

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ
DOKTORA PROGRAMI

**KOLİBASİLLOZİSLİ BROYLERLERDEN AŞILAMA
ÖNCESİ VE SONRASINDA ELDE EDİLEN
KANATLI PATOJENİK *ESCHERİCHİA COLİ*
İZOLATLARININ FİLOGENETİK
KARAKTERİZASYONUNUN İNCELENMESİ**

ERDEM SUR
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-22011 proje numarası ile desteklenmiştir. Erdem SUR bu doktora tezini 100/2000 YÖK Doktora Bursiyeri olarak tamamlamıştır.

AYDIN-2025

TEŞEKKÜR

Doktora tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın yürütülmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen, beni daima yüreklendiren tez danışmanım Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm değerli öğretim üyelerine ve örneklerin toplanması için bana olanak sağlayan Uzm. Biyolog Nurullah SAYIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince manevi varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim ve eğitim hayatımı daima destekleyen babam Ahmet SUR ve annem Dilek SUR ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanatlı Patojenik <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1. Patojenik <i>E. coli</i> 'nin Sınıflandırılması.....	4
2.1.2. Patogenez.....	6
2.1.3. <i>E. coli</i> Serotiplerinin Yaygınlığı.....	6
2.1.4. <i>E. coli</i> 'nin Filogenetik Sınıflandırması	7
2.1.5. Virulans Faktörleri.....	8
2.1.5.1. Adezinler	8
2.1.5.2. İnvazinler	9
2.1.5.3. Demir Kazanım Sistemleri	9
2.1.5.4. Protektinler	9
2.1.5.5. Toksinler.....	10
2.1.5.6. Quorum Sensing Sistemi.....	11

2.1.5.7. Sekresyon Sistemleri.....	11
2.1.5.8. İki Bileşenli Sistemler	12
2.1.5.9. Transkripsiyonel Düzenleyiciler	12
2.1.6. Zoonotik Potansiyel.....	14
2.1.7. Önleme ve Kontrol	14
2.1.7.1. Yönetim ve Biyogüvenlik Önlemleri	15
2.1.7.2. Antibiyotiklerin Kullanımı ve Direnç Sorunları.....	15
2.1.7.3. Aşılar	17
2.1.7.3.1. Poulvac® <i>E. coli</i> Aşısı.....	18
2.1.7. 4. Probiyotikler	19
2.1.7.5. Bakteriyofajlar	21
2.1.7.6. Yeni Alternatif Yaklaşımlar.....	22
2.1.8. Sorunlar ve Öneriler.....	22
2.1.9. Sonuçlar ve Gelecek Perspektifleri.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1.GEREÇ.....	25
3.1.1. Cihazlar.....	25
3.1.2. Materyal.....	25
3.1.3. Referans Suşlar	26
3.1.4. Besiyerleri.....	26
3.1.4.1. Eosin Methylene Blue Agar	26
3.1.4.2. MacConkey Agar.....	26
3.1.4.3. Kanlı Agar	27
3.1.4.4. Nutrient Agar.....	27
3.1.4.5. Nutient Broth ...	27
3.1.4.6. Brain Heart Infusion Broth ...	27

3.1.5. Ayraç ve Boyalar	28
3.1.5.1. Gram Boyama	28
3.1.5.4. Oksidaz Test Kiti.....	28
3.1.5.3. Hidrojen Peroksit.....	28
3.1.5.4. Kovaks Ayırıcı	29
3.1.6. Antibiyotik Duyarlılık Testi	29
3.1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	29
3.1.7.1. Solüsyon ve Boyalar	29
3.1.7.1.1. Tris, borik asit, EDTA buffer	29
3.1.7.1.2. Yükleme tamponu	30
3.1.7.2. 5x FirePol® Master Miks	30
3.1.7.3. Primerler.....	31
3.1.7.4. Agaroz Jel.....	32
3.1.7.5.Marker.....	32
3.1.7.6. Elektroforez	32
3.1.7.7. Görüntüleme ve Değerlendirme	32
3.2. Yöntem	33
3.2.1. İzolatların Saflaştırılması ve Saklanması	33
3.2.2. İdentifikasyon ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri	33
3.2.3. DNA Ekstraksiyonu.....	34
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	35
3.2.5. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR	37
4.1. İdentifikasyon	37
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi	38
4.2. 1. Çoklu Antibiyotik Direnci	41

