivlerde yüksek letaliteye sahip oldukları belirlenmiştir. Her ne kadar *pap* ilişkili DNA sekansları serogrup O1, O2 ve O78'deki izolatlarda bulunsa da P fimbrial adezinlerin in-vitro ekspresyonları sadece O1 ve O18 izolatlarında gözlenmiştir. Bu izolatların PCR ve Southern blot hibridizasyonu ile daha ileri araştırılmasında P fimbrial adezinleri kodlayan *pap* gen grubunun tam bir kopyasına sahip oldukları gösterilmiştir. Ayrıca, özellikle O78 serogrubuna ait olan izolatların P fimbrial adezinleri eksprese etmedikleri belirlenmiş ve bu fimbriaları eksprese etmemelerin nedeni olarak ise farklı P fimbrial gruplara sahip olabilecekleri düşünülmüştür (Dozois ve ark., 1995).

P fimbrial adezinlerin APEC'in patojenitesindeki rolleri henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. P fimbrial adezinlerin APEC'lerin in-vitro olarak tavuk trake ve farinks epitel hücrelerine bağlanmalarında rollerinin olmadığı ve solunum sisteminin bu kısımlarında P fimbrialar için spesifik reseptörlerin bulunmadığı bildirilmiştir (Van den Bosch ve ark., 1993; Vidotto ve ark., 1997). Pourbakhsh ve ark. (1997), P fimbriyalı bir APEC suşunu trake içine veya hava keseleri yoluyla inokülasyon yaptıkları tavuklarda P fimbriaya karşı spesifik antikörlerin üretildiğini ELISA ile saptamışlar ve bu fimbriaların in vivo olarak üretildiğini göstermişlerdir. İnokülasyon yapılan tavuklarda trakeye kolonize olan bakterilerde fimbrial adezin ekspresyonuna immunfloresans ile rastlanılmamıştır, ancak aynı tavukların hava keseleri, akciğerler ve iç organlarında P fimbria ekspresyonu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar konakçıdaki lokalizasyonlarına göre P fimbrial adezinlerin de in vivo olarak ekspresyonlarının çevresel şartlara bağlı olarak değiştiğini göstermekte ve P fimbrial adezinlerin üst solunum yoluna ilk kolonizasyonda önemli olmadıkları ancak infeksiyonun ileri aşamalarında rol oynadıkları görüşünü desteklemektedir.

1.1.1.1.3. Curli Fimbrialar; Curli fimbrialar ince, halka şeklinde kıvrılmış, saç benzeri yüzeysel uzantılardır ve ilk defa sığır mastitisinden izole edilen *E. coli*'lerde belirlenmiştir (Olsen ve ark., 1989). Kanatlı hayvanlardan izole edilen *E. coli*'lerde yapılan araştırmalarda varlığı belirlenmesine rağmen curli fimbriaların kanatlı koliseptisemisindeki rolü henüz tam olarak belirlenememiştir (Collinson ve ark., 1993).

1.1.1.1.4. Isıya Duyarlı Hemagglutininer; Provence ve Curtis III (1994), tarafından bir APEC suşunda düşük sıcaklıklarda eksprese edilen (26-30°C) ve 42°C'de baskılanan bir hemagglutinasyon aktivitesi saptamışlardır. Bu durum ısıya duyarlı hemagglutinasyon olarak isimlendirilmiştir. Bu suştan *tsh* geni klonlanmıştır. Bu genin kodladığı Tsh proteininin APEC'in patogenezisindeki fonksiyonu her ne kadar tam olarak açıklanmamış olsa da kanatlı orijinli *E. coli* izolatlarında varlığı bildirilmiştir.

1.1.1.2. Serumun Bakterisidal Etkilerine Karşı Dirençlilik; Serumdaki komplementin bakterisidal etkilerine karşı direnç; kapsül, lipopolisakkarid, ColV üretimi ve dış membran proteinleri sayesinde sağlanmaktadır ve bunlar septisemik kanatlı orijinli APEC izolatları ile ilişkilidirler (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999). Örneğin Ellis ve ark. (1988), hindilerden izole ettikleri *E. coli* izolatlarıyla yaptıkları bir çalışmada, damar içi olarak inoküle ettikleri 3 haftalık hindilerde serum direnci ile etkenin virülensi arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Dozois ve ark. (1992), serum dirençliliğinin septisemik hindilerden elde edilen izolatlar ve septisemik civcivlerden elde edilen izolatlardaki letalite ile ilişkili olduğunu septisemik ve sağlıklı kanatlılardan elde edilen 175 *E. coli* izolatının kullanıldığı bir çalışmada gözlemişlerdir. Ike ve ark. (1992), septisemik tavuklardan elde edilen 115 *E. coli*'de serum duyarlılığı ve bir günlük civcivlerde görülen letalite arasında güçlü bir ilişki bulmuşlardır. Wooley ve ark. (1992), yine septisemik ve sağlıklı kanatlılardan sağlanan izolatlar arasında güçlü bir ilişki bulmuştur. Nolan ve ark. (2003), virulent ve komplemente dirençli olan bir APEC izolatından, avirulent bir komplemente duyarlı mutant üretmişlerdir. Bu mutant saha suşundan 16.2 kDa'luk bir dış membran proteinini (traT) kodlayan *traT* geninin silinmesiyle oluşturulmuş ve bunun komplemente karşı olan dirençten sorumlu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca başka araştırmalarda serum dirençliliğinin septisemiyle ilişkili olduğu belirlenmiş ve komplement direncinin civcivlerde letalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Montenegro ve ark., 1985; Berkhoff ve Vinal, 1986). Ayrıca, APEC izolatlarında *traT* geni dışında *iss* geni ve *cvaC* geni gibi serum direncinden sorumlu genlerin varlığında bildirilmiştir (Delicato ve ark., 2003).

1.1.1.3. Aerobaktin Demir Elde Etme Sistemi; Hayvanların fizyolojik sıvılarındaki yaklaşık olarak 10^{-18} mol. L⁻¹ olan düşük serbest demir yoğunluğu, yaklaşık 10^{-6} lık yoğunluk gerektiren bakteriyel üreme için yeterli olmamaktadır. İnvazif karakterde olan birçok patojenik bakteri, konakçının transferin gibi sideroforları ile yarışabilen ve böylelikle düşük demirli çevrelerde bakteriyel üremeyi destekleyen yüksek afiniteli demir bağlayıcı sistemler geliştirmiştir (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999). APEC'ler demir elde edebilmek için transferin ile yarışan demir elde etme sistemleri ve sideroforlar (Aerobaktin ve enterobaktin) üreterek demir yokluğunda konakta

hayatta kalabilirler (Dho-Moulin ve Lafont,1984). Montgomerie ve ark. (1984), insan septisemi izolatlarının %75'inin aerobaktin ürettiğini belirlemiştir. Lafont ve ark. (1987), aerobaktin genlerini virulent türlerde belirlemiş ve avirulent türlerde olmadığını bildirmişlerdir. Aerobaktin genleri çoğunlukla izolatlarda kromozomal olarak bulunsun da, plazmid ya da kromozomal olarak taşınabilir. Ayrıca düşük demir varlığının bakterilerin üremesini sınırladığı belirlenmiştir (Payne, 1988).

Bolin ve Jensen (1987), hindi septisemilerinde *E. coli*'nin virülensi ve demir elde edilebilirliği arasında bağlantı kurmuşlar ve çeşitli çalışmalarla APEC izolatlarının çoğunluğunun demir elde edici sistem aerobaktine sahip olduğunu göstermişlerdir. Dozois ve ark. (1992), septisemik tavuklardan izole edilen *E. coli*'lerin %98 ve septisemik hindilerden izole edilenlerinde %73 oranında aerobaktin demir elde etme sistemine sahip olduğunu belirlemiştir. Dho-Moulin ve Lafont (1984), demirin sınırlı olduğu koşullarda kanatlı patojenik *E. coli*'lerin çoğalma yeteneği ile günlük civcivlerde letalite arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, APEC izolatlarında aerobaktin dışında demir bağlayıcı protein (*irp2*) ve yersiniabaktin (*fyuA*) gibi demir elde etme sistemlerini kodlayan genlerinin varlığı da belirlenmiştir (Karch ve ark., 1999; Janssen ve ark., 2001).

1.1.1.4. Toksinler; APEC O2, O45 ve O109 serotiplerinde tavuk letal toksin varlığı rapor edilmiştir (Truscott, 1973). Ancak bu toksin APEC'te yaygın değildir. Enterotoksijenik serotipler O8 ve O149 septisemi ile tavuk enteritiserinde görülür. Bu izolatlar genellikle ısıya duyarlı toksin (LT) ve ısıya dayanıklı toksin (ST) sentezler. Bu toksinleri taşıyan genler plazmid, transpozon veya bakteriyel kromozomlarda bulunabilirler. ETEC'den kaynaklanan tavuk ishalleri nadiren rapor edilmiştir. Verotoksijenik *E. coli*'ler (VTEC) kanatlılardan izole edilmekle birlikte, tavuk hastalıklarında büyük bir neden olarak gösterilmezler. Enteroinvazif (EIEC), enteropatojenik (EPEC) ve enterohemorajik (EHEC) *E. coli*'ler, diğer evcil hayvanlarda sıklıkla izole edilir ve bunlar kanatlı hayvanlarda O1, O2 ve O78 serotiplerinden daha az sıklıkta hastalığa neden olur. Memelilerde ekstra-intestinal infeksiyonlardan izole edilen *E. coli*'lerde varlığı belirlenmiş olan Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1 (CNF 1) kanatlı izolatu *E. coli*'lerde nadiren belirlenmiştir (Dho-

Moulin ve Fairbrother, 1999). Blanco ve ark. (1997), 625 kanatlı izolatından sadece %7'sinin toksijenik olduğunu belirlemiştir. Salvadori ve ark. (2001), APEC izolatlarının tavuk embriyo fibroblast ve primer tavuk böbrek hücrelerinde sitotoksik etkiler oluşturduğunu bulmuşlardır. Yabani kanatlılardan izole edilen APEC O86:K61'in sito letal toksin üretme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Bu APEC, invaziflik ve etkileri açısından EPEC' e benzerlik göstermektedir.

1.1.1.5. Hemolizin; *E. coli*'ler alfa ve beta hemolizin sentezler. Alfa-Hemolizin konak hücre proteinlerini hasara uğratar. İnsanlar ve memeli hayvanlarda ekstra-intestinal infeksiyonlara neden olan *E. coli*'lerin patogeneğinde hemolizin'in eritrositleri parçalayarak etkenlerin demir ihtiyacını sağlamasında önemli bir virülens özelliği olduğu düşünülür (Orskov ve Orskov, 1985). Alfa-Hemolizin üretiminden yoksun bırakılan mutantlarda virülensin azaldığı belirlenmiştir. APEC izolatlarının az bir kısmının hemolizin ürettiği ancak bunların koyun kanı katılmış besiyerinde alfa-hemolizden farklı bir hemolize neden olduğu bildirilmiştir (Reingold ve ark., 1999). Blanco ve ark.(1997), tavuklardan izole edilen 625 *E. coli* izolatından sadece %2,6'sının hemolizin ürettiğini bildirmişlerdir.

1.1.1.6. Hareketlilik; Nadir olarak hareketsiz suşlar izole edilmesine rağmen çoğu APEC suşunun peritrik flagellaları sayesinde hareketli oldukları belirlenmiştir. Flagellasız bir APEC mutantının kullanıldığı çalışmalarda (La Ragione ve ark., 2000a; La Ragione ve ark., 2000b), tavuk bağırsak ve trake hücrelerine bu suşun bağlanmasında azalma olduğu belirlenmişlerdir. Araştırmacılar, bu nedenle flagellanın mukus tabakasını geçerek adezyonun oluşmasında bir özellik olduğunu ve ayrıca kolonizasyon, invazyon ve tavuklarda kalıcılık açısından önemli olduğunu da bildirmişlerdir.

1.1.1.7. Kapsüler Antijen; K1 kapsül antijeninin varlığı APEC izolatlarında belirlenmiş ve etkenlerin infeksiyon yapma yeteneği açısından önemli bir virülens faktörü olduğu gösterilmiştir (Bree ve ark., 1989).

1.1.1.8. Kolisin V Plazmid; Çoğu APEC izolatının kolisin V geni (ColV) taşıyan plazmidlere sahip oldukları belirlenmiştir. Aerobaktin demir elde etme sistemini kodlayan genlerin de tamamının bu plazmidlerde yerleşik olduğu gösterilmiştir (La Ragione ve Woodward, 2002).

1.1.1.9. Kongo Red İle Boyanma; Çoğu virulent kanatlı *E. coli* izolatları, Kongo Red ile boyanma özelliğindedir. Bu ilişki kesin olmasa da eğer izolatlar Kongo Red ile boyanıyorsa invazif oldukları düşünülür. İnfekte kanatlıların lezyonlarından izole edilen *E. coli* izolatlarının tamamının boyanmasına rağmen, kloaka, trake ve kanatlı barınaklarından izole edilen izolatlarda bu oran %50 oranında belirlenmiştir (Berkhoff ve Vinal, 1986).

1.1.1.10. Asit Toleransı; APEC izolatlarının in-vitro testlerde kanatlı hayvanlar için patojen olmayan *E. coli*'lere nazaran aside karşı dirençli oldukları gösterilmiştir. Bu özelliğin APEC'lerin kanatlıların asidik sindirim sisteminde hayatta kalabilmesine yardımcı olduğu düşünülmüştür (La Ragione ve Woodward, 2002).

1.2. Epidemiyoloji

Kanatlı hayvanların sindirim kanalı *E. coli*'nin doğal konağıdır ve *E. coli*'lerin büyük çoğunluğu patojen değildir. Fakat *Avian Pathogenic Escherichia coli* ya da "APEC" olarak adlandırılan bir bölümü belirli serotiplere ait olan "Kolibasillozis Sendromları" ile ilişkilidir. Kolibasillozis, *Kanatlı Patojenik Escherichia coli* (APEC) ile direkt ya da kısmi olarak ilgili sistemik ya da lokalize infeksiyonları içerir. Bu sendromlar ile ilişkili lezyonlar ve onların görünüşleri hayvanların yaşına göre değişebilir (sarı kesesi infeksiyonu, koliseptisemi, kronik solunum hastalığı, salpingitis, derinin kronik yangısı, şişkin baş sendromu, osteomyelitis). Lezyonlar sadece *E. coli* yi göstermez, çünkü diğer fırsatçı patojenler de *E. coli* benzeri infeksiyonlara neden olabilirler. Memelilerde kolibasillozis birincil olarak bağırsak hastalığıdır, fakat kanatlılarda konak savunması kırıldığında sekonder etken olarak ya da virulent bir *E. coli* suşu ile tipik olarak sistemik ya da lokalize infeksiyonlar oluştururlar. Diğer infeksiyon etkenleri ya da infeksiyöz olmayan etkenler hazırlayıcı

faktörlerdir. *Escherichia* cinsi içinde yer alan ve *E. coli* ile ilişkili bir tür olan *E. fergusonii* hindilerden izole edilmiştir, fakat onun potansiyel patojen rolü bilinmemektedir (Farmer ve ark., 1985).

Kanatlılarda *E. coli*'nin en önemli kaynağı hayvanların sindirim kanalıdır. Bağırsakta bulunan *E. coli*'lerin %10-15'inin potansiyel olarak patojenik serotiplere ait serotipler oldukları belirlenmiştir. Tavuklarda, *E. coli* konsantrasyonu dışkı materyalinin her gramında yaklaşık olarak 10^6 kob (koloni oluşturan birim) olarak belirlenmiştir. En yüksek *E. coli* konsantrasyonu 3 haftalıktan küçük hayvanlarda, sindirim kanalının posteriöründe saptanmıştır (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999).

E. coli tozlar aracılığı ile çok kolayca taşınabilir (Oyetunde ve ark., 1978). Kanatlı yemlerinde toz ile kontaminasyon sonucunda yemin her gramının 10^6 kob *E. coli* içerebileceği belirlenmiş ve bunlardan kanatlı patojenik *E. coli* serotiplerinin belirlenmesi önemli bir kanıt olarak ortaya sürülmüştür. Bu bakteriler gıda ve içme suyunda da bulunabilir. Ayrıca *E. coli* etkenlerinin dışkılarda fazla oranda bulunması nedeniyle oluşan yumurta bulaşmalarında, mikroorganizmanın kuluçkalanma esnasında fazla miktarda üremesine ve dolayısıyla çıkımdan sonraki ilk dönemde ölümler şekillenebilmektedir. Eğer kuluçkada özellikle de çıkım makinesinde kontaminasyonlar oluşmuşsa, ölüm düzeyleri artmaktadır. Bu kontaminasyonda damızlık kümeslerde yumurta toplama sıklığı da dahil olmak üzere kuluçkalık yumurta bakım-idaresinde problemler (yer yumurtasının fazla olması, eksik fumigasyon, yanlış depolama vs.) rol oynamaktadır (Jordan ve Pattison, 1996; Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999).

Kanatlılardan izole edilen çoğu APEC suşu sadece kuşlar için patojendir ve insanlar ya da diğer hayvanlar için düşük bir risk oluştururlar (Caya ve ark., 1999). Fakat insanların önemli bir enterohemorajik patojeni olan ve shiga toksin üreten *E. coli* O157/H7 ye tavuklar oldukça duyarlıdır. Ancak, tavuk ve hindilerde çeşitli coğrafik alanlarda doğal infeksiyon çok az görülmüştür (Guo ve ark., 1998; Heuvelink ve ark., 1999; Pilipcinec ve ark., 1999). Ayrıca kesimhanelerde bu etken ile kanatlı etleri kontamine olabilir, kontamine hindi etlerinden kaynaklı gıda ilişkili salgınlar bildirilmiştir (Beery ve ark., 1985; Doyle ve Schoeni, 1987; Griffin ve

Tauxe, 1991; Stavric ve ark.,1993). Şehir güvercinlerinde shiga toksin üreten *E. coli*'ler ile klonal ilişkili *E. coli* infeksiyonları %6-16 oranında saptanmış ve infeksiyonun genç güvercinlerde yaşlılara oranla daha fazla olduğu bildirilmiştir (%8,2 ye karşı %17,9). Güvercinler bu organizmanın doğal konağı olabilirler (Dell'Omo ve ark., 1998; Schmidt ve ark., 2000; Morabito ve ark., 2001). İskoçya da sığırlardan izole edilen *E. coli* O157'ler ile yabancı kazlardan izole edilenlerin moleküler epidemiyolojik olarak ilişkili oldukları belirlenmiştir (Van den Bogaard ve ark., 2001).

Kanatlı hayvanların bağırsaklarında ısıya dirençli enterotoksinler için duyarlı reseptörlerin varlığı belirlenmiştir (Krause ve ark., 1995), fakat insanlarda ishalli olgulardan izole edilen ısıya dirençli ve duyarlı toksinler sentezleyen serotipler ve suşlar kanatlı hayvanlardan çok nadir olarak izole edilmiştir (Akashi ve ark., 1993; Blanco ve ark., 1997).

Kanatlılarda ve diğer hayvanlarda patojen *E. coli*'lerin özellikleri ortaktır ve kanatlı suşları antibiyotik direnci ve virülens özelliklerini kodlayan genler ve plazmidlerin bir kaynağı olabilirler (Lafont ve ark., 1987; Chulasiri ve Suthienkul, 1989). Benzer antibiyotik direnç durumları bu kanatlı hayvanlar ile çalışan insanlardan izole edilen *E. coli*'lerde görülmüştür, kimi olgularda spesifik suşlar, kanatlı hayvanlar ve işçiler arasında ortaktır. Bu bulgular dirençli organizmalar ya da plazmidlerin kanatlılardan insanlara geçişinin yaygın olduğunu işaret eder (Van den Bogaard ve ark., 2001). Bu özelliklerinden dolayı kanatlı patojenik *E. coli*'ler gıda ilişkili patojenlerin yeni bir sınıfı olarak önerilmektedir (Smith ve ark., 2007).

1.3. Patogenez

Son yıllardaki biyoteknolojik çalışmalar sayesinde kanatlı patojeni *E. coli*'lerle ilişkili hastalık lezyonlarının nasıl geliştiği ve APEC'in bu lezyonları hangi mekanizmalarla oluşturduğuna dair bilgiler oldukça artmıştır. Patojen etkenin birincil giriş yeri sağlıklı hayvanların sindirim kanalından saçılan *E. coli*'ler ile kontamine toz parçacıklarının solunum yolu ile alınmasına bağlı olarak solunum kanalıdır.

Bağırsaklar Avian Patojenik *E. coli*'lerin en önemli kaynağıdır. Üst solunum yollarında ilk çoğalmanın ardından, bakteriler hava keseleri ve akciğerler olarak bilinen esas solunum alanına yerleşirler. Üçüncü aşamada, bakteriler kana ulaşırlar ve kalp, karaciğer ve dalak gibi iç organlara kolonize olurlar (Jordan ve Pattison, 1996).

Genellikle tüm invazif *E. coli* suşları gibi APEC'lerin de tip1 fimbria ürettikleri belirlenmiştir ve bu fimbriaların bakterilerin solunum kanalına kolonizasyonunda önemli bir rolü olduğu ileri sürülmektedir (Dozois ve ark., 1992; Wooley ve ark., 1992; Pourbakhsh ve ark., 1997). Ancak P fimbriaların *E. coli*'nin solunum kanalına kolonizasyonu ile ilgili mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Bu faktörün, infeksiyonun ileri aşamalarında önemli olduğu düşünülmektedir (Pourbakhsh ve Fairbrother, 1994; Pourbakhsh ve ark., 1997). APEC'in solunum epitelini geçişi, mukoza ve submukozanın derinlerine inmesinin mekanizması tam olarak hala belirlenememiştir (Mainil, 2007). APEC'ler, kan dolaşımına ulaştıklarında konak organizmanın immun sistemi ile karşılaşır. Bakterilerin yüzeylerindeki O ve K antijenlerinin varlığının APEC'lere kendilerini immun sistemin etkilerinden korumalarına yardım ettiği düşünülür. Bunun dışında APEC'lerin *traT*, *iss* ve *cvaC* gibi etkene serum direnç özelliği kazandıran spesifik proteinler ürettikleri belirlenmiştir (Montenegro ve ark., 1985; Berkhoff ve Vinal, 1986; Nolan ve ark., 2003). Fakat etkenlerin karşılaştıkları bir diğer sorun hayatta kalmaları ve üremeleri için gereken serbest demir yoğunluğunun konak dokularında çok düşük (yaklaşık 10^{-18} mol/L) düzeyde olmasıdır. Bakterilerin canlı vücudu içinde demir elde etmek amacıyla çeşitli demir elde etme sistemleri (siderofor) geliştirdikleri belirlenmiştir. *E. coli*'nin en güçlü sideroforlarının enterobaktin ve aerobaktin olduğu belirlenmiş ve APEC'lerde aerobaktinin daha avantajlı olduğu anlaşılmıştır (Dho-Moulin ve Lafont, 1984). Hemolizinlerin üretiminin *E. coli*'lerin patogeneğinde önemli bir özellik olduğu belirlenmiş (Orskov ve Orskov, 1985), ancak bu özellik APEC'lerde nadiren bildirilmiştir (Blanco ve ark., 1997). Çeşitli çalışmalarda çok az APEC'in farklı sitotoksinler ürettiği belirlenmiş (Tsuji ve ark., 1990; Emery ve ark., 1992; Blanco ve ark., 1997), ancak, APEC infeksiyonları esnasında hücre ve doku hasarının henüz belirlenmemiş toksinlerden ya da sadece

konağın yangısal cevabından kaynaklandığı düşünülmektedir (Vidotto ve ark., 1997; Mainil, 2007).

1.4. Semptomlar

Kolibasillozisin semptomları etkiledikleri sisteme göre değişmektedir. Kanatlılarda, *E. coli*'nin primer veya sekonder olarak etken olduğu infeksiyonlar, solunum sistemi kolibasillozisi, koliseptisemi, salpingitis, artrit, sinovitisler, koligranuloma, embriyonik ölümler, omfalitis ve yumurta sarı kesesi yangısıdır (İzgür, 2002).

APEC tavuk, hindi, ördek ve diğer kanatlı türlerinde ishal gelişiminin gözlenmediği daha çok ekstra intestinal dokuların infeksiyonu ile ilişkilidir. Yumurta yüzeyinin fekal kontaminasyonunu takiben, yumurta inkübasyon döneminin sonlarında, yumurta sarı kesesi infeksiyonları sıkça görülmektedir. Bunlar embriyonal ve kuluçka sonrası 3 haftalığa kadar olan genç kanatlıların ölümüyle sonuçlanmaktadır. APEC in neden olduğu en önemli hastalık sendromu hava kesesi yangısı veya hava kesesi hastalığı olarak da tanımlanan bir solunum kanalı hastalığı olarak başlamaktadır. Eğer bu aşamada kontrol edilmezse poliserozitis olarak kendini belli eden bakteriyemi ve generalize infeksiyona dönüşebilmektedir (Barnes ve Gross,1997).

Solunum yolu kompleksi, 4 ila 9 haftalık yaştaki kanatlılarda gözlenmekte ve %20 oranında mortalite, gelişme geriliği, beslenme yetersizliği ve kesimhanelerde yüksek kayıp ile örneklenebilecek ekonomik kayıplara yol açmaktadır. APEC'in solunum yolu infeksiyonu, Newcastle Hastalığı Virus (NDV), İnfeksiyöz Bronşitis Virus (IBV) ve Mycoplasma gallisepticum veya NDV, IBV aşı suşları gibi solunum yolu ajanlarının yol açtığı infeksiyonlar sekonder olarak gelişmektedir (Nakamura ve ark., 1992). APEC infeksiyonuna karşı kanatlı hayvanların duyarlılığı, ortamda bulunan amonyak ve toza maruz kalma sonrasında hayvanların üst solunum yolu epitel hücrelerindeki siliaların kaybından kaynaklanmaktadır. APEC'in iştirak ettiği solunum yolu infeksiyonu depresyon, ateş ve ölüm ile sonuçlanmaktadır. Solunum yolu lezyonları serözden fibrinöze değişen eksudatın görüldüğü hava kesesi yangısı, başlangıçtaki heterofil infiltrasyonunu izleyen mononükleer fagosit artışını

içermektedir. Daha generalize infeksiyonlarda, perikarditis, peritonitis ve karaciğerin safra ile boyanması, nekrotik odakların varlığı veya yokluğu ile seyredilmektedir. Yumurta tavuklarında APEC sol abdominal hava kesesi yoluyla oviduktu infekte edip salpingitis ve yumurta verimi kayıplarına yol açabilmektedir. Bunun yanında APEC ovidukt yoluyla peritoneal boşluğa sporadik olarak invaze olup peritonitis ve ölüme neden olabilmektedir (Barnes ve Gross,1997). Broilerler, broiler damızlıkları ve anaçlarda APEC Şişkin Baş Sendromu olarak da bilinen ve hindi rhinotracheitis virusu veya IBV, NDV gibi diğer viruslar ile oluşan infeksiyonu takiben özel bir sendroma yol açabilmektedir. Bu sendromda gözlenen semptomlar selülit, yüz derisinde ve periorbital dokularda ödemi içermektedir (Aydın ve ark., 1993). Broilerlerde APEC selülit, karın altı ve butlarda nekrotik dermatitis ile ilişkili olmaktadır. Bu hastalık son yıllarda daha sıkça rapor edilmekte ve klinik semptom ve ölümlere yol açmasa bile kesimhanelerde subkutanöz fibrinöz lezyonlar nedeniyle ıskartaya yol açması yönünden fazla ekonomik kayıplarla sonuçlanmaktadır (Elfadil ve ark., 1996). Her ne kadar, enterotoksijenik *E. coli*'lerin kanatlılarda bazı zamanlarda ishal salgınlarına yol açtığı gözlenirse de APEC genel olarak intestinal hastalıkların sebebi olarak gösterilmemektedir (Akashi ve ark., 1993).

1.5. Teşhis

Kanatlı kolibasillozisinin teşhisi, öncelikle, klinik görünüm ve hava kesesi yangısı, perihepatitis ve perikarditis gibi lezyonların görülmesine dayanır. Fakat bu lezyonların diğer patojen etkenler tarafından da oluşturulabileceği unutulmamalıdır (Barnes ve Gross,1997).

1.6. Ayırıcı Teşhis

Hava kesesi yangısı *Mycoplasma* spp. veya *Chlamydophila* spp. infeksiyonları sonucunda olabilir. Perikarditis bazen *Chlamydophila* spp. infeksiyonları ile perihepatitis *Salmonella* spp. ya da *Pasteurella* spp. infeksiyonları ile ilişkilidir. Kolibasillozisin diğer görünümleri etiyojolojiye görede değişebilir. Böylece, *Aerobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp.

ya da *Enterococcus* spp. gibi mikroorganizmalar sarı kesesinden saf olarak izole edilebilir (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999).

Akut sepsisemiler *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp., ya da *Streptococcus* spp. infeksiyonlarından kaynaklanabilir. Sinovitis ve artrit viral infeksiyonlar, *Mycoplasma synoviae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. ya da *Streptobacillus moniliformis* infeksiyonlarının sonucunda olabilir. Granülomlar bazen viral (Marek Hastalığı) veya bakteriyel (*Mycobacterium avium*) infeksiyonlardan kaynaklanabilir (İzgür, 2002).

1.7. Laboratuvar Muayeneleri

1.7.1. Bakteriyoskopi; Lezyonlu bölgelerden hazırlanan preparatlar Gram boyama yöntemi ile boyanır. Gram negatif çomak tarzında etkenlerin görülmesi *E. coli* olasılığını güçlendirir (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999).

1.7.2. Kültür; İzolasyon kalp kanından ve infekte dokulardan herhangi bir bağırsak kontaminasyonuna dikkat edilerek alınan örneklerden yapılır. Ekimler kanlı agar, EMB agar veya MacConkey agar gibi uygun bir besiyerine yapılmalıdır. 24 saat 37°C'lik inkübasyondan sonra üreyen koloniler biyokimyasal testler ile incelenir. *Escherichia coli* olduğu belirlenen izolatlarda, etkenlerin serumun bakterisidal etkilerine karşı direnci, tavuk ve çeşitli memeli hayvanlardan elde edilen serumlar kullanılarak belirlenebilir, serum direncinden sorumlu olduğu bilinen proteinlerin varlığı ELISA ile belirlenebilir. Aerobaktin demir elde etme sistemleri, demir bağlayıcı maddeler katılmış besiyerlerinde etkenlerin üremesi, indikatör suşlar kullanılarak biyolojik testler ve ELISA gibi immunolojik testler ile yapılır. Etkenlerin mannoz duyarlı hemaglutinasyon (tip 1 fimbrialar) ve mannoz dirençli hemaglutinasyon (P fimbrialar, S fimbrialar ve afimbrial adezinler) özellikleri fenotipik olarak insan ve çeşitli hayvanlardan elde edilen eritrositler kullanılarak ya da ELISA ile bu fimbriaların varlığı belirlenebilir. Alfa-hemoliz, koyun kanı katılmış besiyerlerinde üreyen kolonilerin hemoliz yapıp yapmamalarına göre değerlendirilir. Sitotoksik nekrotizan faktör 1 ise, Vero ve Hela hücre kültürlerinde yaptıkları

değişiklikler veya hayvan deneyleri ile belirlenebilir. (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999).

1.7.3. Serolojik Testler; *E. coli*'den kaynaklanan hastalıkla ilişkili serotipleri belirlemek için dünyada çok çeşitli bölgelerde çalışmalar yapılmıştır. Avian Patojenik *E. coli* 'ler hakkında yapılan ilk çalışmalarda en sık rastlanan serotipler O1, O2, O35 ve O78 olarak belirlenmiştir (Barnes ve Gross, 1997). Dozois ve ark. (1992) tarafından, Kanada da kanatlı hayvanlarda kolibasilozis olgularından izole edilen 112 adet *E. coli* izolatu ile yapılan bir çalışmada, toplam olarak 16 serotip belirlenmiş ve bunlar arasında O78 (%52) ve O1 (%6)'in en sık belirlenen serotipler oldukları bildirilmiştir. Uygulamaya konulan diğer çalışmalarda, O8, O15, O18, O35, O88, O109, O115 ve O116 gibi diğer serotipler bulunsa da en çok bulunan ve en patojenik serotiplerin O1, O2 ve O78 olduğu ve bunların araştırılan tüm stoklarda %15'ten %61'e değişen oranlarda bulunduğu bildirilmiştir (Brée ve ark., 1989; Dho-Moulin ve ark., 1990; Babai ve ark., 1997; Blanco ve ark., 1997; Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999). Yapılan bu çalışmalar sonucunda coğrafik alanlara göre değişiklikler olmasına rağmen en çok rastlanılan serotiplerin O1, O2, O35 ve O78 olduğu kesinleşmiştir. Blanco ve ark. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada, kolibasilozisli tavuklardan izole edilen 458 ve sağlıklı tavuklardan izole edilen 167 *E. coli* izolatu serotipleri yönünden karşılaştırılmış ve 62 farklı O serotipi bulunmuş ve bunların sadece %15'inin O1, O2, O35, O36 ve O78 serotiplerine ait oldukları bildirilmiştir. Diğerlerinin çoğu daha önce kanatlılarda kolibasilozis ile ilgisi bildirilmemiş olan O18, O81, O115, O116 ve O 132 dir. Bu saptama yeni patojen serotiplerin ortaya çıktığına dair bir delil olarak düşünülmüştür.

1.7.4. Toksin özellikleri; *E. coli*'lerde toksinlerin varlığını fenotipik olarak belirlemek amacıyla hayvan deneyleri, hücre kültürleri ve ELISA gibi immunolojik testler kullanılmıştır (Winn ve ark., 2006), ayrıca bu toksinleri kodlayan genler PCR ile moleküler olarak belirlenmiştir (Ngeleka ve ark., 1996; Janssen ve ark., 2001; Knöbl ve ark., 2001; Delicato ve ark., 2003). APEC'in toksijenik özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda ilk olarak APEC'lerin tavuk letal toksini gibi ekzotoksinler üretebileceği öne sürülmüştür (Truscott, 1973). Ayrıca APEC'lerde Vero ve Hela

hücre kültürleri kullanılarak yapılan çalışmalarda ısıya duyarlı toksin (labil toksin) belirlenmiştir (Tsuji ve ark., 1990; Emery ve ark., 1992; Fantinatti ve ark., 1994).

Daha sonraları, Blanco ve ark. (1997), septisemik ve sağlıklı tavuklardan elde edilen *E. coli*'lerin Vero hücrelerini değil Hela hücrelerinde sitotoksik etki oluşturduklarını belirlemişlerdir. Ancak Perreira ve Yano (1998), şişkin baş sendromlu tavuklardan elde edilen izolatlarda Vero ve Hela hücrelerine etkileyen toksin üretimi göstermişlerdir.

Janssen ve ark. (2001), *E. coli*'lerde *astA* geni tarafından kodlanan ısıya dayanıklı toksin (ST) varlığını saptamışlar ve ayrıca çalıştıkları izolatlarda *cnf 1* geni varlığını belirlemişlerdir.

1.7.5. Moleküler Teşhis; Son yıllarda gelişen moleküler teşhis ve tiplendirme yöntemleri kanatlı patojeni *E. coli*'lerle ilgili olarak yapılan araştırmalarda sıklıkla kullanılmıştır (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999). Virülenste önemli spesifik genleri belirlemek için DNA probları ve PCR teknikleri geliştirilmiştir (La Ragione ve Woodward, 2002). *E. coli*'de önemli olduğu bilinen virülens özelliklerini kodlayan genler spesifik primerler kullanılarak PCR ile ya da DNA hibridizasyon teknikleri ile başarılı bir şekilde belirlenmiş ve bunlardan *iucD*, *tsh*, *fimC*, *fyuA*, *irp2*, *papC* ve *astA* olmak üzere yedi virülens geninin APEC'lerde en yaygın bulunan virülens genleri oldukları bildirilmiştir. APEC'lerde araştırılan izolatlarda ortak olarak belirlenen bu genlerin bulunma sıklıklarından yararlanılarak etkenlerin PCR ile moleküler patotiplendirmeleri yapılmıştır (Ngeleka ve ark., 1996; Janssen ve ark., 2001; Delicato ve ark., 2003).

Escherichia coli ile ilgili epidemiyolojik çalışmalarda farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), MLEE (multilokus enzim elektroforezi) ve PFGE (Pulsed Field Gel Elektroforezi) bulunmaktadır. *E. coli*'nin klonal tiplerinin belirlenmesinde kullanılan RAPD yönteminin, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) tekniğine göre daha ucuz ve daha hızlı bir teknik olduğu belirlenmiştir (Chansiripornchai ve ark., 2001). Chansiripornchai ve ark.(2001), 55 kanatlı

patojenik *E.coli* izolatını RAPD analizi ile 3 kluster ve 50 alt tipe ayırmışlar ancak bu tekniğin patojen ve patojen olmayan suşların ayırımında yeterli olmadığı sonucuna varmışlardır. Benzer bir çalışmada (Maurer ve ark., 1998), sağlıklı ve hasta hayvanlardan izole edilen bir koleksiyonda 60 farklı RAPD tipi saptamışlardır. Tipler arasında farklılıklar belirlenmiş, fakat sadece hasta hayvanlardan izole edilen ve izolatların %23'ünde bulunan bir RAPD tipinin dışında farklılık tam olarak belirlenememiştir. Ayrıca RAPD tipleri ile antibiyotik direnç profillerinin aynı olmadıklarını da gözlemlemişlerdir. Farklı ülkelerde tavuk ve hindilerden izole edilen *E. coli*'lerde multilokus enzim elektroforezi kullanılarak spesifik genotipler belirlenmiş ve kolibasilozise neden olan izolatların çok az klonal tipe ayrıldıkları saptanmıştır. Aynı klonal grup içindeki izolatların sahip oldukları virülens özelliklerinin çok az değiştiği, fakat farklı klonal gruplara ait suşlar arasında dikkate değer ölçüde değişiklik olduğu bildirilmiştir (White ve ark., 1993). Pulsed Field Jel Elektroforezi ile tavuklardan izole edilen *E. coli*'lerin analizinde mikroorganizmaların spesifik tiplerinin çiftlikler ve takip eden sürülerde sürekli olarak ilişkili olduğu belirlenmiştir (Singer ve ark., 1999; Singer ve ark., 2000).