4.3. Filotiplendirme	42
4.4. İstatistiksel Analiz	44
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR.....	54
EKLER	62
Ek 1. (ADÜ-HADYEK).....	62
BİLİMSEL ETİK BEYANI	63
ÖZ GEÇMİŞ.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>aatA, upaB, aatB:</i>	Oto taşıyıcı adezin genleri
<i>ace4/35:</i>	Asetilkolinesteraz
<i>afaIBC, bmaE, csl, csg, ecpR, fdeC, fdtA, fela:</i>	F1C fimbria
AIEC:	Adherent invaziv <i>E. coli</i>
APEC:	Avian patojenik <i>Escherichia coli</i>
<i>astA:</i>	Isıya dayanıklı enterotoksin
<i>betA:</i>	Kolin dehidrogenaz
<i>cdtB, cdtS:</i>	Sitolotal distandiren faktör
<i>chuA:</i>	Dış membran hemin reseptörü
<i>cpxA:</i>	Zarf stres yanıt sistemi
<i>cpxR, clpV:</i>	ATPaz
DAEC:	Diffuz Adherent <i>E. coli</i>
<i>dotU:</i>	Organel taşınma proteini
EAEC:	Enteroagregatif <i>E. coli</i>
EHEC:	Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EIEC:	Enteroinvaziv <i>E. coli</i>
EPEC:	Enteropatogenik <i>E. coli</i>
<i>espC:</i>	Serin proteaz
ETEC:	Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
ExPEC:	Ekstraintestinal patojenik <i>E. coli</i>
<i>fimC, fimH:</i>	Tip 1 fimbria
<i>hcp :</i>	Hemoliz düzenleyici protein),
<i>hlyF, hlyA, hlyE:</i>	Putatif avian hemolizin

<i>hra/hrlA/hek:</i>	Isıya dayanıklı aglütinin
IPEC :	İnterstinal patojenik <i>E. coli</i>
<i>icmF:</i>	Hücre içi çoğalma faktörü)
<i>iha:</i>	<i>IrgA</i> homolog adezin
<i>iroBCDEN:</i>	Salmochelin
<i>iss:</i>	Serumda hayatta kalma
<i>iucCD:</i>	Demir alım şelat sentetaz genleri C ve D
<i>iutA:</i>	Demir alım taşıyıcı proteini A
<i>kfiC-K5 :</i>	Glikozil transferaz
<i>kpsMT (III) :</i>	Kapsül
<i>lpfA :</i>	Uzun polar fimbria
LPS:	Lipopolisakkarit
<i>lpxM:</i>	Miristoil transferaz
<i>LuxS, Pfs:</i>	Aktif metil döngüsü yolu
<i>neuC, neuS, neuD:</i>	Kapsül genleri
NMEC :	Neonatal Meningitis <i>E. coli</i>
<i>ompA :</i>	Dış membran proteini A
<i>ompT :</i>	Dış membran proteaz T
<i>papA, papEF, papGII, papGIII :</i>	P-pilus adhezinleri
<i>pic:</i>	Serin proteaz oto-transporter
<i>ptsI:</i>	Fosfotransferaz sistemi
QS :	Çoğunluğu algılama
ROS :	APEC'i reaktif oksijen türleri
<i>sat:</i>	Sekrete edilen oto-transporter toksin
SePEC:	Sepsisle ilişkili <i>E. coli</i>
<i>sodA:</i>	Süperoksit dismutaz

SNP:	Tek nükleotid polimorfizmi
STEC:	Shigatoksin üreten <i>E. coli</i>
<i>stx2f</i>:	Shiga toksini varyantı
TCS:	İki-bileşenli sistemler
<i>traT</i>:	Kompleman direnci proteini
UPEC:	Üropatogenik <i>E. coli</i>
<i>vat</i>:	Vakuolize edici oto-transporter toksin
<i>vrgG</i>:	Ekstraselüler protein