1.7.6. Hayvan Deneyleri; Hayvanlarda yapılan deneysel modellerin önemli bir kısmı kolibasilozis çalışması çatısı altında; tavuk ve hindilerden izole edilen *E. coli*'lerin patogenezi hakkında bilgi sağlamak amacı ile yapılmıştır. Allantoik boşluğa yapılan in ovo inokülasyonlar ile embriyonik ölüm oranları ya da bir günlük yaştaki civcivlere deri altı yolla yapılan inokülasyonlarla inokülasyonu takiben 48'inci ve 72'inci saatlerde ölüm oranları hesaplanarak izole edilen suşların invazif patojenik özellikleri araştırılmıştır (Pourbakhsh ve ark., 1997; Wooley ve ark., 2000).

Bir diğer model de bakterinin 3 haftalık yaştaki "Spesifik Patojen Free" (SPF) hayvanların torasik hava kesesine inokülasyondur. Bu modelin amacı inoküle edilen bakterinin kolibasilozis semptomları oluşturması ve bakteriyemi ya da septisemiye artırıp artırmadığını araştırmaktır (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999).

Son olarak, 15 günlük yaştaki hayvanlara trake içine inokülasyon modeli vardır. Bu modelde steril bir enjektör ile trake içine *E. coli* inokülasyonunu takiben İnfeksiyöz Bronşitis virusu (Massachusetts serotipi) sprey olarak inoküle edilir. Bu

modelin amacı *E. coli* infeksiyonlarının doğal koşullarını mümkün olduğunca oluşturabilmektir (Brée ve ark., 1989; Dozois ve ark., 1994; Arne ve ark., 2000; Peighambari ve ark., 2000).

Septisemik kanatlı *E. coli* suşlarının patojenik mekanizmalarını araştırmayı amaçlayan çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Son yıllardaki çalışmalarla toksinler, adezinler ve demir elde etme sistemleri gibi kanatlı septisemisiyle ilişkili virülens özelliklerinin belirlenmesine rağmen, spesifik virülens özellikleri ve bunları kodlayan genlerin düzenlenmesini sağlayan mekanizmalar tam olarak anlaşılabilirken sınırlı kalmıştır (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999).

1.8. Sağaltım

Şu anda sadece antibiyotik uygulamasına dayanmaktadır. Sulfonamidler, betalaktamlar ve kinolonlar en çok kullanılan antibiyotiklerdir. Fakat antibiyotiklerin kullanımı çok büyük dikkat gerektirir. Çünkü son yıllardaki çalışmalar kanatlı patojenik *E. coli*'lerde çok yüksek düzeyde antibiyotik direncinin geliştiğini ve bu hayvanlarla çalışan insanlardan izole edilen *E. coli*'lerin benzer antibiyotik direnç profillerine sahip olduklarını göstermiştir. Bu nedenle antibiyotik tedavileri antibiyogram testleri sonuçlarına göre uygulamaya konulmalıdır ve fagositlerin etkisini artırabilmek amacıyla da ek olarak askorbik asit tedavisi uygulanabilir (Barnes ve Gross,1997).

1.9. Koruma

Solunum yolu infeksiyonları ile ilgili hazırlayıcı etkenleri azaltmak için hayvansal veya hayvansal olmayan taşıyıcılar ile çevresel kontaminasyonun kontrolü amaçlanır. Metotlardan birisi patojenik serogruplar ile fekal kontaminasyonu önlemektir. Örneğin, *E. coli*'nin annelerden civcivlere geçişinin engellenmesi için yumurtaların yumurtlamayı takiben iki saat içinde fumigasyonu yapılarak *E. coli*'lerin yumurta yüzeyine bulaşması engellenebilir (Barnes ve Gross,1997). Hayvanların solunum sistemi infeksiyonları diğer viral ve bakteriyel etkenlerden korunarak; nem,

havalandırma, havanın toz ve amonyak düzeyi gibi çevresel faktörler düzeltilerek azaltılabilir (Oyetunde ve ark., 1978). Kemiriciler, sinekler ve böcekler de etkenin kaynağı olabilirler ve bunlarda yok edilmelidir. İçme suyu kalitesi de çok önemlidir, su düzenli bir şekilde değiştirilmelidir. Hayvanların yaşlarına ve türlerine göre ayrılması, temizlik ve her sürü arasında dezenfeksiyon gibi genel güvenlik önlemlerinin uygulanması kolibasillozisten korunmada önemlidir (Jordan ve Pattison, 1996). Son olarak, genç hayvanlara sprey tarzında aşılama yapılması *E. coli*'den korunmada uygun değildir (Barnes ve Gross,1997).

Şu an için tam olarak etkili bir aşı yoktur. Fakat attenüe aşılama kullanılarak yapılan aşılama denemeleri vardır. Bunlar sadece aynı serotipteki etkenlerle karşılaşıldığında etkili olmuş, ancak farklı serotipteki etkenler ile karşılaşıldığında başarısız olmuştur (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999). Aynı şekilde genç kanatlılara pasif immunizasyon yapılabilmektedir ancak başarısı yine sadece serotipteki etkenlerle sınırlı kalmıştır (Barnes ve Gross, 1997).

Bu çalışmada, kanatlı hayvanlardan izole edilen 200 adet *E. coli* suşunda, özellikle ekstra-intestinal infeksiyonlar için önemli olan virülens faktörlerinden serum direnci, aerobaktin demir elde etme sistemleri, mannoz duyarlı hemaglutinasyon (tip 1 fimbrialar) ve mannoz dirençli hemaglutinasyon (P fimbrialar, S fimbrialar ve afimbrial adezinler) özellikleri, alfa-hemoliz ve sitotoksik nekrotizan faktör 1 gibi virülens özelliklerinin fenotipik yöntemlerle araştırılması ve bu özellikleri kodlayan genlerin moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Örneklerin Toplanması

E. coli izolasyonu için materyaller 2004-2007 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na nekropsi için getirilen kanatlı hayvanlardan ve Et ve Balık Kurumu Kanatlı Kesimhanesi (Sincan)'ne kesime getirilen broiler piliçlerden sağlandı (Çizelge 2.1). Bu hayvanlardan alınan kalp, akciğer, karaciğer, dalak ve sarı keseleri *E.coli* izolasyonu amacıyla kullanıldı.

Çizelge 2.1. İncelenen meteryallere ait bilgiler

Materyal	Kanatlı Türü/Yetiştirme Tipi	Kümes Sayısı	Materyal alınan Hayvan Sayısı
Nekropsi	Broiler	45	140
	Yumurtacı	1	3
	Hindi	2	5
	Deve Kuşu	1	1
	Ördek	1	2
	Güvercin	1	3
	Kanarya	1	2
Kesimhane	Broiler	8	70

2.2. Besiyerleri

E. coli izolasyonu için Kanlı Agar (%5 koyun kanlı) ile birlikte MacConkey Agar (Difco, A.B.D.) ve Eosin Methylen Blue Agar (Difco, A.B.D.), izole edilen suşların pasajı için Nutrient agar (Oxoid, İngiltere) ve Nutrient buyyon (Oxoid, İngiltere) kullanıldı.

Suşların toksik aktivitesinin belirlenmesinde suşların üretimi için Trypticase Soy Buyyon (TSB, Oxoid, İngiltere) ve Trypticase Soy Agar (TSA, Oxoid, İngiltere)'dan yararlanıldı.

İzole edile suşların hemolitik özelliklerinin ortaya konulması için Kanlı Agar (Oxoid, İngiltere) kullanıldı.

Suşların hemaglutinasyon aktivitelerini belirlemek amacıyla Brain-Heart İnfuzyon Buyyon (Oxoid, İngiltere) ve aşağıda bileşimi verilen Kolonizasyon Faktör Antijen Agar (CFA) kullanıldı.

Casamino acide (Merck, Almanya)	10 g
Yeast extract (Merck, Almanya)	1,5 g
Magnezyum Sülfat (MgSO ₄) (Merck, Almanya)	0,05 g
Mangan Klorür (MnCl ₂) (Merck, Almanya)	0,005 g

Agar Agar (Merck, Almanya) %2 ve 1 litre distile su ile hazırlanarak kullanıldı.

Demir sidereforlarının varlığını belirlemek amacıyla demir kısıtlayıcı besiyeri olarak aşağıda bileşimi verilen M9 buyyon kullanıldı.

Potasyum Hidrojen Fosfat (KH ₂ PO ₄) (Merck, Almanya)	3g
Di-Sodyum Hidrojen Fosfat (Na ₂ HPO ₄) (Merck, Almanya)	6g
Sodyum Klorür (NaCl ₂) (Merck, Almanya)	0.5g
Amonyum Klorür (NH ₄ Cl) (Merck, Almanya)	1g
Distile su	1 Litre

Hazırlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve su banyosunda 50°C ye kadar soğutulduktan sonra,

Magnezyum Sülfat (MgSO ₄ ; 1 M) (Merck, Almanya)	1ml
---	-----

Kalsiyum Klorür (CaCl ₂ ; 0.01 M) (Merck, Almanya)	10ml
Glikoz (Merck, Almanya)	2 g
Casamino acide (Merck, Almanya)	5 g
L-triptofan (Merck, Almanya)	20 mg/ml
Tiamin (Merck, Almanya)	5 mg/ml
2,2'-dipyridil (Merck, Almanya)	200 µM

eklenerek hazırlandı,

Demir sidereforlarının varlığını belirlemek amacıyla demir kısıtlayıcı besiyeri olarak M9 Agar ise aynı şekilde hazırlanan M9 medyuma %2 Agar agar (Merck, Almanya) katılarak hazırlandı ve kullanıldı.

DNA ekstraksiyonu yapmak amacıyla ise suşlar Luria Bertani (LB) buyyonu (Difco, A.B.D.) kullanılarak üretildi.

İzole ve identifiye edilen *E. coli* suşlarının saklanması için %20 oranında gliserin (Merck, Almanya) içeren Trypticase Soy Buyyon (TSB, Oxoid, İngiltere) kullanıldı.

PCR için aşağıda sıralanan kimyasal maddeler kullanıldı.

Etanol (%95'lik) (Merck, Almanya)

Tris Borat Edta (TBE) (AppliChem, Almanya)

Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya)

10X Buffer (Fermentas, Litvanya)

25 mM MgCl₂ (Fermentas, Litvanya)

Primerler (Fermentas, Litvanya)

25 mM dNTP set (Fermentas, Litvanya)

DNA marker (100 bp) (Fermentas, Litvanya)

Agarose (prona agarose, basıca le) (Fermentas, Litvanya)

Etidyum bromür (Fermentas, Litvanya)

Ticari kit (K0512, Fermentas, Litvanya)

6Xloadingdye (Fermentas, Litvanya)

2.3. Kullanılan Cihaz ve Gereç Listesi

DNA Thermal Cyclers (Biyometra, Almanya)

Elektroforez tankı ve güç kaynağı (Wealtec elite 3000 plus, A.B.D.)

UV transillüminatörlü bilgisayarlı jel dokümantasyon sistemi (Gene, Genius, Bio Imaging System, İngiltere)

Steril laminar akımlı güvenlik kabini (Bioair Instruments, Aura 2000, MAC, İtalya)

Termal printer (Sony, Japonya)

Santrifüj (Hettich, Almanya)

Vortex (Fine Vorex, Kore)

Hassas terazi (Scaltec sbc41, Almanya)

Etüv (EN120, Nüve, Türkiye)

pH meter model 420A (Orion, A.B.D.)

Otoklav (OT4060, Nüve, Türkiye)

2.4. Standart Suşlar

Virülens özelliklerinin fenotipik ve moleküler olarak saptanması çalışmalarında pozitif kontrol olarak Prof. Dr. JACQUES MAINIL (Chaire de Bactériologie et de Pathologie des Maladies Bactériennes, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B-1070 Brussels, Belgium)'den sağlanan *E. coli* pIPAC (sfa), 140 KH 89 (alfa-hemolizin), 10902 (cnf ve sfa), 26968.2 (pap), 239 KH 89 (cnf), pABN1(aerobaktin) ve 83 KH 90 (afa) suşları ve negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

2.5. Hücre Kültürleri

İzole edilen *E. coli* suşlarının toksijenik özelliklerinin belirlenmesinde Vero (Yeşil Maymun Böbrek Hücresi) hücre kültürü kullanıldı. Vero hücreleri, doku kültürü şişesinde %10 fetal dana serumu, penisilin ve streptomisin ilaveli Eagle's Minimum Essential Medium içerisinde üretildi. Sitotoksikite testi için, 96 gözlü mikrotiter plate gözlerine, tripsinizasyondan sonra 4×10^4 hücre/ml⁻¹ medium olacak şekilde 150 µl hücre süspansiyonu konuldu (Blanco ve ark., 1990).

2.6. İzolasyon ve İdentifikasyon

Kanatlı hayvanlardan alınan nekropsi materyali ve mezbahadan alınan iç organlardan Kanlı Agar, MacConkey Agar ve EMB Agara direkt olarak ekimler yapıldı ve 37°C'de 18-24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyondan sonra üreyen kolonilerin makroskopik ve mikroskopik morfolojileri incelendi ve biyokimyasal özelliklerine göre identifikasyonları yapıldı (Quinn ve ark., 1994; Winn ve ark., 2006). *E. coli* olarak idendifiye edilen kültürler, virülens özelliklerini incelemek amacıyla %20 gliserin içeren TSB'ye yoğun olarak aktarıldı ve -20°C'de saklandı.

2.7. Virülens Faktörlerinin Araştırılması

2.7.1. Hemoliz Testi

İzole edilen suşların hemolizin aktivitesinin fenotipik olarak saptanması için etkenlerin buyyon kültürlerinden bir damla alınarak kanlı agar üzerine damlatıldı ve 37°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra göz ile değerlendirildi. Hemoliz görülmeyen petripler +4°C'de 24 saat bekletildikten sonra tekrar değerlendirmeye alındı (İzgür, 1981; Vidotto ve ark., 1990).

2.7.2. Aerobaktin (Sideroforlar) Araştırılması

İzole edilen suşların siderefor sistemlerinin varlığını araştırmak amacıyla TSA'da aktive edilen suşlar bir demir bağlayıcı olan 2,2'-dipyridil (200µM) içeren M9 buyyona aktararak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında buyyon kültüründen 1 ml alınarak ikinci kez aynı besiyerinde pasajlandı ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İkinci pasajdan sonra buyyon kültürlerinden bir öze dolusu alınarak 200 µM final konsantrasyonda 2,2'-dipyridil içeren M9 agara ekimleri yapıldı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Çalışmalar sırasında araştırılan saha izolatlarının yanı sıra aynı şekilde pozitif ve negatif kontrol suşları da kullanıldı. İnkübasyon sonrasında M9 agarda üreme olup olmamasına göre değerlendirmeler yapıldı (Stuart ve ark., 1980).

2.7.3. Toksin (Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1) Analizleri

Virülens özellikleri ve konakçı orijinleri dikkate alınarak belirlenen 20 adet suş seçildi ve sonik ekstraktlarının hazırlanması amacıyla TSA da aktive edildikten sonra 20 ml TSB'ye geçildi. TSB'ler çalkalayıcılı su banyosunda (200 rpm) 37°C'de 20 saat inkübe edildi. Kültürden 10 ml alınarak +4°C'de 10.000 rpm de 30 dk santrifüj edildi ve çöküntü 10 ml PBS (pH: 7,2) ile süspanse edildi. Suşlar +4°C'de sonik ekstraksiyona tabi tutuldu. Sonik ekstraktlar 0,22 µm'lik membran filtreden

(Sartorius, Almanya) geçirildikten sonra 100°C'de 5 dakika ısı işlemine tabi tutuldu ve -20°C'de saklandı (Blanco ve ark., 1990).

Mikroplatelerin gözlerinde üretilmiş olan Vero hücrelerinin üzerine her bir suşun sonik ekstraktından 50 µl ilave edildi ve 37°C'de 72 saat %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Vero hücre kültürleri 24, 48 ve 72. saatlerde kontrol edilerek sitotoksik nekrotizan faktör 1 için spesifik olan multinükleasyon, yuvarlaklaşma gibi değişiklikler incelendi. İnkübasyon sonunda hücreler metanol ile tespit edildikten sonra natif olarak ve Giemsa ile boyanarak değerlendirildi (Blanco ve ark., 1990).

2.7.4. Hemaglutinasyon Testi

İnsan O grubu ve tavşan, kobay, koyun ve tavuktan anti koagulanlı olarak alınan kanlar 900 devirde (rpm), 15'er dakika 3 kez PBS (pH:7.4) ile santrifüj edilerek yıkanmış eritrositler elde edildi. Eritrositler buzdolabında + 4°C'de saklandı ve sulandırılmış eritrositler günlük olarak hazırlandı. PBS içinde mannozsuz ve %3 mannozlu olarak %5'lik eritrosit süspansiyonları hazırlandı.

Hemaglutinasyon testi için suşlar TSA'da aktive edildikten sonra Brain-Heart İnfüzyon buyyonda 5 gün süreyle 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyerinde pellükül oluşumu gözlenmesi üzerine buyyon kültüründen bir damla alınarak CFA'a ekimler yapıldı. CFA'da 37°C'de 24 saat inkübasyonu takiben üreyen birkaç koloni öze ile alınarak %3 D-mannozlu (Merck, Almanya) ve mannozsuz eritrositler ile ayrı olarak lam üzerinde hemaglutinasyona tabi tutuldu. Oda ısısında 2 dakika inkübasyondan sonra değerlendirmeler göz ile yapıldı. Reaksiyon vermeyenler ise 10 dakika buz üzerinde tutulduktan sonra tekrar değerlendirildi. Hemaglutinasyon gösterenler pozitif, göstermeyenler negatif olarak değerlendirildi. Mannoazlu ve mannozsuz eritrositlerle hemaglutinasyon yapan suşlar MRHA olarak kabul edildi. Mannozsuz eritrositler ile hemaglutinasyon oluşturup mannoazlu eritrositlerle oluşturmayan suşlar ise MSHA olarak ve her iki ortamda da hemaglutinasyon vermeyen suşlar ise HA negatif *E. coli* suşları olarak

değerlendirildi. Test tüm eritrositler ile aynı şekilde tekrarlandı. Kullanılan eritrositlerden en az biri ile MRHA gösterenler MRHA pozitif suşlar olarak kabul edildi (Vidotto ve ark., 1990).

2.7.5. Serum Dirençliliği

E. coli izolatlarının serum dirençliliklerinin belirlenmesi amacıyla Trypticase Soy Agar (TSA)'da üretilen bakteriler PBS içerisinde McFarland tüp 3'e göre süspansiyon edildi. Bu süspansiyonlar TSA hazırlanması sırasında besiyeri soğutulurken 50°C'de iken 5 ml besiyerine 0,25 ml miktarında katılarak katı besiyeri hazırlandı. Hazırlanan bu agar içine açılan küçük yuvacıklara tavuk, insan, sığır ve tavşan serumları 40 µl miktarında eklenerek 4°C'de 4 saat bekletildikten sonra 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında serum ilave edilen kuyucukların etrafında üreme olması, bu suşların serum dirençli olduğunu gösterdi (Sanchez ve ark., 1984).