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Patojenik <i>E. coli</i> 'nin sınıflandırılması.....	5
Şekil 2. <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotiklere karşı direçlilik durumları.....	40
Şekil 3. Aşı öncesi ve sonrası çoklu antibiyotik direnç durumları.....	42
Şekil 4. Aşılama öncesi ve aşılama sonrası çiftliklerdeki filotip sayıları	43



RESİMLER DİZİNİ

- Resim 1.** *E. coli* izolatlarının biyokimyasal testleri 37
- Resim 2.** *E. coli* izolatlarının yeni Clermont filotipleme yöntemine göre filotip profilleri 44



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>E. coli</i> filotiplerinin en önemli özellikleri	7
Tablo 2. <i>E. coli</i> 'nin virulans faktörleri, ilgili genler ve bu faktörlerin işlevleri	13
Tablo 3. Çalışmada kullanılan primerler	31
Tablo 4. Mastermiksın hazırlanma oranları	36
Tablo 5. <i>E. coli</i> izolatlarının biyokimyasal test sonuçları.....	38
Tablo 6. İzolatların antibiyotik duyarlılık test sonuçları.....	39
Tablo 7. Aşı öncesi ve sonrası çoklu antibiyotik direnç durumlarının karşılaştırması.....	41
Tablo 8. Aşılama öncesi ve sonrası filogenetik dağılım.....	43
Tablo 9. Filotip dağılımlarının istatistiksel analizi	45

ÖZET

KOLİBASİLLOZİSLİ BROYLERLERDEN AŞILAMA ÖNCESİ VE SONRASINDA ELDE EDİLEN KANATLI PATOJENİK *ESCHERİCHIA COLI* İZOLATLARININ FİLOGENETİK KARAKTERİZASYONUN İNCELENMESİ

Sur E. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Mikrobiyolojisi Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2025.

Amaç: Ticari zayıflatılmış canlı *Escherichia coli* aşısı ile aşılanan broiler sürülerinden elde edilen kanatlı patojenik *E. coli* (APEC) izolatlarının filogenetik gruplarındaki değişiklikleri, aşının filogenetik çeşitlilik üzerindeki etkilerini ve broylerlerin yaşamlarının erken ve geç dönemlerinde elde edilen APEC izolatlarının antibiyotik direnç profillerini karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmanın materyalini, 2022 yılı boyunca 15 çiftlikten, aşılama öncesinde 180 ve aşılama sonrasında 180 olmak üzere, toplam 360 *E. coli* izolatı oluşturdu. Bakteriyel identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testleri otomatize mikrobiyoloji sisteminde (BD Phoenix 100™) ve Gram-negatif identifikasyon kartı (NMIC/ID-433) kullanılarak yapıldı. İzolatların filogenetik gruplandırması *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* ve *arpA* genlerini hedef alan Clermont multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemine göre yapıldı. Filogenetik grupların aşılama öncesi ve sonrası dağılımı Ki-kare (χ^2) testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Bulgular: Aşılama öncesinde, izolatlar sırasıyla B1 (%22,8), F (%21,7), E (%21,1), C (%12,2) ve D (%8,9) gruplarında yoğunlaşmıştır. Aşılama sonrasında ise grup A (%56,7) ve B1 (%27,2) grupları baskın hale gelirken; C, D ve B2 gruplarının tamamen kaybolduğu gözlemlenmiştir. Broylerlerin yaşamlarının erken döneminde, tetrasiklin ve penisilin grubu antibiyotiklere karşı yüksek direnç oranları tespit edilirken, geç dönemlerinde tetrasiklin, penisilin, kinolon ve folat grubu antibiyotiklere karşı direnç oranlarında belirgin bir artış gözlemlenmiştir.