2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR işlemi için TSA'da aktive edilen suşlar LB buyyonda (Difco, A.B.D.) 37°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra buyyon kültüründen 1 ml alınarak DNaz-RNaz ari eppendorf tüplerine aktarıldı. Tüpler +4°C'de, 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak oluşan bakteri pelleti 1 ml steril distile suda süspansiyon edildi. Bakteri süspansiyonu DNA ekstraksiyonu amacıyla kullanıldı. PCR işlemi, DNA ekstraksiyonu, amplifikasyon, elektroforez ve görüntüleme olmak üzere dört aşamada gerçekleştirildi (Sambrook ve Russell, 2002). Bu çalışmada, *E.coli* virülensinde önemli rol oynayan alfa-hemoliz, demir sidereforlarının varlığı, sitotoksik nekrotizan faktör 1, tip 1 fimbria, P fimbria, S fimbria, afimbrial adhezinler ve serum direncini kodlayan gen bölgeleri araştırıldı.

2.8.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA izolasyonu için Fermentas Genomik DNA Purifikasyon ticari kiti kullanıldı.

Ekstraksiyon işlemi üretici firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirildi.

- 200 µl bakteri süspansiyonu 400 µl lizis solüsyonu ile karıştırıldı ve 65°C'de 5 dakika inkube edildi.
- 600 µl kloroform ilave edilerek karıştırıldı ve 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Presipitasyon solüsyonu, 720 µl steril distile su ile 80 µl 10x konsantre solüsyonu ile karıştırılarak hazırlandı.
- Santrifüjden sonra üst sıvı yeni bir tüpe aktarılarak 800 µl presipitasyon solüsyonu ilave edildi ve 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, pelete 100 µl 1,2 M NaCl ilave edilerek vortekslendi.
- 300 µl soğuk etanol ilave edilerek 10 dakika -20 °C'de DNA'nın presipitasyonu sağlandı ve 10.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Üstteki etanol dökülerek pelet %70'lik soğuk etanol ile yıkandı ve DNA 100 µl steril distile suda çözdürülerek iyice karıştırıldı.

2.8.2. PCR Karışımının Hazırlanması

Bu çalışmada, alfa-hemoliz (*hlyA*), demir sidereforlarının varlığı (*iucD*), sitotoksik nekrotizan faktör 1 (*cnf 1*), tip 1 fimbria (*fimH*), P fimbria (*papEF* ve *papC*), S fimbria (*sfa*), afimbrial adhezinler (*afa*) ve serum direnci (*traT*) gibi virülens özelliklerini kodlayan spesifik genlerin varlığını belirlemek amacıyla dokuz (9) çift primer seti ticari olarak sentezlettiler ve kullanıldı. Kullanılan primerlerin baz dizileri, bağlandıkları spesifik gen bölgeleri, PCR ürünlerinin uzunlukları Çizelge 2.2'de gösterildi.

Çizelge 2.2. Primerlerlerin baz dizileri, bağlandıkları spesifik gen bölgeleri ve PCR ürünlerinin uzunlukları.

Primer	Sekans	Pozisyon	Ürün Uzunluğu	Kaynak Makale
Pap1	5'- GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG -3'	papC	328 bp	Yamamoto ve ark., 1995
Pap2	5'- ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA -3'			
Pap3	5'- GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT -3'	papE-F	336 bp	Yamamoto ve ark., 1995
Pap4	5'- AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA -3'			
Sfa1	5'- CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC -3'	sfaD-E	410 bp	Yamamoto ve ark., 1995
Sfa2	5'- CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA -3'			
Afa1	5'- GCTGGCAGCAAACCTGATAACTCTC -3'	afaB-C	750 bp	Yamamoto ve ark., 1995
Afa2	5'- CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG -3'			
Hly1	5'- AACAAAGGATAAGCACTGTCTGGCT -3'	hlyA	1177 bp	Yamamoto ve ark., 1995
Hly2	5'- ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA -3'			
Aer1	5'- TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT -3'	lucD	602 bp	Yamamoto ve ark., 1995
Aer2	5'- AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG -3'			
Cnf1	5'- AAGATGGAGTTTCTTATGCAGGAG -3'	CNF1	498 bp	Yamamoto ve ark., 1995
Cnf2	5'- CATTAGAGTCCTGCCCTCATTATT -3'			
FimH1	5'- TGCAGAACGGATAAGCCGTGG -3'	FimH	508 bp	Johnson ve Stell, 2000.
FimH2	5'- GCAGTCACCTGCCCTCCGTGG -3'			
TraT1	5'- GATGGCTGAACCGTGGTTATG -3'	TraT	307 bp	Kaipainen ve ark.,2002
TraT2	5'- CACACGGGTCTGGTATTTATGC -3'			

PCR Karışımı, her bir örnek için;

10 x PCR tamponu, 2,5 µl

MgCl₂, 2mM

dNTP (10 mM), 200 µM

Primer I, 20pmol

Primer II, 20pmol

Taq DNA Polimeraz, 1U olacak şekilde distile su ile 23 µl'lik hacme tamamlanarak hazırlandı.

Bu ana karışımdan 23'er µl dağıtıldı ve her tüpe 2 µl örnek DNA'sı eklenerek toplam reaksiyon hacmi 25 µl'ye tamamlandı. Tüm PCR karışımları aynı oranda hazırlandı. Bu karışıma göre hazırlanan örnekler çoğaltma için önceden programlanmış thermal cycler cihazına yerleştirildi. Örneklerin hazırlanması sırasındaki hata ve kontaminasyonları belirlemek için pozitif ve negatif kontrol kullanıldı.

2.8.3. DNA Amplifikasyonu

Amplifikasyon işlemi demir sidereforlarının varlığı (aer 1, 2), piyolonefritis ilişkili fimbrialar (pap1, 2, 3, 4), S fimbria (sfa 1, 2), afimbrial adhezinler (afa 1, 2), alfa-hemoliz (hly 1, 2) ve sitotoksik nekrotizan faktör 1 (cnf 1, 2) için Yamamoto ve ark. (1995)'nın bildirdiği protokol modifiye edilerek ve tip1 fimbria (fimH 1, 2) için Johnson ve Stell (2000)'in belirttiği protokole göre gerçekleştirildi. Bu protokol aşağıda sunulmuştur.

94 °C'de 3 dakika ön denatürasyon

94 °C'de 60 saniye denatürasyon

63 °C'de 60 saniye primer bağlanması

72 °C'de 120 saniye yeni DNA zincirinin sentezlenmesi

olmak üzere toplam 30 döngü yapıldı. En son aşamada 72 °C'de 7 dakika bekletilerek reaksiyon tamamlandı.

Serum direncinin (traT 1, 2) belirlenmesi amacıyla ise Kaipainen ve ark. (2002)'nin belirttiği protokol modifiye edilerek uygulandı.

94 °C'de 3 dakika bekletilerek ön denatürasyon

94 °C'de 60 saniye denatürasyon

60 °C'de 60 saniye primer bağlanması

72 °C'de 120 saniye yeni DNA zincirinin sentezlenmesi,

olmak üzere toplam 30 döngü yapıldı. En son aşamada 72 °C'de 7 dakika bekletilerek reaksiyon tamamlandı.

Amplifikasyon sonrasında reaksiyon tüpleri değerlendirme aşamasına kadar +4 °C'de bekletildi.

2.8.4. Agaroz Jel Elektroforez

2.8.4.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

Amplifikasyon sonrasında oluşan ürünlerin değerlendirilmesi için %1,5'luk agaroz jel hazırlandı. Agaroz jel hazırlanırken tampon solüsyon olarak 1x TBE tamponu kullanıldı. Agaroz 200 ml TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritildikten sonra, 10 µl ethidium bromid ilave edilerek, 20 cm'lik yatay jel elektroforez tablasına döküldü. Beş mm kalınlığında dökülen agaroz üzerine elektroforez tarağı takılarak, jelin katılaşması için 30 dakika beklenildi. Bu süre sonunda taraklar jele zarar vermeden çıkartıldı (Sambrook ve Russell, 2002).

2.8.4.2. Elektroforez İşlemi

Jel elektroforez tablası elektroforez tankına yerleştirildikten sonra, elektroforez tankının içerisine TBE tampon solüsyonu jelin 1 mm üstüne gelecek kadar ilave edildi. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinden 10 µl alınarak, 2 µl 6X loading dye ile karıştırıldı. Bu karışımın hepsi jele yüklendi. DNA örnekleri 160 voltta 70 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu (Sambrook ve Russell, 2002).

2.8.5. Görüntüleme İşlemi

Jeldeki örnekler bilgisayarlı UV transillüminatör kutusu içine yerleştirilerek görüntülendi ve fotoğrafları çekilerek termal printerden kopyaları alındı (Sambrook ve Russell, 2002).

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Çalışmada virülens özellikleri araştırılmak üzere 188'i broiler, 1'i yumurtacı, 5'i hindi, 2'si güvercin, 1'i deve kuşu, 2'si kanarya ve 1'i ördekten izole edilen toplam 200 adet *E. coli* suşu kullanılmıştır. Aynı hayvanın farklı iç organlarından izole edilen *E.coli* suşlarından sadece bir suş çalışmaya dahil edildi ve virülens özellikleri incelendi. Suşların hayvan türlerine göre dağılımı Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. İncelenen *E.coli* suşlarının orijinleri.

Materyal	Kanatlı Türü/Yetiştirme Tipi	Kümes Sayısı	Materyal alınan Hayvan Sayısı	İzolat Sayısı
Nekropsi	Broiler	45	140	122
	Yumurtacı	1	3	1
	Hindi	2	5	5
	Deve Kuşu	1	1	1
	Ördek	1	2	1
	Güvercin	1	3	2
	Kanarya	1	2	2
Kesimhane	Broiler	8	70	66

3.2. Virülens Faktörlerine Ait Bulgular

3.2.1. Hemoliz Bulguları

E. coli suşlarının çift katlı kanlı agar da incelenmesi sonucunda, incelenen suşların hiçbirinde hemolitik aktivite saptanamadı. Sonuçlar Çizelge 3.2'de gösterildi.

Çizelge 3.2. İncelenen *E.coli* suşlarında virülens özelliklerinin fenotipik bulguları.

Suş sayısı	Virülens Özellikleri					
	Hemoliz	Aerobaktin	CNF-1	Hemaglutinasyon		Serum Direnci
				MSHA	MRHA	
Broiler (n=122)	0	122	0	90	32	122
Yumurtacı (n=1)	0	1	0	0	1	1
Hindi (n=5)	0	5	0	0	5	5
Deve Kuşu (n=1)	0	1	0	0	1	1
Ördek (n=1)	0	1	0	0	1	1
Güvercin (n=2)	0	2	0	0	2	2
Kanarya (n=2)	0	2	0	0	2	2
Broiler (Kesimhane) (n=66)	0	66	0	38	8	66
Toplam (%) (n=200)	0	200 (%100)	0	128 (%64)	52 (%26)	200 (%100)

n; Suş Sayısı.

3.2.2. Aerobaktin Bulguları

Çalışmada incelenen suşların tamamı (%100), demiri bağlayan 2,2'-dipyridil içeren besiyerinde üredi. Bu sonuç, tüm suşların demiri bağlı formdan elde etmede rol oynayan siderofor ürettiğini indirekt olarak ortaya koydu (Çizelge 3.2). Bu besiyerinde negatif kontrol için kullanılan *E.coli* suşu üremedi.

3.2.3. Toksin Bulguları

Virülens özellikleri ve konakçı orijinlerine göre seçilen *E. coli* suşlarının Vero hücre kültürleri kullanılarak Sitotoksik Nekrotizan Faktör (CNF 1) belirlemek amacıyla yapılan incelemede, Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1(CNF 1)'in spesifik sito patojenik etkileri olan multi nükleasyon ve yuvarlaklaşma saptanamadı (Çizelge 3.2).

3.2.4. Hemaglutinasyon Bulguları

İnsan O grubu, tavşan, kobay, koyun ve tavuktan elde edilen eritrositlerle yapılan test sonucunda 180 (%90) suşta hemaglutinasyon aktivitesi saptandı. İnsan O grubu eritrositleri ile suşların 166 (%83)'sı MSHA ve 14 (%7)'ü MRHA, tavşan eritrositleri ile 144 (%72)'ü MSHA ve 36 (%18)'sı MRHA, kobay eritrositleri ile 164 (%82)'ü MSHA ve 16 (%8)'sı MRHA, koyun eritrositleri ile 162 (%81)'si MSHA ve 18 (%9)'i MRHA ve tavuk eritrositleri ile 160 (%80)'i MSHA ve 20 (%10)'si MRHA olarak belirlendi (Çizelge 3.3). Kullanılan eritrositlerden en az biri ile MRHA gösterenler MRHA pozitif suşlar olarak kabul edilmiş ve suşların 52 (%26)'si MRHA, 128 (%64)'ü ise MSHA olarak saptandı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.3. Farklı eritrositlere göre HA bulguları.

Eritrosit Türü	MSHA suş sayısı (%) n=200	MRHA suş sayısı (%) n=200
İnsan O grubu	166 (%83)	14 (%7)
Tavşan	144 (%72)	36 (%18)
Kobay	164 (%82)	16 (%8)
Koyun	162 (%81)	18 (%9)
Tavuk	160 (%80)	20 (%10)

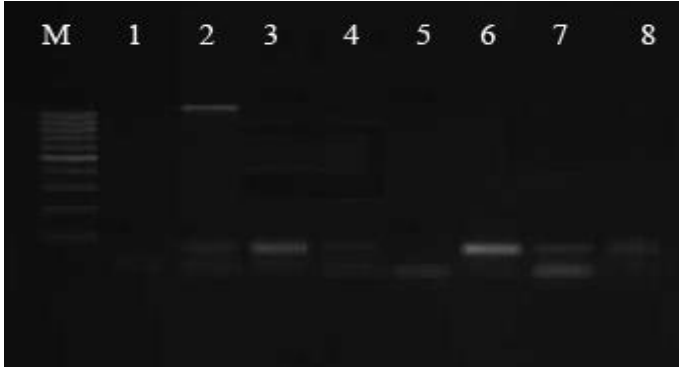
3.2.5. Serum Dirençliliği Bulguları

Tavuk, insan, sığır ve tavşan serumları kullanılarak yapılan testle suşların tamamının seruma karşı dirençli olduğu belirlendi. Sonuçlar Çizelge 3.2'de gösterildi.

3.3. PCR Bulguları

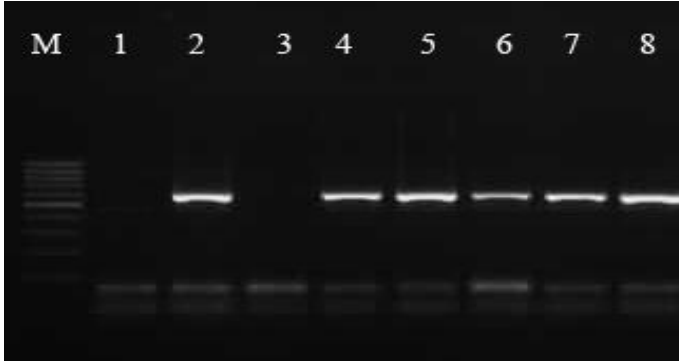
Çalışma kapsamında fenotipik olarak farklı virülens özellikleri incelenen *E.coli* suşların aynı özellikleri PCR ile incelendi. Hemoliz özelliğini kodlayan *hly* geninin varlığını belirlemek amacıyla yapılan PCR işlemi sonucunda da tüm suşlar bu gen

bakımından negatif bulundu. Hemoliz pozitif kontrol suşunda *hly* geninin varlığı PCR ile belirlendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. İzole edilen *E. coli* suşlarında *hly* (*hlyA*, 1177 bp) PCR bulguları. (M; Marker, 100 bp, 1; Negatif Kontrol, 2; Pozitif Kontrol, 3-8; *E. coli* izolatları)

Aerobaktin özelliğini kodlayan *iucD* geninin belirlenmesi amacıyla yapılan PCR işlemi sonucunda suşların 176 (%88)'sında *iucD* geni saptandı (Şekil 3.2).



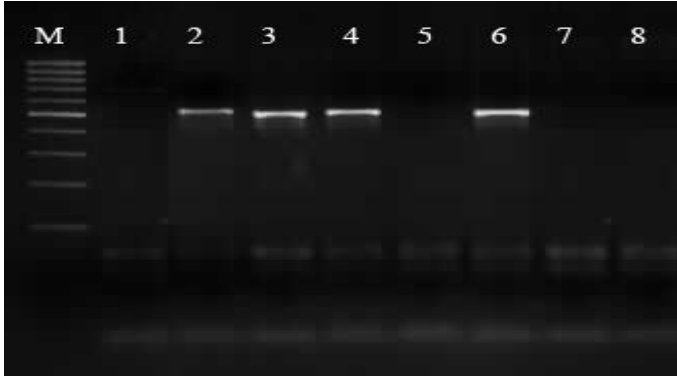
Şekil 3.2. İzole edilen *E. coli* suşlarının Aerobaktin (*IucD*, 602 bp) PCR bulguları. M; Marker, 100 bp, 1; Negatif Kontrol, 2; Pozitif Kontrol, 3-8; *E. coli* suşları.

Sitotoksik nekrotizan faktör 1 (*CNF 1*) kodlayan genlerin varlığını belirlemek amacıyla yapılan PCR işlemi sonrasında, pozitif kontrol suşunda genin varlığı belirlenirken (Şekil 3.3), suşların tamamı bu gen açısından negatif bulundu.

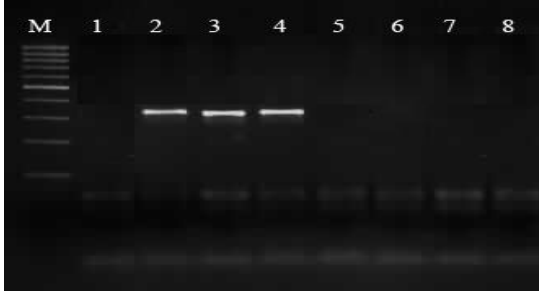


Şekil 3.3. İzole edilen *E. coli* suşlarının Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1 (cnf 1, 498 bp) PCR bulguları. M; Marker, 100 bp, 1; Negatif Kontrol, 2; Pozitif Kontrol, 3-8; *E. coli* suşları.

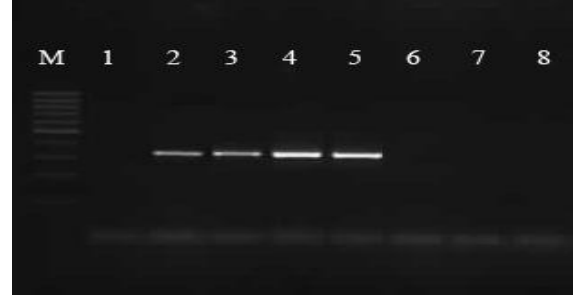
Fimbriaları kodlayan genlerin varlığını belirlemek amacıyla yapılan PCR işlemi sonucunda tip 1 fimbriaların adhezyon proteini olan fimH'yi kodlayan *fimH* geni suşların 176 (%88)'sında belirlendi (Şekil 3.4). MRHA özelliğindeki P fimbriaları kodlayan genlerden *papEF* 52 (%26) adet ve *papC* 28 (%14) adet suшта belirlenirken (Şekil 3.5, Şekil 3.6), afimbrial adezinleri kodlayan *afa* geni ve S fimbriaları kodlayan *sfa* geni belirlenemedi (Şekil 3.7, Şekil 3.8). Suşların 48 (%24)'inde *fimH* ve *papEF* geni birlikte saptanırken, 128 (%64) suшта sadece *fimH* geni ve 4 (%2) suшта *papEF* geni saptandı.