Sonuç: Broylerlere uygulanan ticari canlı zayıflatılmış *E. coli* aşının filogenetik grupların dağılımında dikkate değer değişikliklere neden olduğu, özellikle filogrup B1 hariç tüm filogruplarda önemli etkiye sahip olduğu belirlendi. İzolatların yaygın kullanılan antibiyotiklere karşı yüksek direnç oranlarına sahip olduğunu, ancak klinik açıdan kritik öneme sahip kolistin gibi antibiyotiklere karşı düşük direnç seviyeleri saptandı.

Anahtar kelimeler: İlaç Direnci, Kanatlı Hayvan, Aşı, *Escherichia coli*, Filogeni.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PHYLOGENETIC CHARACTERIZATION OF POULTRY PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES OBTAINED FROM COLIBACILLOSIS BROILER BEFORE AND AFTER VACCINATION

Sur E. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute Veterinary Microbiology Program, PhD Thesis, Aydın, 2025.

Objective: To compare the changes in phylogenetic groups of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolates obtained from broiler flocks vaccinated with commercial attenuated live *E. coli* vaccine, the effects of the vaccine on phylogenetic diversity, and the antibiotic resistance profiles of APEC isolates obtained at early and late stages of broiler life.

Materials and Methods: The study material consisted of a total of 360 *E. coli* isolates, 180 before vaccination and 180 after vaccination, from 15 farms throughout 2022. Bacterial identification and antibiotic susceptibility tests were performed using the Gram-negative identification card (NMIC/ID-433) in the automated microbiology system (BD Phoenix 100™). Phylogenetic grouping of the isolates was performed using the Clermont multiplex PCR method targeting the *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* and *arpA* genes. The distribution of phylogenetic groups before and after vaccination was compared statistically using the chi-square (χ^2) test.

Results: Before vaccination, isolates were concentrated in groups B1 (22.8%), F (21.7%), E (21.1%), C (12.2%) and D (8.9%), respectively. After vaccination, groups A (56.7%) and B1 (27.2%) became dominant, while groups C, D and B2 were completely lost. While high resistance rates were detected against tetracycline and penicillin group antibiotics in the early stages of broiler life, a significant increase in resistance rates against tetracycline, penicillin, quinolone and folate group antibiotics was observed in the late stages.

Conclusion: It was determined that commercial live attenuated *E. coli* vaccine applied to broilers caused remarkable changes in the distribution of phylogenetic groups, and had a significant effect especially on all phylogroups except phylogroup B1. This study showed that the isolates had high resistance rates to commonly used antibiotics, but low resistance levels were observed to clinically critical antibiotics such as colistin.

Keywords: Drug resistance, Poultry, Vaccines, *Escherichia coli*, Phylogeny.

1. GİRİŞ

Ekstraintestinal patojenik bir *Escherichia coli* (ExPEC) türü olan kanatlı patojenik *Escherichia coli* (APEC), tavuklar, hindiler, ördekler ve diğer birçok kanatlı türünde çeşitli lokal ve sistemik enfeksiyonlara yol açmaktadır (Kathayat ve diğerleri, 2021). APEC'in en sık neden olduğu enfeksiyonlar arasında perihepatit, hava kesesi yangısı, perikardit, peritonit, salpenjit, koligranüloma, omfalit, selülit, osteomiyelit ve artrit yer almakta ve bu enfeksiyonlar genellikle "kanatlı kolibasillozu" olarak adlandırılmaktadır (Khairullah ve diğerleri, 2024). Ayrıca, APEC tavuklarda şişkin kafa sendromuna, hindilerde ise osteomiyelit kompleksine neden olabilmektedir (Kathayat ve diğerleri, 2021).

Kanatlı kolibasillozu, kümes hayvanlarında %20'ye kadar ulaşabilen mortalite oranları ve önemli morbidite ile önde gelen ölüm ve hastalık nedenlerinden biridir. Bunun yanı sıra, bu enfeksiyonlar et üretiminde (canlı ağırlıkta %2 azalma, yemden yararlanma oranında %2,7 düşüş), yumurta üretiminde (%20'ye kadar azalma), kuluçka oranlarında düşüş ve kesim sırasında karkas kontaminasyonunda (%43'e kadar) artış gibi ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Panth, 2019). APEC, genetik olarak insanlarda ciddi hastalıklara yol açan ExPEC suşlarıyla benzerlik göstermekte ve yatay gen transferi yoluyla direnç genlerini insan patojenlerine aktarabilmektedir (Denamur ve diğerleri, 2021). Bu durum, gıda kaynaklı zoonotik enfeksiyonların artmasına ve halk sağlığını tehdit eden antibiyotik direncinin yayılmasına neden olmaktadır (Zhuge ve diğerleri, 2021).

E. coli, genetik yapısına göre filogenetik gruplara ayrılabilir. Clermont ve diğerleri (2000) tarafından geliştirilen ilk yöntem olan tripleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi *E. coli* suşlarını A, B1, B2 ve D gibi dört ana filogruba ayırmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarla bu sınıflandırma genişletilmiş ve toplamda 8 filogrup tanımlanmıştır: A, B1, B2, C, D, E, F ve *Escherichia* kriptik grup I (Clermont ve diğerleri, 2013). Bu gruplar arasında, B2 ve D filogrup suşları genellikle ExPEC olarak bilinir ve insanlarda üriner sistem enfeksiyonları, sepsis ve menenjit gibi ciddi hastalıklara neden olabilirler. Öte yandan, A ve B1 filogrup izolatları genellikle kommensal olarak kabul edilir ve insan bağırsak mikrobiyotasının bir parçası olarak bulunurlar; ancak bazı durumlarda bağırsak enfeksiyonlarına yol açabilirler. C, E ve F filogrup suşları ise daha az yaygın olup, patojeniteleri hakkında sınırlı bilgi

bulunmaktadır. Kriptik grup I grubuna ait izolatlar, *Escherichia* cinsinin belirlenmesi güç alt gruplarından biri olup, patojeniteleri tam olarak anlaşılmamıştır. Bu son yapılan yeni filogenetik sınıflandırma, *E. coli* izolatlarının patojenik potansiyellerini değerlendirmede önemli bir araç olarak kullanılmaktadır (Clermont ve diğerleri, 2013). Sahada tespit edilen kolibasiloz vakalarındaki APEC serotip çeşitliliği, mevcut aşılarda etkinliğini sınırlamakta ve APEC enfeksiyonlarına karşı etkili bir aşının bulunmaması, bu patojenin kontrolünü zorlaştırmaktadır. (Christensen ve diğerleri, 2021). İki ticari aşı mevcuttur: Canlı attenüe Poulvac® ve inaktif Nobilis® *E. coli* aşıları. Bu sınırlı seçeneklerin broylerde enfeksiyonların önlenmesindeki etkinliği hakkında yeterli bilgi yoktur (Kathayat ve diğerleri, 2021).

Antimikrobiyal ilaç kullanımı ExPEC enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın bir uygulamadır. Ancak bu çoklu ilaç direncine neden olmaktadır. Sefalosporinler, kinolonlar, tetrasiklinler ve trimetoprim-sülfametoksazol kanatlı çiftliklerinde sıklıkla kullanılan antibiyotikler arasında yer almakta ve bu antibiyotiklere dirençli suşların görülme sıklığını artırmaktadır. Bu durum, hem hayvan hem de insan sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Caneschi ve diğerleri, 2023). APEC izolatlarında β -laktamlar ve kolistin gibi kritik öneme sahip antibiyotiklere direnç daha önce bildirilmiştir (Osman ve diğerleri, 2018). Özellikle *mcr-1* geni, kolistin direncinin ana belirleyicisi olarak dikkat çekmekte ve dirençli suşların küresel gıda zinciri yoluyla yayılma riskini artırmaktadır (Barbieri ve diğerleri, 2017).