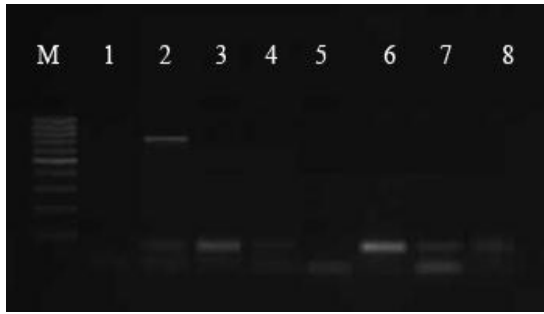
Şekil 3.4. İzole edilen *E. coli* suşlarının Tip 1 fimbria (fimH, 508 bp) PCR bulguları. M; Marker, 100 bp, 1; Negatif Kontrol, 2; Pozitif Kontrol, 3-8; *E. coli* suşları.



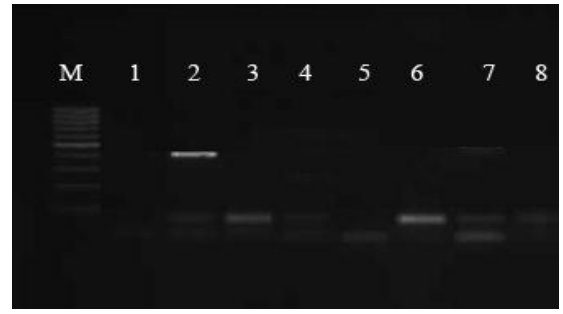
Şekil 3.5. İzole edilen *E. coli* suşlarının P fimbria (PapEF, 336 bp) PCR bulguları. M; Marker, 100 bp, 1;Negatif Kontrol, 2; Pozitif Kontrol, 3-8; *E. coli* suşları.



Şekil 3.6. İzole edilen *E. coli* suşlarının P fimbria (PapC, 328 bp) PCR bulguları. M; Marker, 100 bp, 1;Negatif Kontrol, 2; Pozitif Kontrol, 3-8; *E. coli* suşları.

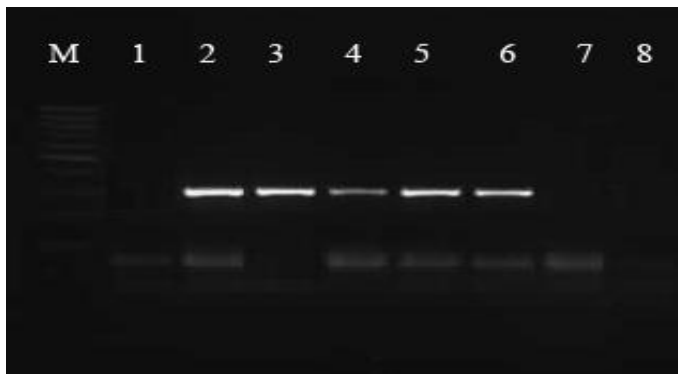


Şekil 3.7. İzole edilen *E. coli* suşlarının Afimbrial adезin (Afa,750 bp) PCR bulguları. M; Marker, 100 bp, 1;Negatif Kontrol, 2; Pozitif Kontrol, 3-8; *E. coli* suşları.



Şekil 3.8. İzole edilen *E. coli* suşlarının S fimbria (Sfa, 410bp) PCR bulguları. M; Marker, 100 bp, 1;Negatif Kontrol, 2; Pozitif Kontrol, 3-8; *E. coli* suşları.

Serum direncinin varlığının belirlenmesi amacıyla yapılan PCR işlemi sonucunda suşların 180 (%90) adedinde *traT* geninin (Şekil 3.9) varlığı belirlendi.



Şekil 3.9. İzole edilen *E. coli* suşlarının serum direnci (TraT, 307 bp) PCR bulguları. M; Marker, 100 bp, 1;Negatif Kontrol, 2; Pozitif Kontrol, 3-8; *E. coli* suşları.

3.4. Fenotipik ve PCR Bulguların Karşılaştırması

Tez kapsamında incelenen virülens özelliklerinin fenotipik ve moleküler yöntemlerle belirlenen bulguları karşılaştırmalı olarak, Çizelge 3.4'te, araştırılan genlere ait spesifik bantlar ise Şekil 3.10'da gösterilmiştir. İncelenen 200 adet *E.coli* suşunda, fenotipik ve moleküler testlerle yapılan incelemede suşların tamamı hemoliz yönünden negatif bulundu.

Çalışılan suşların tamamının demir bağlayıcı içeren besiyerinde üremesine rağmen aerobaktin özelliğini kodlayan *iucD* geninin belirlenmesi amacıyla yapılan PCR işlemi sonucunda suşların 176 (%88)'sının bu gen yönünden pozitif olduğu belirlendi. Fenotipik olarak suşların tamamında aerobaktin özelliğinin saptanması, bu özelliğin sadece *iucD* geni tarafından kodlanmadığını gösterdi. Bu farklılık, bu çalışmada *fyu* ve *irp* gen bölgelerinin araştırılmaması ile açıklandı. Suşların tamamı CNF 1 yönünden fenotipik ve moleküler yöntemlerle negatif olarak bulundu.

Hemaglutinasyon yeteneklerinden yararlanılarak fimbriaların belirlenmesi için insan ve çeşitli hayvan eritrositleri kullanılarak suşların 180 (%90)'inin fimbrialara sahip oldukları ve bunların 52 (%26)'sinin mannoz resistans hemaglutinasyon oluşturduğu fenotipik olarak belirlendi. Moleküler olarak bu suşlarda fimbriaları kodlayan genlerin varlığını belirlemek amacıyla yapılan PCR işlemi sonucunda tip 1 fimbriaların adhezyon proteini olan *fimH*'yi kodlayan *fimH* geni suşların 176 (%88)'sında belirlendi. Fenotipik yöntemle pozitif olarak saptanan 180 suşun 128 (%71.1)'inde *fimH* geni, 4 (%2.2)'ünde *papEF* geni ve suşların 48 (%26,7)'inde *fimH* ve *papEF* genleri birlikte saptandı. Fenotipik olarak MRHA pozitif 52 suşun tamamında *papEF* geni belirlenirken 28 (%53.8) suşta *papC* geni belirlendi. Bu bulgular, fenotipik ve moleküler test sonuçlarının uyumlu olduğunu gösterdi. Ayrıca MRHA özelliğini belirlemede *papEF* geninin *papC* genine göre daha etkin olduğu saptandı.

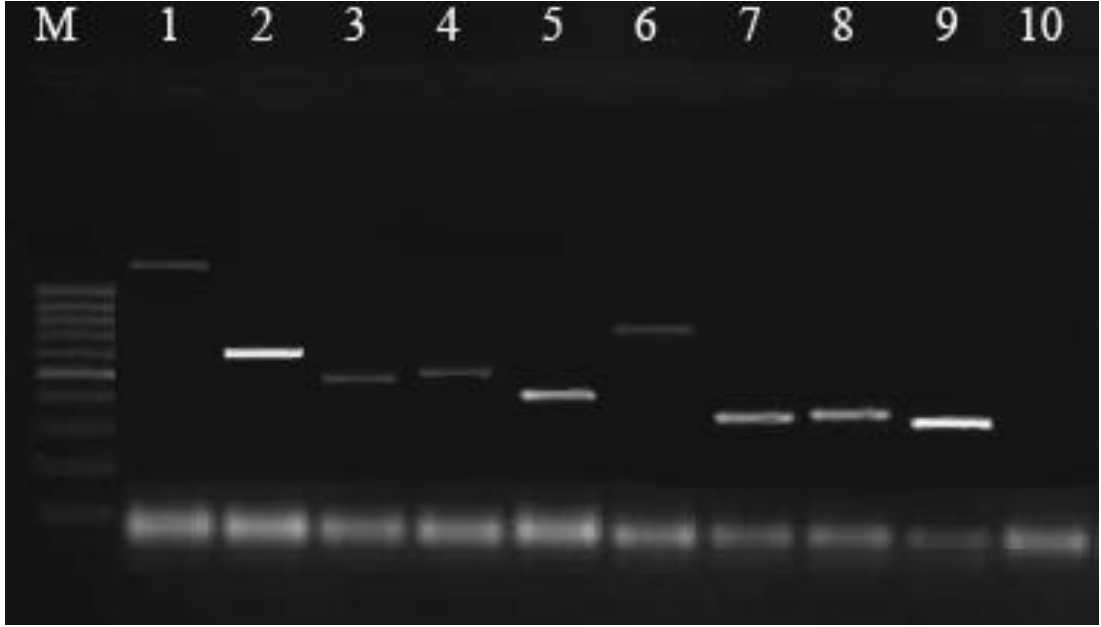
Çalışılan suşların tümünün (%100) fenotipik testlerle seruma karşı dirençli olduğu belirlenirken, yapılan PCR işlemi sonucunda suşların 180 (%90)'inde *traT*

geninin varlığı belirlendi. Bu farklılık, serum dirençliliğinin sadece *traT* geni ile kodlanmadığını ve birden fazla bu özelliği kodlayan gen bölgelerinin (*iss* ve *cvaC*) olduğunu gösterdi.

Genel olarak suşların virülens özellikleri değerlendirildiğinde hem fenotipik hem de moleküler yöntemlerle bazı özelliklerin ön plana çıktığı görülmektedir. Bir suшта virülens özelliklerinin birlikte değerlendirilmesiyle, patogeneizde rol oynayan mekanizmalar hakkında bilgi edinmek mümkün olabilmektedir. Bu çalışmada elde edilen virülens özelliklerin birlikte değerlendirilmesi sonucunda belirli kombinasyonlar ortaya çıkmaktadır. Fenotipik olarak serum direnci/demir elde etme özelliği/hemaglutinasyon özelliği birlikte değerlendirildiğinde, suşların %90'ı bu üç virülens özelliği yönünden pozitif bulunmuştur. Benzer bir değerlendirme ise, moleküler olarak *traT/iucD/fimH* pozitifliği ile yapıldığında, incelenen suşların %88'i bu özellikler yönünden pozitif bulundu.

Çizelge 3.4. Virülens özelliklerine ait karşılaştırmalı fenotipik ve moleküler bulgular.

Virülens Özelliği	Fenotipik	Moleküler
Hemoliz	-	-
Aerobaktin	200 (%100)	176 (%88)
Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1	-	-
Tip 1 fimbrialar ve P fimbrialar	180 (%90)	180 (%90)
Serum Direnci	200 (%100)	180 (%90)



Şekil 3.10. Virülens genlerine ait spesifik bantlar. M; Marker, 100 bp, 1; Hemoliz (hlyA, 1177 bp), 2; Aerobaktin (IucD, 602 bp), 3; Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1 (cnf 1, 498 bp), 4; Tip 1 fimbria (fimH, 508 bp), 5; S fimbria (Sfa, 410bp) 6; Afimbrial adezin (Afa,750 bp) 7; P fimbria (PapC, 328 bp), 8;P fimbria (PapEF, 336 bp), 9; Serum direnci (TraT, 307 bp), 10; Negatif Kontrol.

4. TARTIŞMA

Kanatlılarda *E. coli* infeksiyonları farklı klinik tablolar meydana getirmekte ve buna bağlı olarak önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Etkenlerin virülens özelliklerinin belirlenmesi infeksiyonlara karşı etkili kontrol çalışmaları ve dolayısıyla ekonomik kayıpları azaltmak için önemlidir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, kanatlı hayvanlardan izole edilen 200 adet *E. coli* suşunda, özellikle ekstra-intestinal infeksiyonlar için önemli olan serum direnci, aerobaktin demir elde etme sistemleri, hemaglutinasyon özellikleri, alfa-hemoliz ve sitotoksik nekrotizan faktör 1 gibi virülens özellikleri fenotipik ve bu özellikleri kodlayan genlerin varlığı moleküler yöntemlerle araştırıldı.

İnsanlar ve memeli hayvanlarda ekstra-intestinal infeksiyonlara neden olan *E. coli*'lerde hemoliz özelliği yüksek düzeyde belirlenmiş ve hemolizin üretiminden yoksun bırakılan mutantlarda virülensin azaldığı saptanmıştır. Ekstra-intestinal *E. coli*'lerin patogenezesinde hemolizinin eritrositleri parçalayarak etkenlerin demir ihtiyacını sağlamasında önemli bir virülens özelliği olduğu düşünülmektedir (Orskov ve Orskov, 1985). APEC izolatlarının az bir kısmının hemolizin ürettiği ve bunların koyun kanı katılmış besiyerinde alfa-hemolizden farklı bir hemolize neden olduğu bildirilmiştir (Reingold ve ark., 1999). Blanco ve ark. (1997), tavuklardan izole edilen 625 *E. coli* izolatından sadece %2,6'sının hemolizin ürettiğini Da Silveira ve ark. (2002) ise, hastalıklı tavuklardan izole ettikleri 50 *E. coli* suşunun %4'ünde hemolizin varlığını belirlediklerini bildirmişlerdir. Ancak diğer çalışmalarda ise fenotipik olarak hemoliz özelliğinin APEC'lerde belirlenmediği bildirilmiştir (Vidotto ve ark., 1990; Knöbl ve ark., 2001). Bu çalışma kapsamında kanatlılardan izole edilen 200 adet *E. coli* suşunda yapılan testle fenotipik olarak hemoliz özelliği belirlenmemiştir. Elde edilen bulgular, düşük düzeyde pozitif bulan diğer araştırmacıların bulgularıyla benzerdir.

Aerobaktin demir elde etme sistemleri memeli hayvanlarda özellikle septisemik infeksiyonlar yapan *E. coli* izolatlarında yüksek düzeyde belirlenmiş ve etkenin virülensi ile sıkı ilişkili olduğu bildirilmiştir (Linggood ve ark., 1987;

Gophna ve ark., 2001). Aerobaktin siderefor sisteminin kanatlı patojenik *E. coli*'lerdeki varlığına ilişkin çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Dho-Moulin ve Lafont (1984), çalıştıkları suşların %52'sinde aerobaktin demir elde etme sisteminin varlığını saptamışlar ve demir elde etme sistemlerinin varlığı ile mortalite arasında yakın bir ilişki olduğunu vurgulamışlardır. Ancak, bu sistemin olmadığı patojen izolatlar da saptamışlar ve bu özelliklerin olmadığı ya da in vitro olarak ekspresyonlarının olmadığını ileri sürmüşlerdir. Lafont ve ark. (1987) ise, DNA hibridizasyonu ile aerobaktin geninin varlığını belirledikleri *E. coli*'lerde bir günlük yaştaki civcivlerde LD₅₀ değerlerinin düşük olduğunu, belirlenmeyen izolatlarda ise LD₅₀ değerlerinin çok yüksek olduğu ya da civcivlerde ölüm yapmadıklarını belirlemişlerdir. Linggood ve ark. (1987), tavuk septisemilerinden izole ettikleri *E. coli*'lerin %89'unda bu sistemin varlığını belirlemişlerdir. Çeşitli araştırmalarda APEC izolatlarının tamamının demir kısıtlayıcı besiyerinde üredikleri tesbit edilmiştir (Vidotto ve ark., 1990; Knöbl ve ark., 2001). Da Silveira ve ark. (2002), fenotipik olarak sağlıklı kanatlılardan izole edilen *E. coli*'lerin %16,6'sının demir kısıtlayıcı besiyerinde ürediğini, hastalıklı kanatlılardan izole edilenlerin ise tümünün demir kısıtlayıcı besiyerinde ürediğini saptamışlardır. Tez kapsamında incelenen tüm suşların demir kısıtlayıcı besiyerinde üredikleri bulgusu, diğer araştırmacıların bulgularını destekler niteliktedir.

Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1 (CNF 1), diğer hayvanlarda septisemi olgularından izole edilen suşlarda ve üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen suşlarda sıklıkla belirlenmiş ve doku harabiyetine neden olarak suşların patogenezinde önemli olduğu vurgulanmıştır (Orskov ve Orskov, 1985; Yamamoto ve ark. 1995). APEC'lerde sitotoksin sentezinin fenotipik olarak belirlenmesinde Vero ve Hela hücre kültürleri kullanılmıştır. Fantinatti ve ark. (1994), septisemik tavuklardan elde edilen 17 izolatın kullanıldığı bir çalışmada sadece en patojenik olan 3 izolatta (%17,6) Vero hücreleri için sitotoksik aktivite gözlemlemişlerdir. Blanco ve ark. (1997) ise, septisemik ve sağlıklı tavuklardan elde edilen 645 *E. coli*'nin sadece %7'sinin toksijenik olduğunu, bunların Vero hücrelerini değil Hela hücrelerinde sitotoksik yanıt ortaya koyduğunu bulmuştur. Perreira ve Yano (1998) ise, şişkin baş sendromlu tavuklardan elde edilen 50 izolatın %72'sinde Vero ve Hela

hücrelerine etkiyen sitotoksin üretimini göstermişlerdir. Ancak çeşitli araştırmacılar tarafından çalışılan APEC izolatlarının hiç birinde Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1(CNF 1) varlığının fenotipik olarak belirlenemediği bildirilmiştir (Knöbl ve ark., 2001; Da Silveira ve ark., 2002). Bu çalışmada incelenen suşlarda, sitotoksik nekrotizan faktör 1 fenotipik olarak saptanamamıştır. Bu bulgu Perreira ve Yano (1998) tarafından yapılan çalışma bulguları ile uyumlu olmamasına karşın diğer araştırmacıların bulguları ile uyumludur. Perreira ve Yano (1998) tarafından elde edilen bulguların farklı olması, bu araştırmacıların test ettikleri suşların farklı klinik tablolardan izole edilmesi ile açıklanabilir.

Fimbrialar ekstraintestinal infeksiyonlar yapan *E. coli*'lerde en önemli virülens özelliklerinden biri olarak gösterilmiştir (Orskov ve Orskov, 1985). Kanatlı hayvanlarda *E. coli* infeksiyonlarının patogenezisinde fimbriaların rolüne ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Arda ve ark. (1987), koliseptisemili piliçlerden izole edilen *E. coli* suşlarının %90'ında hemaglutinasyon aktivitesi belirlemişler ve bu izolatların %35'lik kısmının mannoz dirençli hemaglutinasyon yaptığını bulmuşlardır. Araştırmacılar, aynı çalışmada sağlıklı piliçlerden izole edilen izolatların ise %80'inde hemaglutinasyon aktivitesi belirlemişler ve bunların %20'lik kısmının mannoz dirençli hemaglutinasyon özelliğinde olduğunu saptamışlardır. Vidotto ve ark. (1990), kolibasillozisli tavuklardan izole edilen 45 adet *E. coli* suşunun %58'inin hemaglutinasyon yaptığını ancak çalışmalarında MRHA belirleyemediklerini bildirmişlerdir. Aynı şekilde Knöbl ve ark. (2001), çalıştıkları tüm izolatların hemaglutinasyon yaptığını ve bunların tamamının mannoz dirençli hemaglutinasyon özelliğinde olduğunu bulmuşlardır. Ancak, Da Silveira ve ark. (2002), hastalıklı kanatlılardan izole edilen *E. coli* suşlarının tamamının hemaglutinasyon aktivitesine sahip olduklarını ve bunların %12'sinin mannoz dirençli karakterde olduklarını belirlemişlerdir. Bu tez kapsamındaki çalışmada suşların %90'ında hemaglutinasyon aktivitesi belirlenmiş ve bunların %26'sında MRHA saptanmıştır. Bu bulgular diğer çalışmalarla benzer niteliktedir, ancak MRHA bulguları farklılık göstermektedir. Bu farklılık, suşların farklı bölgelerden ve klinik tablolardan izole edilmesi ile açıklanabilir.