Filogenetik gruplandırma, APEC izolatlarının genetik özelliklerinin belirlenmesi suretiyle enfeksiyonların önlenmesi, kontrol edilmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli bir araçtır (Clermont ve diğerleri, 2013). Aşılar kolibasilozu azaltmak için kullanılırken, aşı etkinliğini anlamak için kritik öneme sahip olan APEC'in genetik çeşitliliği ve filogenetik dağılımı üzerindeki etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, ticari zayıflatılmış canlı *E. coli* aşısı uygulanan broiler sürülerinden elde edilen APEC izolatlarının filogenetik gruplarındaki değişiklikleri incelemek, aşının filogenetik çeşitlilik üzerindeki potansiyel etkilerini değerlendirmek ve broylerin yaşamlarının erken ve geç dönemlerinde elde edilen APEC izolatlarının antibiyotik direnç profillerini karşılaştırmaktır. Aşının, filogenetik gruplar arasında düşük virulanslı izolatların baskınlığını artırarak enfeksiyon şiddetini azaltabileceği öngörülmektedir. Bu çalışmadan elde edilecek bulgular, APEC enfeksiyonlarına karşı yeni aşı stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutarak, antimikrobiyal kullanımını azaltmaya ve direnç problemini kontrol altına almaya katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanatlı Patojenik *Escherichia coli*

Kanatlı patojenik *Escherichia coli* (APEC), küçük, çomak şeklinde (1-2 mm uzunluğunda ve 0.5 mm çapında), flagella veya fimbria veya piliye sahip, lipopolisakkarit (LPS) dış zarla çevrili Gram-negatif bir bakteridir ve kanatlılarda çeşitli lokal ve sistemik hastalıklara neden olabilen dışkı florasında bulunur (Migłani 2023). APEC, dünya çapında kümes hayvancılığı için ciddi bir tehdit oluşturmakta, kolibasillozis gibi enfeksiyonlara neden olmakta ve bu da büyük ekonomik kayıplara yol açabilmektedir (Li diğerleri, 2020). Bu kayıplar, azalan yumurta ve et üretimi, yüksek mortalite oranları, düşük yavru çıkım oranları, canlı ağırlık kaybı, daha düşük yem dönüşüm verimliliği, artan veteriner harcamaları ve mezbahalarda karkas reddi gibi sonuçlardan kaynaklanmaktadır (Li diğerleri, 2020). Kümes hayvancılığı sektörü, küresel gıda güvenliği için kritik öneme sahiptir ve 2021-2025 yılları arasında %4.1 oranında bir büyüme göstermesi beklenmektedir; Brezilya, ABD ve Çin'den büyük ihracatlar yapılmaktadır (Clermont diğerleri, 2019; Azam diğerleri, 2020). Aşılamalar, biyogüvenlik önlemleri ve antibiyotik kullanımı, operasyonel maliyetlerin artmasına katkı sağlamaktadır (Azam diğerleri, 2019). Kolibasillozisi tedavi etmek için antibiyotiklerin sık kullanımı, antibiyotik direnci olasılığını artırmakta ve bu da sonraki hastalık yönetimini karmaşık hale getirmektedir (Azam diğerleri, 2019).

APEC suşları, ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) grubuna ait olup, idrar yolu enfeksiyonlarına, yenidoğan menenjitine ve insanlarda sepsise neden olabilen *E. coli* suşlarıyla benzerlikler göstermektedir (Clermont diğerleri, 2019). Her yaştan insanı etkileyebilmesine rağmen, bebekler, küçük çocuklar ve hamile kadınlar, daha zayıf bağışıklık sistemleri ve kontamine olmuş gıda veya suya daha fazla maruz kalma olasılığı nedeniyle daha hassastır (Migłani, 2023). Sağlıklı yetişkinler, güçlü bağışıklık sistemleri sayesinde genellikle daha az duyarlıdır, ancak huzurevleri, hastaneler ve çocuk bakım merkezleri gibi ortamlarda salgınlar hala meydana gelebilir (Meng diğerleri, 2023). Ayrıca, APEC suşlarındaki artan antimikrobiyal direnç, halk sağlığı açısından bir endişe kaynağıdır, çünkü dirençli bakteriler, yatay gen transferi yoluyla direnç genlerini aktarabilir ve bu da insanlardaki bakteriyel enfeksiyonların

tedavisini karmaşıktırmaktadır (Lozica diğeri, 2021). Bireysel risk faktörlerinden bağımsız olarak, iyi hijyen uygulamaları ve güvenli gıda yönetimi, herkes için *E. coli* enfeksiyonu riskini azaltmada önemlidir (Lozica diğeri, 2021).

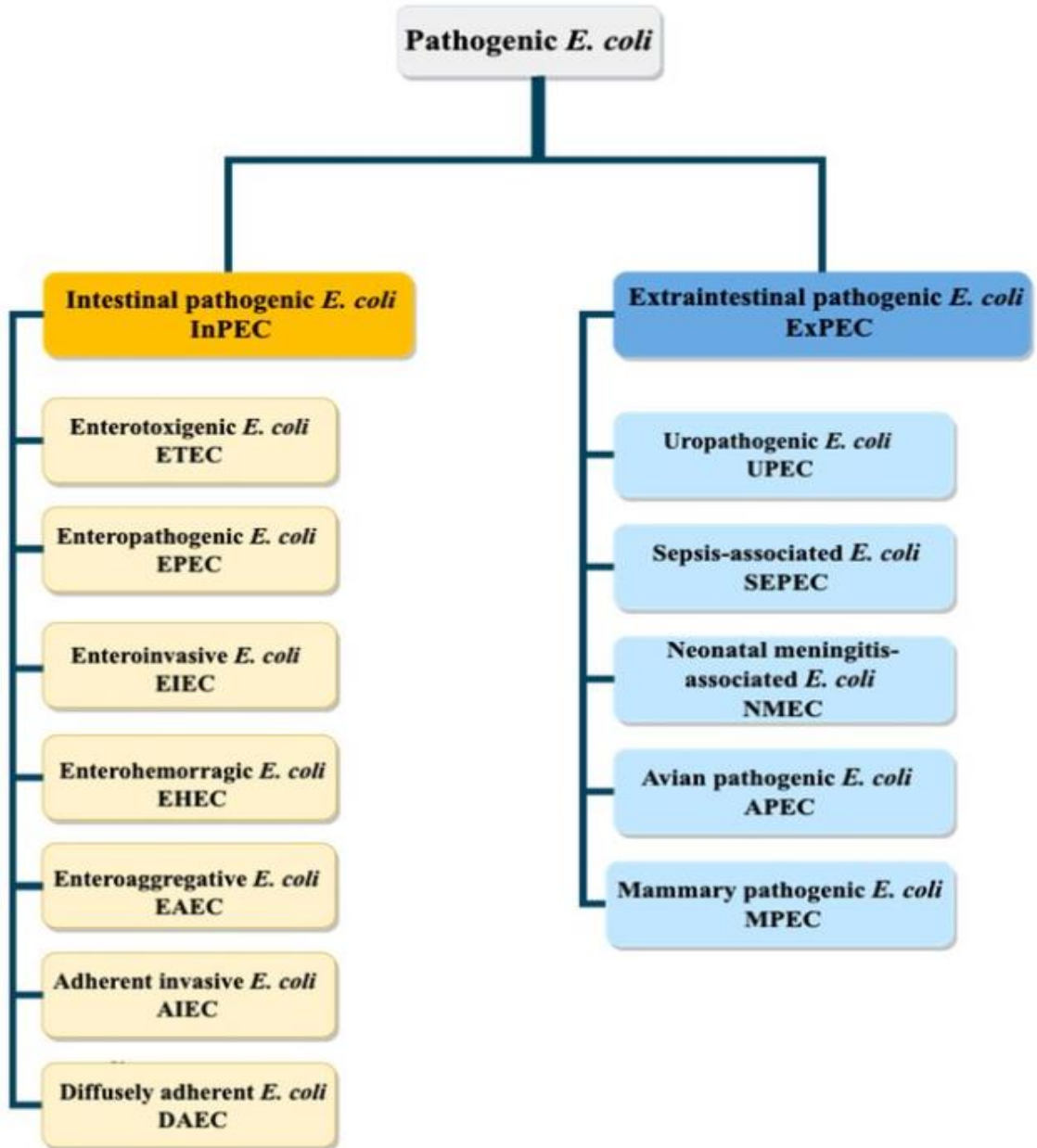
Dünyada yaygın olarak bildirilen *E. coli* serotipleri arasında O1, O2, O6, O7, O26, O45, O55, O78, O88, O121, O103, O111, O104, O114, O119, O124, O145, O157, O1:K1, O2:K1, O6:K2, O18:K1, O124, O143, O148 ve O164 bulunmaktadır. Küresel olarak, APEC prevalansı, broyler tavukları ve yumurtlayan kuşları etkileyerek, özellikle yumurta üretiminin zirveye ulaştığı 4-6 haftalık dönemde, %9.52 ile %36.73 arasında değişmektedir; ancak ABD’de, APEC, ticari sürülerin en az %30’unu etkilemektedir (Kimura diğeri, 2021). Bu hastalık, halk sağlığı ve kümes hayvancılığı endüstrisi için kritik öneme sahiptir.