Serum direnci Col V plazmidleri ve R plazmidlerince kodlanır, bu plazmidler *E. coli*'lerin komplementin bakterisidal etkisinden kurtulma yeteneğini artırır. Bu plazmidleri taşıyan suşlar aynı zamanda çoklu antibiyotik direncine sahiptirler (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999). Hastalıklı kanatlılardan izole edilen *E. coli*'lerde yapılan bir çalışmada suşların tamamında serum direnci belirlenmiş ve bu özelliğin APEC'lerde virülensi artırdığı gösterilmiştir (Binns ve ark., 1982). Vidotto ve ark. (1990), suşların virülensi ile serum direncinin yakın ilişkili olduğunu belirlemişler ve seruma dirençli olan suşların civcivlerde LD₅₀ değerlerinin düşük olduğu, seruma orta derecede dirençli suşların ise, yüksek LD₅₀ değerlerinin olduğu ya da hiç olmadığını saptadıklarını açıklamışlardır. Knöbl ve ark. (2001) ise, çalıştıkları izolatların tamamının seruma karşı dirençli olduğunu saptamışlardır. Bu tez çalışmasında izolatların tamamının fenotipik olarak seruma karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. APEC izolatları ile yapılan diğer çalışmalarda serum direncinin genellikle yüksek düzeyde olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle teze ait yapılan çalışmadaki serum direnci bulguları diğer çalışmalara ait bulgularla benzerdir.

APEC'lerin virülens özelliklerin saptanmasında fenotipik yöntemlerden farklı olarak moleküler tekniklerde kullanılmaktadır. Bu teknikler arasında çoğunlukla PCR temelli metodlar yer almaktadır (Ngeleka ve ark., 1996; Janssen ve ark., 2001; Knöbl ve ark., 2001; Delicato ve ark., 2003). Bu çalışmada virülens özelliklerinin belirlenmesinde fenotipik metodlara ilave olarak moleküler tekniklerden de yararlanılmıştır.

APEC'lerin hemoliz özelliğinin belirlenmesine yönelik yapılan moleküler çalışmalarda çoğunlukla izolatlar bu özellik yönünden negatif bulunmuştur (Janssen ve ark., 2001; Knöbl ve ark., 2001; Delicato ve ark., 2003). Bu çalışmada da hemoliz özelliğinin PCR ile negatif olarak bulunması, diğer araştırma sonuçlarını destekler niteliktedir.

Aerobaktin sistemini kodlayan genlerin varlığını ortaya koymaya yönelik moleküler çalışmalar da bulunmaktadır. Janssen ve ark. (2001), *iucD* genini kanatlı patojenik *E. coli* izolatlarının %88,7'sinde belirlemişlerdir. Ayrıca, Knöbl ve ark.

(2001), izole ettikleri tüm suşların %75'inde aerobaktin özelliğini kodlayan geni (*IucD*) saptamışlardır. Delicato ve ark. (2003), sağlıklı kanatlılardan izole edilen *E. coli*'lerde bu genin varlığını %12 düzeyinde belirlerken, kolibasilozisli kanatlılardan izole edilen suşların %63'ünde saptamışlardır. Tez kapsamında yapılan çalışmada ise, hastalıklı kanatlı hayvanlardan izole edilen *E. coli* suşlarının tamamı demir kısıtlayıcı besiyerlerinde üremiş ancak aerobaktin geninin varlığı PCR ile suşların %88'inde belirlenmiştir. Bu oran, diğer çalışmalarla uyumlu olup aerobaktin demir elde etme sisteminin, APEC'ler için önemli bir virülens özelliği olduğunu gösteren çalışmaları desteklemektedir.

Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1 geni ile ilgili yapılan bir çok çalışmada, araştırmacılar APEC'lerde bu geni saptayamadıklarını bildirmişlerdir (Ngeleka ve ark., 1996; Knöbl ve ark., 2001; Delicato ve ark., 2003). Ancak Janssen ve ark. (2001), test ettikleri izolatlarda %2,5 düzeyinde *cnf 1* geni varlığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise, PCR ile incelenen 200 *E.coli* suşunda *cnf 1* geni varlığı saptanamamış olup, bu sonuç diğer araştırmacıların bulguları ile uyumludur.

Çeşitli çalışmalarda, *fimH* genleri tarafından kodlanan Tip 1 fimbriaların sadece patojen izolatlarda değil kommensal suşlarda da yüksek düzeyde buldukları gösterilmekle birlikte tip 1 fimbriaların APEC'lerin en önemli virülens özelliklerinden birisi olduğu vurgulanmıştır (Dozois ve ark., 1992; Ngeleka ve ark., 1996; Pourbakhsh ve ark., 1997; Maurer ve ark., 1998; Vidotto ve ark., 1997). Delicato ve ark. (2003), kolibasilozis olgularından izole ettikleri suşların %96,5'inde sağlıklılarından izole ettiklerinin ise %92'sinde tip 1 fimbria genlerini belirlemişlerdir. Ayrıca, Janssen ve ark. (2001), tip 1 fimbriaların varlığını suşların %97,3'ünde belirlemişler ve Knöbl ve ark. (2001) ise, çalıştıkları izolatların tamamında DNA hibridizasyonu ile tip 1 fimbriaları kodlayan genler yönünden pozitif olduğunu göstermişlerdir. Tez kapsamındaki çalışmada APEC izolatlarının %88 (176)'inde tip 1 fimbriaları kodlayan *fimH* geni varlığı belirlenmiş olup, bu oran diğer çalışmalarla uyumludur ve tip 1 fimbriaların APEC'in patogeneğinde önemli olduğunu bildiren araştırmacıların bulgularını desteklemektedir. APEC'lerin Tip 1 fimbrialar dışında insan ve memeli hayvanlarda özellikle üriner sistemde infeksiyon

yapan *E. coli* izolatlarında belirlenen P fimbrialar gibi farklı fimbrialarda sentezledikleri ortaya konulmuş (Babai ve ark., 1997) ve P fimbrialar değişik ülkelerden toplanan APEC izolatlarının %78'inde belirlenmiştir (Van den Bosch ve ark., 1993). Knöbl ve ark. (2001), deve kuşlarından izole edilen *E. coli* izolatlarında suşların tamamında mannoz dirençli hemaglutinasyon saptamalarına rağmen P fimbriaları kodlayan *papC* geninin varlığını sadece yüksek patojen izolatlarda (%12,5) belirlemişlerdir. Janssen ve ark. (2001), *pap* operonunun varlığını işaret eden *papC* genini çalışılan suşların %30 kadarında belirlemişler ve *papC* bulunduran izolatların APEC'in daha virulent bir alt sınıfı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Delicato ve ark. (2003), *papC* genini kolibasilozisten izole eden suşlarda %18,5'inde sağlıklı kanatlılardan izole edilen suşların ise %6'sında belirlemişlerdir. Yamamoto ve ark. (1995), DNA hibridizasyonu ile *pap* operonunu bulduklarını belirledikleri üriner sistem izolatı *E. coli*'lerde *papEF* geninin *papC* ye nazaran daha yüksek düzeyde bulunduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada izolatların %26'sında *papEF* geni ve %14'ünde *papC* geni PCR ile tespit edilmiştir. Diğer çalışmalarda APEC izolatlarında P fimbrialara ait genlerin sıklığı %12,5-78 arasında değiştiği görülmektedir. Bu çalışmada elde edilen bulgular, daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen pozitiflik oranları arasında bulunmaktadır. P fimbrialarla ilgili elde edilen farklı bulgular, suşların coğrafik farklılığından ve farklı klinik tablolardan izole edilmesinden kaynaklanabilir. Özellikle üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *E. coli* suşlarında belirlenen S fimbrialar (*sfa*) ve afimbrial adezinler (*afa*) (Yamamoto ve ark., 1995), APEC'lerin virülens özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda belirlenememiştir (Ngeleka ve ark., 1996; Janssen ve ark., 2001; Knöbl ve ark., 2001; Delicato ve ark., 2003). Bu çalışmada da, diğer çalışmalarla benzer şekilde kanatlı hayvanlardan izole edilen 200 adet *E. coli* suşunun hiçbirinde *sfa* ve *afa* genleri belirlenemedi.

Serum direnci ile ilgili çalışmalarda, Pfaff-McDonough ve ark. (2000), kolibasilozis izolatlarının %78,7'sinde, dışkı izolatlarının ise %18,7 oranında serum direncini kodlayan genlerin varlığını belirlemişlerdir. Delicato ve ark. (2003), serum direncini kodlayan *iss* geninin varlığını kolibasilozis izolatların %38,5'inde ve kommensal suşların %16'sında, *cvaC* genini ise kolibasilozis izolatların %35,5'inde

ve kommensal suşların %10'unda belirlemişlerdir. Ngeleka ve ark., (1996) ise, 39 adet APEC izolatının %72'sinde *traT* geninin varlığını saptamıştır. Bu tez çalışmasında serum direncinden sorumlu *traT* geni izolatların %90'ında belirlendi. Bu oran diğer çalışmalara göre yüksektir. Bu durum farklı çalışmalarda serum direncinden sorumlu farklı gen bölgelerinin (*iss*, *cvaC* gibi) çalışılmasından ya da çalışmalar arasındaki bölgesel farklılıklardan kaynaklanabilir.

APEC'lerin virülens özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan fenotipik ve moleküler çalışmalarda, en çok belirlenen özelliklerinden yararlanılarak APEC'ler için spesifik patotipler saptanmıştır. Vidotto ve ark. (1990), kanatlı patojenik *E. coli*'lerin en önemli özelliklerinin kolisin V üretimi, aerobaktin üretimi, serum direnci ve hücre invazyonu olduğunu göstermişler ve fenotipik olarak aerobaktin demir elde etme sistemlerinin varlığı ve serum direncinin birlikte olmasının APEC'ler için önemli bir özellik olduğunu açıklamışlardır. APEC'lerin virülens özelliklerini belirlemek için yapılan moleküler çalışmalarda ise, kanatlılarda kolibasillozis olgularından izole edilen *E. coli*'lerde *iucD*, *tsh*, *fimC*, *fyuA*, *irp2*, *papC* ve *astA* olarak adlandırılan yedi virülens geni yaygın olarak belirlenmiş ve bu özelliklerin dağılımına göre APEC suşları için farklı moleküler patotipler tanımlanmıştır (Ngeleka ve ark., 1996; Janssen ve ark., 2001; Delicato ve ark., 2003). Ngeleka ve ark. (1996), bu patotiplerden *tsh/fim/iuc* ve *tsh/pap/iuc*'yi sırasıyla %53,8 ve %15,4 oranında iç organlardan izole edilen *E. coli* izolatlarında, Delicato ve ark. (2003) ise, bu patotipleri kolibasillozisten elde edilen izolatlarda %37,0 ve %11,5 oranında belirlemişlerdir. Janssen ve ark. (2001) tarafından yapılan bir araştırmada da, APEC izolatlarının çoğunluğunun (%79,3) *fimC*, *iucD* ve *tsh* genlerini bulundurduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada fenotipik olarak serum direnci/demir elde etme özelliği/hemaglutinasyon özelliği suşların %90'ında belirlenmiş, moleküler olarak ise *traT/iucD/fimH* patotipi ise suşların %88'inde belirlenmiştir. Bu sonuçlar genellikle *E. coli* suşlarının patotiplendirilmesinde kullanılan virülens özelliklerinin dağılımına temel olan bilgiler sağlaması açısından önemli olarak değerlendirilmiştir. Ancak tez kapsamında incelenen suşların patotiplendirmesine yönelik ilave bir çalışma yapılmamıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda hemoliz özelliği suşların tamamında fenotipik ve moleküler yöntemlerle negatif bulunmuştur. Ekstra intestinal hastalıklar yapan *E. coli* suşlarında önemli bir virülens özelliği olan hemoliz özelliği APEC'le yapılan çalışmalarda düşük oranda ya da tamamen negatif olarak bulunmuştur (Vidotto ve ark., 1990; Blanco ve ark., 1997; Reingold ve ark., 1999; Knöbl ve ark., 2001; Da Silveira ve ark., 2002). Hemoliz özelliğinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan fenotipik ve moleküler testlerin sonuçları birbiriyle tamamıyla uyumludur.

Aerobaktin özelliğinin saptanmasına yönelik yapılan çalışmalarda genellikle suşların demir kısıtlayıcı besiyerlerinde üreyebilme kabiliyetleri ve indikatör *E. coli* suşları kullanılarak biyolojik analizlerle belirlenebilmektedir (Vidotto ve ark., 1990; Knöbl ve ark., 2001). Hastalıklı kanatlılardan izole edilen suşların demir kısıtlayıcı besiyerinde üremelerine rağmen, kommensal izolatlarda bu oranın düşük olduğu bildirilmiştir (Da Silveira ve ark., 2002). Bu çalışmada suşların tamamı demir kısıtlayıcı besiyerinde üremiş ve bunların %88'inde aerobaktin özelliğini kodlayan gen *iucD* belirlenmiştir. İzolatların tamamı demir kısıtlayıcı besiyerinde üremelerine rağmen PCR'de *iucD* gen yönünden negatif bulunmaları; aerobaktin sentezinde rol oynayan farklı genler tarafından kodlandığına ait diğer araştırcıların (Karch ve ark., 1999; Janssen ve ark., 2001) bulgularını desteklemektedir.

APEC'le ilgili olarak yapılan çalışmalarda Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1(CNF 1) özellikle şişkin baş sendromlu tavuklardan izole edilen *E. coli*'lerde yüksek düzeyde saptanmış (Perreira ve Yano, 1998), ancak APEC'lerle ilgili diğer çalışmalarda varlıkları belirlenememiştir (Knöbl ve ark., 2001; Da Silveira ve ark., 2002). Bu çalışmada da Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1'in fenotipik ve moleküler çalışmalarda belirlenememesi bu iki yöntemle elde edilen bulguların uyumlu olduğunu göstermektedir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda izolatların %90'ında hemaglutinasyon aktivitesi saptandı ve bunların %26'sının mannoz rezistans özellikte oldukları fenotipik olarak belirlendi. Fimbriaları kodlayan genlerin varlığını belirlemek

amacıyla yapılan PCR işlemi sonucunda, fenotipik yöntemle pozitif olarak saptanan 180 suşun 128 (%71.1)'inde *fimH* geni, 4 (%2.2)'ünde *papEF* geni ve suşların 48 (%26,7)'inde *fimH* ve *papEF* genleri birlikte saptandı. Fenotipik olarak MRHA pozitif 52 suşun tamamında *papEF* geni belirlenirken 28 (%53.8) suşta *papC* geni belirlendi. Bu bulgular, hemaglutinasyon ve MRHA özelliğinin farklı gen bölgeleri tarafından oluşturulduğunu göstermesi bakımından önemli bulundu. Bu bulgu, fenotipik yöntemlerin *E. coli* virülens özelliklerinin pratik olarak belirlenmesinde yarar sağlamasına karşın, detaylı yaklaşımlarda bulunabilmek için moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulduğunu göstermesi bakımından önemli olduğunu ortaya koydu.

Serum direncinin belirlenmesine yönelik yapılan fenotipik çalışmalarda bu özelliğın incelenen tüm suşlarda ortaya konulması ve bu suşlarda %90'ında serum dirençliliğini kodlayan *traT* geninin saptanması, bu özelliğı kodlayan diğeri gen bölgelerinin de incelenmesi gerektiğini ortaya koydu.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kanatlı hayvanlardan izole edilen 200 adet *E. coli* suşunun virülens özellikleri fenotipik yöntemlerle ve bu özellikleri kodlayan genlerin varlığı moleküler yöntemlerle araştırıldı. Çalışmada alınan sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- İncelenen suşların hemoliz özelliklerinin hem fenotipik hem de moleküler olarak bulunmaması sonrasında, bu özelliğin APEC izolatlarında önemli bir virülens özelliği olmadığı belirlendi.
- Aerobaktin demir elde etme sistemlerinin izole edilen tüm suşlarda fenotipik olarak saptanması, APEC suşlarında bu özelliğin önemli olduğunu ortaya koydu. PCR ile yapılan çalışmada pozitiflik oranının fenotipik olarak elde edilen bulgulara göre düşük olması, bu özelliği kodlayan (kromozomal, ekstrakromozomal) tüm genlerin araştırılması gerektiğini gösterdi. Bu nedenle virülens özelliklerinin araştırılmasında fenotipik yöntem kullanılmasının yararlı olduğu, ancak hangi gen/genlerden kaynaklandığını belirlemede moleküler yöntemlerin kullanılması sonucuna varıldı.
- Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1'in hem fenotipik hem de moleküler olarak saptanamaması, APEC suşlarında önemli bir virülens özelliği olmadığını düşündürdü.
- İncelenen suşlarda hemaglutinasyon özelliğinin yüksek bulunması, bu özelliğin virülenste önemli bir faktör olduğunu gösterdi. Ayrıca fenotipik ve moleküler yöntemlerle elde edilen hemaglutinasyon ve MRHA özellikleri ile ilgili bulguların benzer olması her iki yöntemin bu özelliklerin saptanmasında kullanılabilirliğini ortaya koydu. Moleküler testlerle elde edilen sonuçların APEC suşlarında bu özelliği kodlayan gen bölgeleri hakkında bilgi verici olması nedeniyle önemli bulundu.
- İncelenen suşlarda serum direncinin yüksek bulunması, APEC suşlarında bu özelliğin virülens için önemli olduğunu ortaya koydu. PCR ile elde edilen

sonuçların fenotipik yöntemle göre düşük olması, birden fazla gen bölgesi tarafından kodlanan serum dirençliliğinin olduğunu gösterdi.

- Fenotipik yöntemlerle PCR temelli tekniklerle elde edilen sonuçların uyumlu çıkması, kanatlı orijinli suşların virülens özelliklerini ortaya koymada her iki yöntemde yararlı olduğu; ancak, fenotipik testlerin suşlarda virülens özelliklerinin var/yok belirlenmesinde, moleküler tekniklerin ise, özellikle birden fazla gen bölgesi ile belirlenen virülens özellikleri hakkında detaylı bilgi vermesi açısından daha yararlı olduğu sonucuna varıldı.

Sunulan bu çalışmanın ülkemizde kanatlı patojenik *E. coli*'lere yönelik yapılacak çalışmalar için yarar sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışma ile, APEC suşlarında virülensle ilgili birçok parametre hem fenotipik hem de moleküler olarak ortaya konulmuştur. Günümüzde bazı araştırmacılar tarafından APEC suşları için önerilen virülens özelliklerinin değerlendirilmesiyle oluşturulan patotiplendirme yöntemlerine esas olacak temel parametreler sağlanmıştır. Bu konuda yapılacak çalışmaların artması ve detaylandırılması, konu ile ilgili bilgi birikimini artıracaktır.

ÖZET

Kanatlı Orijinli *Escherichia coli* suşlarının virülens özelliklerinin fenotipik ve moleküler metotlarla belirlenmesi

Bu çalışmada kolibasilozisli kanatlı hayvanlardan izole edilen 200 adet *E. coli* suşunda, özellikle ekstra-intestinal infeksiyonlar için önemli olan virülens faktörlerinden serum direnci, aerobaktin demir elde etme sistemleri, mannoz duyarlı hemaglutinasyon (tip 1 fimbrialar) ve mannoz dirençli hemaglutinasyon (P fimbrialar, S fimbrialar ve afimbrial adezinler) özellikleri, alfa-hemoliz ve sitotoksik nekrotizan faktör 1 gibi virülens özellikleri fenotipik yöntemlerle ve bu özellikleri kodlayan genlerin varlığı moleküler yöntemlerle araştırıldı.

Çalışmada suşlar koyun kanlı agar kullanılarak yapılan testle hemoliz üretimi ve moleküler olarak hemoliz özelliğini kodlayan gen yönünden negatif bulundu. Suşların tamamının demir kısıtlayıcı besiyerinde ürediği ve bu suşların %88'inin aerobaktin özelliğini kodlayan *IucD* genine sahip oldukları saptandı. Vero hücre kültürleri kullanılarak yapılan toksin analizlerinde suşların %40'ında ısıya duyarlı toksin belirlendi, ancak suşlarda fenotipik ve moleküler olarak sitotoksik nekrotizan faktör 1 belirlenemedi. İnsan O grubu ve değişik hayvanlara ait eritrositler kullanılarak yapılan hemaglutinasyon testi ile suşların %90'ında hemaglutinasyon aktivitesi saptandı ve bunların %26'lık kısmının MRHA özelliğinde olduğu belirlendi. Tip 1 fimbriaları kodlayan *FimH* geni suşların %88'inde, P fimbriaları kodlayan *PapEF* geni %26'sında bulundu ve bu izolatların %14'lük kısmının aynı zamanda *PapC* genini de bulundurduğu saptandı. Ancak, suşlarda S fimbrialar ve afimbrial adezinleri kodlayan *Sfa* ve *Afa* genleri belirlenemedi. Değişik hayvanlara ait serumlarla yapılan testte suşların tamamında serum direnci fenotipik olarak saptandı ve serum direncinden sorumlu *TraT* geni suşların %90'ında PCR ile belirlendi.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, APEC suşlarında en önemli virülens özelliklerinin aerobaktin demir elde etme sistemleri, fimbrial adezinler ve serum direnci olduğu belirlenmiştir. Virülens ile ilgili olarak düşünülen hemolizin ve Sitotoksik Nekrotizan Faktör 1 özelliklerinin, kanatlı orijinli *E.coli* suşlarının virülensinde önemli olmadığı sonucuna varıldı. Virülens özelliklerinin belirlenmesinde fenotipik ve PCR temelli yöntemlerin benzer sonuçlar verdiği belirlendi. APEC suşlarında önemli virülens faktörlerinin birlikte değerlendirilmesinin, bu suşların tiplendirilmesinde daha yararlı sonuçlar vereceği ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, kanatlı hayvanlar, virülens özellikleri.

SUMMARY

Detection of virulence properties *Escherichia coli* originated from poultry by phenotypic and molecular methods

In this study, virulence factors (which were particularly important for extra-intestinal infections) such as serum resistance, aerobactin iron uptake systems, mannose-sensitive (type 1 fimbria) and mannose-resistant haemagglutination (P fimbria, S fimbria, afimbrail adhesins), alfa-haemolysis and cytotoxic necrotizing factor 1 in 200 *E. coli* isolates from poultry with colibacillosis, were investigated by both phenotypic methods and molecular methods by investigating the genes encoding these factors.

Strains were detected to be negative in haemolysin synthesis tests performed with sheep blood agar, and they were negative in molecular tests investigating the haemolysin gene. All strains grew on iron deficient medium and 88 % of these were found to harbor *iucD* gene encoding aerobactin. Heat-labile toxin was detected in 40 % of the isolates in the toxin analyses performed in Vero cells, however, cytotoxic necrotizing factor 1 could not be determined in the strains with phenotypic and molecular tests. Haemagglutination activity was determined in 90 % of strains in haemagglutination tests performed with human O group erythrocytes and ehrythrocytes derived from different animals. Twenty six percent of these strains were found to have MRHA activity. *FimH* gene encoding type 1 fimbria, *papEF* gene encoding P fimbria, were detected respectively in 88 % and 26 % of the strains, and 14 % of all isolates were also found to harbor the *papC* gene also encoding the P fimbria. However, *sfa* and *afa* genes encoding S fimbria and afimbrial adhesins, respectively, could not be detected in the study. Serum resistance was phenotypically determined in all strains in the tests performed with sera derived from different animals and *traT* gene encoding serum resistance were detected in 90 % of strains by PCR.

In the study, serum resistance, aerobactin iron uptake systems and the existence of fimbrial adhesins were determined as the most important virulence factors of avian pathogenic *E. coli* isolates.

Key Words: *Escherichia coli*, poultry, virulence properties.

KAYNAKLAR

- ACHTMAN, M., HEUZENROEDER, M., KUSECEK, B., OCHMAN, H., CAUGANT, D., SELANDER, R. K., VAISANEN-RHEN, V., KORHONEN, T. K., STUART, S., ORSKOV, F., ORSKOV, I. (1986). Clonal Analysis of *Escherichia coli* O2:K1 Isolated from Diseased Humans and Animals. *Infect. Immun.* **51**: 268-276.
- AKASHI, N., HITOTSUBASHI, S., YAMANAKA, H., FUJII, Y., TSUJI, T., MIYAMA, A., JOYA, J. E., OKAMOTO, K. (1993). Production of heat-stable enterotoxin II by chicken clinical isolates of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **109**: 311-316.
- ARDA, M., İZGÜR, M., AKAY., AYHAN, H. (1989). Tavuklardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının Kongo red'e bağlanma, mannoz direnci, patojenite ve antibiyotiklere duyarlılık özelliklerinin incelenmesi. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.* **19**: 185-198.
- ARNE, P., MARC, D., BREE, A., SCHOULER, C., DHO-MOULIN, M. (2000). Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a fimH deletion. *Avian Dis.* **44**: 343-355.
- AYDIN, N., AKAN, M., ERDEĞER, J. (1993). Ankara çevresinde raslanan Swollen Head Syndrome (Şişkin Baş Sendromu) olguları üzerine bir araştırma. *Etilik Vet. Mikrobiol. Derg.* **7**: 24-33.
- BABAI, R., BLUM-OEHLER, G., STERN, B. E., HAECKER, J., RON, E. Z. (1997). Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **149**: 99-105.
- BARNES, J. H., GROSS, W. B. (1997). Colibacillosis. In: Calnek, B.W., Barnes, J.H., Beard, C.W., Mac Dougald, R.L., Saif, Y.M. (Eds.), *Diseases of Poultry*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 131-141.
- BEERY, J. T., DOYLE, M. P., SCHOENI, J. L. (1985). Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 310-315.
- BERKHOFF, H. A., VINAL, A. C. (1986). Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive *E. coli* pathogenic for poultry. *Avian Dis.* **30**: 117-121.
- BINNS, M. M., MAYDEN, J., LEVINE, R. P. (1982). Further Characterization of Complement Resistance Conferred on *Escherichia coli* by the Plasmid Genes traT of R100 and iss of ColV, I-K94. *Infect. Immun.* **35**: 654-659.
- BLANCO, J. E., BLANCO, M., GONZALEZ, E. A., ALONSO, M. P., GARABAL, J. I. (1990). Comparative evaluation of three tests for the detection of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors (CNF1 and CNF2) using filtrates of cultures treated with mitomycin C. *FEMS Microbiol. Lett.* **69**: 311-316.
- BLANCO, J. E., BLANCO, M., MORA, A., BLANCO, J. (1997). Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated

from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2953–2957.

BLANCO, J. E., BLANCO M., MORA A., JANSEN W. H., GARCIA, V., VASQUEZ, M. L., BLANCO, J. (1998). Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Vet. Microbiol.* **61**: 229-235.

BOLIN, C. A., JENSEN, A. E. (1987). Passive immunization with antibodies against iron-regulation outer membrane proteins protects turkeys from *Escherichia coli* septicemia. *Infect. Immun.* **55**: 1239–1242.

BREE, A., DHO, M., LAFONT, J. P. (1989). Comparative infectivity of axenic and specific pathogen free chickens of O2 *E. coli* strains with or without virulence factors. *Avian Dis.* **33**: 134–139.

CAYA, F., FAIRBROTHER, J. M., LESSARD, L., QUESSY, S. (1999). Characterization of the risk to human health of pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken carcasses. *J. Food. Prot.* **62**: 741-746.

CHANSIRIPORNCHAI, N., RAMASOOTA, P. SASIPREEYAJAN, J., SVENSON, S. B. (2001). Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet. Microbiol.* **80**: 75-83.

CHULASIRI, M., SUTHIENKUL, O. (1989). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens. *Vet. Microbiol.* **21**: 189-194.

CLOUD, S. S., ROSENBERGER, J. K., FRIES, P. A. WILSON, R. A., ODOR, E. M. (1985). In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity. *Avian Dis.* **29**: 1084-1093.

COLLINSON, S. K., DOIG, P. C., DORAN, J. L., CLOUTHIER, S., TRUST, T. J., KAY, W. W. (1993). Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *J. Bacteriol.* **175**: 12–18.

DA SILVEIRA, W. D., FERREIRA, A. BROCCHI, M. L., HOLLANDA, M. D. A., CASTRO, F. P. D., YAMADA, A. T., LANCELLOTTI, M., DA SILVEIRA, W. D., DE HOLLANDA, L. M., DE CASTRO., A. F. P. (2002). Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* **85**: 47-53.

DELICATO, E. R., DE BRITO, B. G., GAZIRI, L. C. J., VIDOTTO, M.C. (2003). Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.* **94**: 97-103.

DELL'OMO, G., MORABITO, S., QUONDAM, R., AGRIMI, U., CIUCHINI, F., MACRI, A., CAPRIOLI, A. (1998). Feral pigeons as a source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Vet. Rec.* **142**: 309-310.

DHO-MOULIN, M., FAIRBROTHER, J. M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* **30**: 299–316.

- DHO-MOULIN, M., LAFONT, J. P. (1984). Adhesive properties and iron uptake abilities in *E. coli* lethal and non-lethal for chicks. *Avian Dis.* **28**: 1016–1025.
- DHO-MOULIN, M., VAN DEN BOSCH, J. F., GIRARDEAU, J. P., BREE, A., BARAT, T., LAFONT, J. P. (1990). Surface antigens from *Escherichia coli* O2 and O78 strains of avian origin. *Infect. Immun.* **58**: 740-745.
- DOYLE, M. P. S, CHOENI, J. L. (1987). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2394-2396.
- DOZOIS, C. M., CHANTELOUP, N., DHO-MOULIN, M., BREE, A., DESAUTELS, C., FAIRBROTHER, J. M. (1994). Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (Type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **38**: 231-239.
- DOZOIS, C. M., FAIRBROTHER, J. M., HAREL, J., BOSSSE, M. (1992). Pap and pil related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens and turkeys infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **60**: 2648–2656.
- DOZOIS, C. M., POURBAKHS, S. A., FAIRBROTHER, J. M. (1995). Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet. Microbiol.* **45**: 297-309.
- ELFADIL, A. A., VAILLANCOURT, J. P., MEEK, A. H., JULIAN, R. J., GYLES, C. L. (1996). Description of cellulitis lesions and associations between cellulitis and other categories of condemnation. *Avian Dis.* **40**: 690-698.
- ELLIS, M. G., ARP, L. H., LAMONT, S. J. (1988). Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys. *Am. J. Vet. Res.* **49**: 2034-2037.
- EMERY, D. A., NAGARAJA, K.V., SHAWD, P., NEWMAN, J. A., WHITE, D. G. (1992). Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis.* **36**: 504-511.
- FANTINATTI, F., SILVEIRA, W. D., CASTRO, A. F. (1994). Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemic *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* **41**: 75-86.
- FARMER, J. J., FANNING, G. R., DAVIS, B. R., O'HARA, C. M., RIDDLE, C., HICKMAN-BRENNER, F. W., ASBURY, M. A., LOWERY, V. A., BRENNER, D. J. (1985). *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **21**: 77-81.
- GOPHNA, U., OELSCHLAGER, T. A., HACKER, J., RON, E. Z. (2001): *Yersinia* HPI in seticemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. *FEMS Microbiol. Lett.* **196**: 57-60.

- GRIFFIN, P. M., TAUXE, R. V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* **13**: 60-98.
- GUO, W., LING, C., CHENG, F., GUO, W. Z., LING, C. S., CHENG, F. H. (1998). Preliminary investigation on enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 from domestic animals and fowl in Fujian province. *Chinese J. Zoonoses* **14**: 3-6.
- GYIMAH, J. E., PANIGRAHY, B. (1988). Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of pathogenic *Escherichia coli* to chicken tracheal epithelium. *Avian Dis.* **32**: 74-78.
- HEUVELINK, A. E., ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T., VAN DEN BIGGELAAR, F. L., VAN LEEUWEN, W. J., DE BOER, E. (1999). Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int. J. Food Microbiol.* **52**: 67-75.
- HIMATHONGKHAM, S., RIEMANN, H., BAHARI, S., NUANUALSUWAN, S., KASS, P., CLIVER, D. O. (2000). Survival of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in poultry manure and manure slurry at sublethal temperatures. *Avian Dis.* **44**: 853-860.
- IKE, K., MCEWEN, S.A., DANBARA, H., KUME, K. (1992). Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100-megadalton plasmid. *J. Vet. Med. Sci.* **54**: 1091-1098.
- İZGÜR, M. (1981). Sağlıklı koyunlardan izole edilen *E. coli* suşlarının çeşitli özellikleri üzerinde incelemeler. Doktora Tezi. Ankara Üniv. Vet. Fak., Ankara
- İZGÜR, M. (1997); *Escherichia coli* ve *Escherichia coli* İnfeksiyonları. In; *Özel Mikrobiyoloji*. Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M., Diker, K.S. Medisan Yayınevi. 4. Baskı. Ankara. 45-49.
- İZGÜR, M. (2002); Koli İnfeksiyonları. In; *Kanatlı Hayvan Hastalıkları*, Ed.: M. İzgür, M. Akan (Eds); Medisan Yayınevi. 1. Baskı. Ankara. 55-60.
- İZGÜR, M. (2006). *Escherichia coli* İnfeksiyonları. In: *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*, Ed.: N. Aydın, J. Paracıkoğlu, Ankara: İlke-Emek Matbaacılık ve Yayıncılık, s.: 110-116.
- JANSSEN, T., SCHWARZ, C., PREIKSCHAT, P., VOSS, M., PHILIPP, H. C., WIELER, L. H. (2001). Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 371-378.
- JOHNSON, J. R., STELL, A. L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.* **181**: 261-272.

- JORDAN, F. T. W., PATTISON, M. (1996). Poultry diseases. W. B. Saunders Company: London, s.: 38-43.
- KAIPAINEN, T., POHJANVIRTA, T., SHPIGEL, N. Y., SHWIMMER, A., PYÖRALA, S., PELKONEN, S. (2002). Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet. Microbiol.* **85**: 37-46.
- KALLENIOUS, G., MOLLBY, R., SVENSON, S.B., HELIN, I., HULTBERG, H., CEDERGREN, B., WINBERG, J. (1981). Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Lancet* **2**: 1369-1372.
- KARCH, H., SCHUBERT, S., ZHANG, D., ZHANG, W., SCHMIDT, H., OLSCHLAGER, T., HACKER, J. (1999). A Genomic Island, Termed High-Pathogenicity Island, Is Present in Certain Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Clonal Lineages. *Infect. Immun.* **67**: 5994-6001.
- KNÖBL, T., BACCARO, M. R., MORENO, A. M., GOMES, T. A. T., VIEIRA, M. A. M., FERREIRA, C. S. A., FERREIRA, A. J. P. (2001). Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. *Vet. Microbiol.* **83**: 71-80.
- KRAUSE, W. J., FREEMAN, R. H., EBER, S. L., HAMRA, F. K., FOK, K. F., CURRIE, M. G., FORTE, L. R. (1995). Distribution of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin/guanylin/uroguanylin receptors in the avian intestinal tract. *Acta. Anat.* **153**: 210-219.
- LA RAGIONE, R. M., COOLEY, W. A., WOODWARD, M. J. (2000a). The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *J. Med. Microbiol.* **49**: 327-338.
- LA RAGIONE, R. M., SAYERS, A. R., WOODWARD, M. J. (2000b) The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old-chick model. *Epidemiol. Infect.* **124**: 351-363.
- LA RAGIONE, R. M., WOODWARD, M. J. (2002). Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res. Vet. Science.* **73**: 27-35.
- LAFONT, J. P., DHO, M., D'HAUTEVILLE, H. M., BRÉE, A., SANSONETTI, P. J. (1987). Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **55**: 193-197.
- LINGGOOD, M., ROBERTS, M., FORD, S., PARRY, S. H., WILLIAMS, P. H. (1987). Incidence of aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals. *J. Gen. Microbiol.* **133**:835-842.
- MAINIL, J. (2007). Avian pathogenic *Escherichia coli*. Erişim:[<http://edgealias.accuwebhosting.>]. Erişim tarihi:13.12.2007.

- MARC, D., ARNÉ, P., BRÉE, A., DHO-MOULIN, M. (1998). Colonization ability and pathogenic properties of a *fin*⁻ mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **149**: 473–485.
- MAURER, J. J., LEE, M. D., LOBSINGER, C., BROWN, T., MAIER, M., THAYER S. G. (1998). Molecular typing of avian *Escherichia coli* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *Avian Dis.* **42**: 431-451.
- MONTENEGRO, M. A., BITTER-SUERMAN, D., TIMMIS, J. K., AGUERO, M. E., CABELLO, F. C., SANYAL, S. C., TIMMIS, K. N. (1985). *traT* gene sequence, serum resistance, and pathogenicity-related factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1511–1527.
- MONTGOMERIE, J. Z., BINDEREIF, A., NEILANDS, J. B., KALMANSON, G. M., GUZE, L. B. (1984). Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *E.coli* isolates from patients with bacteraemia. *Infect. Immun.* **46**: 835–838.
- MORABITO, S., DELL'OMO, G., AGRIMI, U., SCHMIDT, H., KARCH, H., CHEASTY, T., CAPRIOLI, A. (2001). Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet. Microbiol.* **82**: 275-283.
- NAKAMURA, K., COOK, J. K., FRAZIER, J. A., NARITA, M. (1992). *Escherichia coli* multiplication and lesions in the respiratory tract of chickens inoculated with infectious bronchitis virus and/or *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **36**: 881-890.
- NGELEKA, M., KWAGA, J. K., WHITE, D. G., WHITTAM, T. S., RIDDELL, C., GOODHOPE, R., POTTER, A. A., ALLAN, B. (1996). *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationship among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect. Immun.* **64**: 3118-3126.
- NOLAN, L. K., HORNE, S. M., GIDDINGS, C. W., FOLEY, S. L., JOHNSON, T. J., LYNNE, A. M., SKYBERG, J. (2003). resistance to Serum Complement, iss, and Virulence of Avian *Escherichia coli*. *Vet. Res. Communications* **27**: 101-110.
- OLSÉN, A., JONSSON, A., NORMARK, S. (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature (London)* **338**: 652–655.
- ØRSKOV, I., ØRSKOV, F. (1985). *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. *J. Hyg. Camb.* **95**: 551–575.
- OYETUNDE, O. O. F., THOMSON, R. G., CARLSON, H. C. (1978). Aerosol exposure of ammonia, dust and *Escherichia coli* in broiler chickens. *Can. Vet. J.* **19**: 187-193.
- PAYNE, S. M. (1988). Iron and virulence in the family Enterobacteriaceae. *CRC Critical Reviews in Microbiology* **16**: 81–111.

- PEIGHAMBARI, S. M., JULIAN, R. J., GYLES, C.L. (2000). Experimental *Escherichia coli* respiratory infection in broilers. *Avian Dis.* **44**: 759-769.
- PERREIRA, V. R., YANO, T. (1998). Cytotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome (SHA). *Vet. Microbiol.* **62**: 111-119.
- PFAFF-MCDONOUGH, S. J., HORNE, S. M., GIDDINGS, C. W., EBERT, J. O., DOETKOTT, C., SMITH, M. H., NOLAN, L. K. (2000). Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis.* **44**: 23-33.
- PILIPCINEC, E., TKACIKOVA, L., NAAS, H. T., CABADAJ, R., MIKULA, I. (1999). Isolation of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 from poultry. *Folia Microbiol.* **44**: 455-456.
- POURBAKHSH SA., DHO-MOULIN, M., BREE A., DESAUTELS, C., MARTINEAU-DOIZE, B., FAIRBROTHER, J. M. (1997). Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* **22**: 331-41.
- POURBAKHSH, S. A., FAIRBROTHER, J. M. (1994). Purification and characterisation of P fimbriae from an *Escherichia coli* strain isolated from a septicemic turkey. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**:313-318.
- PROVENCE, D. L., CURTISS, III R. (1994). Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* **62**: 1369-1380.
- QUINN, P. J., CARTER, M. E., MARKEY, B. K., CARTER, G. R. (1994). Clinical Veterinary Microbiology. Mosby-Year Book Europe Limited, Lynton House, London WC1H9LB, England. s.: 209-236.
- REINGOLD, J., STARR, N., MAURER, J., LEE, M. D. (1999). Identification of a new *Escherichia coli* She haemolysin homolog in avian *E. coli*. *Vet. Microbiol.* **66**: 125-134.
- SALVADORI, M. R., YANO, T., CARVALHO, H. F., PARREIRA, V. R., GYLES, C. L. (2001). Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **45**: 43-51.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, W. (2002). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed.), Cold Spring Harbor Press, New York, NY (2002).
- SANCHEZ, C. V., MCDONALD, J. S., PACKER, R. A. (1984). Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from cows with acute mastitis. *Am. J. Vet. Res.* **45**: 1775-1777.
- SCHMIDT, H., SCHEEF, J., MORABITO, S., CAPRIOLI, A., WIELER, L. H., KARCH, H. (2000). A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1205-1208.

- SINGER, R. S., JEFFREY, J. S., CARPENTER, T. E., COOKE, C. L., ATWILL, E. R., JOHNSON, W. O., HIRSH, D. C. (2000). Persistence of cellulitis-associated *Escherichia coli* DNA fingerprints in successive broiler chicken flocks. *Vet. Microbiol.* **75**: 59-71.
- SINGER, R. S., JEFFREY, J. S., CARPENTER, T. E., COOKE, C. L., CHIN, R. P., ATWILL, E. R., HIRSH, D. C. (1999). Spatial heterogeneity of *Escherichia coli* DNA fingerprints isolated from cellulitis lesions in chickens. *Avian Dis.* **43**: 756-762.
- SMITH, J. L., FRATOMICO, P. M., GUNTHER, N. W. (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog. Dis.* **4**: 134-163.
- STAVRIC, S., BUCHANAN, B., GLEESON, T. M. (1993). Intestinal colonization of young chicks with *Escherichia coli* O157:H7 and other verotoxin-producing serotypes. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 557-563.
- STUART, S. T., GRENWOD, K. T., LUKE, R. K. J. (1980). Hydroxamate-mediated transport of iron controlled by Col V plasmid. *J. Bacteriol.* **143**: 35-42.
- SUWANICHKUL, A., PANIGRAHY, B. (1986). Biological and immunological characterization of pili of *Escherichia coli* serotypes O1, O2 and O78 pathogenic to poultry. *Avian Dis.* **30**: 781-787.
- TRUSCOTT, R. B. (1973); Studies on the chicken-lethal toxin of *Escherichia coli*. *Can. J. Comp. Med.* **38**: 160-167.
- TSUJI, T., JOYA, J. E., HONDA, T., MIWATANI, T. (1990). A heat-labile enterotoxin (LT) purified from chicken enterotoxigenic *Escherichia coli* is identical to porcine LT. *FEMS Microbiol. Lett.* **55**: 329-161.
- VAN DEN BOGAARD, A. E., LONDON, N., DRIESSEN, C., STOBBERINGH, E. E. (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**: 763-771.
- VAN DEN BOSCH, J. F., HENDRIKS, J. H. I. M., GLADIGAU, I., WILLEMS, H. M. C., STORM, P. K., DE GRAFF, F. K. (1993). Identification of F11 fimbriae in chicken *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* **61**: 800-806.
- VIDOTTO, M. C., MÜLLER, E. E., DE FREITAS, J. C., ALFIERI, A. A., GUIMARÃES, I. G., SANTOS, D. S. (1990). Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **34**: 531-538.
- VIDOTTO, M. C., NAVARRO, H. R., GAZIRI, L. C. J. (1997). Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* **59**: 79-87.
- WHITE, D. G., DHO-MOULIN, M., WILSON, R. A., WHITTAM, T. S. (1993): Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. *Microbiol. Pathog.* **14**: 399-409.

- WINN, W., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G. (2006). The Enterobacteriaceae. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins s.: 211-308.
- WOOLEY, R. E., GIBBS, P. S., BROWN, T. P., MAURER, J. J. (2000). Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* isolates. *Avian Dis.* **44**: 318- 324.
- WOOLEY, R. E., SPEARS, K. R., BROWN, J., NOLAN, L. K., FLETCHER, O. J. (1992). Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **36**: 679-684.
- YAMAMOTO, S., TERAJ, A., YURI, K., KURAZONO, H., TAKEDA, Y., YOSHIDA, O. (1995). Detection of Urovirulence Factors in *Escherichia coli* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **12**: 85-90.
- YOGARATNAM, V. (1995). Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant. *Vet. Rec.* **137**: 215-217.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : ZAFER
Soyadı : CANTEKİN
Doğum yeri ve tarihi : KAYSERİ, 1979
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Evli
Askerlik durumu : YAPMADI
İletişim adresi ve telefonu : zcantekin@hotmail.com, 0 535 3945843

II- Eğitimi

1996-2001 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
1990-1996 Karapınar Lisesi
1987-1990 Amil Önal İlkokulu
1985-1987 Necati Bey İlkokulu

Yabancı dili : İngilizce

III- Ünvanları

2001- Veteriner Hekim
2001-Araştırma Görevlisi

IV- Mesleki Deneyimi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar:

1. ERGUN, Y., ASLANTAS, O., DOGRUER, G., CANTEKİN, Z. (2004). Hatay ilindeki aile tipi süt sığırcılığı işletmelerinde subklinik mastitislerin epidemiyolojisi. *Veteriner Bilimleri Dergisi* 20 (4): 25-28.
2. ASLANTAS, O., ERDOGAN, S., CANTEKİN, Z., GULACTI, I., EVRENDİLEK, G.A . (2006). Isolation and characterization of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 from Turkish cattle. *International Journal of Food Microbiology* 106 (3): 338-342.
3. AKAN, M., ÖNCEL, T., SAREYYUPOĞLU, B., HAZİROĞLU, R., TEL, O.Y., CANTEKİN, Z. (2006). Vaccination studies of lambs against experimental Mannheimia (Pasteurella) haemolytica infection. *Small Ruminant Research* 65 (1-2): 44-50.
4. SEHU, A., ERGÜN, L. , ÇAKIR, S., ERGÜN, E., CANTEKİN, Z., SAHİN, T., ESSİZ, D., SAREYYÜPOĞLU, B., GÜREL, Y., YİĞİT, Y. (2007). Hydrated sodium calcium aluminosilicate for reduction of aflatoxin in quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 114 (4): 144–151.
5. ONBASILAR, E. E., EROL, H., CANTEKİN, Z., KAYA, U. (2007). Influence of intermittent lighting on broiler performance, incidence of tibial dyschondroplasia, tonic immobility, some blood parameters and antibody production. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 20 (4): 550-555.
6. SAREYYUPOĞLU, B., CANTEKİN, Z., BAS, B. (2007). Chlamydomphila psittaci DNA detection in the faeces of cage birds. *Zoonoses and Public Health* 54 (6/7) : 237-242.
7. ASLANTAS, O., DEMİR, C., TURUTOĞLU, H., CANTEKİN, Z., ERGUN, Y., DOGRUER, G. (2007). Coagulase gene polymorphism of Staphylococcus aureus isolated from subclinical bovine mastitis. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* 31 (4) : 253-257.
8. SAREYYÜPOĞLU, B., OK, A.Ç., CANTEKİN, Z., YARDIMCI, H., AKAN, M., AKÇAY, A. (2008). Polymerase chain reaction detection of Salmonella spp. in fecal samples of pet birds. *Avian Diseases*, 58, (Baskıda).
9. AKAN, M., SAREYYÜPOĞLU, B., ÖNCEL, T., TEL, O.Y., İLHAN, Z., CANTEKİN, Z. (2008). Isolation of Clostridium sordellii from abomasum lesions of lambs in Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 55. (Baskıda).
10. SAREYYÜPOĞLU, B., CANTEKİN, Z. (2009). “Use of a multiplex-polymerase chain reaction for detection of Salmonella and Chlamydomphila psittaci from caged birds”. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 56(1). (Baskıda).

Posterler:

1. AKAN, M., ÖNCEL, T., SAREYYÜPOĞLU, B., HAZIROĞLU, R., TEL, O. Y., **CANTEKİN, Z.** (2004). Vaccination studies of lambs against experimental Mannheimia (Pasteurella) haemolytica infection. 669 (2214). 23. Dünya Buiatri Kongresi. 11-16 Temmuz 2004 QUEBEC/KANADA.
2. AKAN, M., ÖNCEL, T., SAREYYÜPOĞLU, B., HAZIROĞLU, R., TEL, O. Y., **CANTEKİN, Z.** (2004). Kuzularda deneysel Pasteurella (Mannheimia) haemolitica infeksiyonuna karşı aşılama çalışmaları. VI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 14-16 EYLÜL 2004 ELAZIĞ/TÜRKİYE.
3. AKAN, M., TEL, O.Y., ICA, T., SAREYYUPOGLU, B., **CANTEKİN, Z.**, CİFTÇİ, A. (2005). Serodiagnosis of avian pneumovirus infections in chickens by ELISA; D30-550. 14. Dünya Veteriner Tavukçuluk Kongresi. 22-26 AĞUSTOS 2005 İSTANBUL/TÜRKİYE.
4. SAREYYUPOGLU, B., AKAN, M., **CANTEKİN, Z.** (2005). Detection of salmonellae dna in feed samples by pcr following selective enrichment. D50-559. 14. Dünya Veteriner Tavukçuluk Kongresi. 22-26 AĞUSTOS 2005 İSTANBUL/TÜRKİYE.
5. SAREYYUPOGLU, B., CELİK, A., **CANTEKİN, Z.**, YARDİMCİ, H., AKAN, M. (2005). Detection of salmonella dna in fecal samples of caged birds in Ankara by PCR. 14. Dünya Veteriner Tavukçuluk Kongresi. 22-26 AĞUSTOS 2005 İSTANBUL/TÜRKİYE.
6. AKAN, M., SAREYYÜPOĞLU, B., ÖNCEL, T., TEL, O. Y., İLHAN, Z., **CANTEKİN, Z.** (2006). Türkiyede koyunlarda abomasum lezyonlarından Clostridium sordellii izolasyonu. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 26-28 EYLÜL 2006 SİDE-ANTALYA/TÜRKİYE.
7. AKAN, M., SAREYYÜPOĞLU, B., ÖNCEL, T., TEL, O. Y., İLHAN, Z. ve **CANTEKİN, Z.** (2006). "Isolation and PCR detection of *Clostridium sordellii* from sheep in Turkey. 24. Dünya Buiatri kongresi. 15-19 EKİM 2006 Nice/Fransa.
8. **CANTEKİN, Z.**, ÖNCEL, T., SANCAK, A.A., SAREYYÜPOĞLU, B., AKAN, M. (2006). Koyunlardan izole edilen Mannheimia haemolitica izolatlarının pcr ile teşhisi ve çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 26-28 EYLÜL 2006 SİDE-ANTALYA/TÜRKİYE.
9. **CANTEKİN, Z.**, ÇETİN, S., TEL, O. Y., ELİBOL, O., AKAN, M. (2006). Tavuklarda Newcastle Hastalığı (ND) ve İnfeksiyöz Bronşitis (İb)'e karşı içme suyu ile yapılan aşılmalarda su stabilizatörü bileşiklerinin etkisi. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 26-28 EYLÜL 2006 SİDE-ANTALYA/TÜRKİYE.
10. SAREYYÜPOĞLU, B., **CANTEKİN, Z.** (2006). Kafes kuşlarında salmonellosis ve psittacosis infeksiyonlarının moleküler teşhisi için multipleks-PCR tekniği geliştirilmesi. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 26-28 EYLÜL 2006 SİDE-ANTALYA/TÜRKİYE.
11. SAREYYÜPOĞLU, B., **CANTEKİN, Z.**, EŞSİZ, D., AKAN, M. (2006). Mastitisli sütlerden izole edilen Staphylococcus aureus izolatlarında enterotoksin genlerinin multipleks-PCR ile saptanması. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 26-28 EYLÜL 2006 SİDE-ANTALYA/TÜRKİYE.

12. SAREYYÜPOĞLU, B., **CANTEKİN, Z.**, MÜŞTAK, H. K., İZGÜR, M. (2006). Sığır serum örneklerinde brucella antikorlarının belirlenmesinde rose bengal plate test (rbpt), serum aglutinasyon test (sat), mikroaglutinasyon test (mat) ve 2-merkaptetanol-mikroaglutinasyon (2-me-mat) testlerinin karşılaştırılması. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 26-28 EYLÜL 2006 SİDE-ANTALYA/TÜRKİYE.

13. SAREYYÜPOĞLU, B., **CANTEKİN, Z.** (2007). Development of a multiplex-pcr technique for molecular identification of salmonellosis and psittacosis in caged birds. 15. Dünya Veteriner Tavukçuluk Kongresi. 10-15 EYLÜL PEKİN/ÇİN.

14. SAREYYÜPOĞLU, B., DİKER, K. S., GÜNGÖRDÜ, S., **CANTEKİN, Z.**, JAHED, R. (2007). Koyunlarda abortif bakteriyel infeksiyonların tanısı için multiplex-PCR tekniklerinin geliştirilmesi. 1. Ulusal Zoonoz Kongresi, S 25. 3-6 Aralık 2007 ERZURUM/TÜRKİYE.

15. SAREYYÜPOĞLU, B., DİKER, K. S., GÜNGÖRDÜ, S., **CANTEKİN, Z.**, JAHED, R., İLHAN, Z. (2007). Fötal mide içeriği örneklerinde atık etkenlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmesi. 1. Ulusal Zoonoz Kongresi, S 26. 3-6 Aralık 2007 ERZURUM/TÜRKİYE.

Bildiriler:

1. ASLANTAŞ, Ö., ERDOĞAN, S., BULUT, H., **CANTEKİN, Z.** (2004). Sığırlardan E. coli O157/H7 izolasyonu ve virülens genlerinin belirlenmesi. VI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 14-16 EYLÜL 2004 ELAZIĞ/TÜRKİYE.

2. ASLANTAŞ, Ö., **CANTEKİN, Z.**, SAREYYÜPOĞLU, B., AKAN, M. (2006). Sığır orijinli Escherichia coli O157 izolatlarının random amplified polymorphic dna (rapd) ve antibiyotik direnç profilleri ile karakterizasyonu. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 26-28 EYLÜL 2006 SİDE-ANTALYA/TÜRKİYE.

3. SAREYYÜPOĞLU, B., **CANTEKİN, Z.**, AKAN, M. (2006). Mastitisli inek sütlerinden izole edilen stafilokoklarda methicillin direncinin fenotipik ve genotipik olarak belirlenmesi. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 26-28 EYLÜL 2006 SİDE-ANTALYA/TÜRKİYE.

4. SAREYYÜPOĞLU, B., **CANTEKİN, Z.**, BAŞ, B. (2006). Kafes kuşlarında dışkı örneklerinde klamidy dna'larının PCR ile saptanması. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 26-28 EYLÜL 2006 SİDE-ANTALYA/TÜRKİYE.

5. **CANTEKİN, Z.**, SAREYYÜPOĞLU, B., JAHED, R. (2007). Tetracycline resistance of escherichia coli isolates from poultry with colibacillosis. 15. Dünya Veteriner Tavukçuluk Kongresi. 10-15 EYLÜL PEKİN/ÇİN.

6. SAREYYÜPOĞLU, B., **CANTEKİN, Z.**, BAŞ, B. (2007). Chlamydomphila psittaci DNA detection in the feces of caged birds. 15. Dünya Veteriner Tavukçuluk Kongresi. 10-15 EYLÜL PEKİN/ÇİN.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Seminerler:

Bakteriyofajların bakteriyel virülense etkileri.
E. coli'de virülens genleri regülasyonu.

Yer Aldığı Projeler

Proje Yürütücülüğü

1. Kanatlı orijinli *Escherichia coli* suşlarının virülens özelliklerinin fenotipik ve moleküler metotlarla belirlenmesi. BİYEP 2005K-120140-6.

Yardımcı Araştırmacı

1. Bildircinlarda oluşturulan aflatoksikozis üzerine çeşitli toksin bağlayıcılarının etkileri. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. 20020810048.
2. Tavuklarda solunum sistemi infeksiyonlarının epidemiyoloji. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. 2004K120920.
3. Mastitisli Sütlerden İzole Edilen Bakterilerin Virulens Faktörlerinin Konvansiyel ve Moleküler Yöntemlerle Saptanması. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. 20050810073.
4. Sığır mastitislerinden izole edilen Stafilokok suşlarının virülens faktörlerinin genetik analizi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü.2003-98.
5. İnaktif Bira Mayası (*Saccharomyces carlsbengensis*)'nın Kanatlı Rasyonlarında Kullanılması Olanaklarının Araştırılması. TOVAG. 105O198

VIII- Diğer Bilgiler