APEC, kuş türlerinde kolibasillozise neden olur ve yeni araştırmalar, APEC’i olası bir gıda kaynaklı zoonotik patojen olarak ilişkilendirmiştir. Belirlenen virulans faktörlerinin yanı sıra, iki komponentli sistemler (TCS), adezinler, salgılama sistemleri (SS), invazyonlar, demir edinim sistemleri, kuorum algılama sistemleri (QS), transkripsiyonel düzenleyiciler (TR), toksinler ve metabolizma ile ilişkilendirilen genler gibi çeşitli ek bileşenler, APEC patogeneze katkıda bulunmaktadır. APEC, farklı kanatlı türlerine yayılabilir ve çeşitli yaşlardaki kanatlıları enfekte edebilir. Ancak, daha genç kuşlar, muhtemelen gelişmekte olan bağışıklık sistemlerinden dolayı, daha olgun kanatlılardan daha şiddetli hastalıklar yaşar ve aşılama, *Mycoplasma* enfeksiyonları, kötü barınma koşulları, solunum virüsleri ve diğeri ikincil enfeksiyon risk faktörleri gibi stres faktörleri, APEC’in hem primer hem de sekonder patojen olmasına yol açabilir. Bu faktörlerin anlaşılması, yeni ve etkili tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır. APEC’in zoonotik potansiyeli küçümsenmemelidir. Dahası, APEC’in neredeyse tüm antibiyotik sınıflarına, karbapenemler dahil, dirençli olduğu zaten belirtilmiştir. Birden fazla APEC serotipine karşı koruma sağlayabilen güçlü bir aşı acilen gereklidir. Alternatif tedaviler, özellikle virulans inhibitörleri, direnç kazanma olasılığını azaltan özel bir yöntem sağlayabilir (Nawaz ve diğeri, 2024).

2.1.1. Patojenik *E. coli*’nin Sınıflandırılması

Patojenik *E. coli*, iki alt sınıflandırmaya ayrılmıştır: İntestinal patojenik *E. coli* (IPEC)

ve Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) (Kimura diğerleri, 2021). IPEC, sekiz türe sahiptir: Adherent invaziv *E. coli* (AIEC), Diffuz Adherent *E. coli* (DAEC), Enteroagregatif *E. coli* (EAEC), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), Enteropatogenik *E. coli* (EPEC), Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) ve Shigatoksin üreten *E. coli* (STEC). Buna karşılık, ExPEC dört türe sahiptir: Avian patojenik *E. coli* (APEC), Neonatal Meningitis *E. coli* (NMEC), Sepsisle ilişkili *E. coli* (SePEC) ve Üropatogenik *E. coli* (UPEC) (Nawaz ve diğerleri, 2024).



Şekil 1. Patojenik *E. coli*'nin sınıflandırılması (Ezzeroug Ezzraimi ve diğerleri, 2022).

2.1.2. Patogenez

APEC, genellikle solunum yolu ile kanatlıları enfekte eder, ancak oral, nazal veya kloakal yollarla da girebilir. Tipik olarak, gastrointestinal, solunum ve üreme sistemlerinin mukozal bölgelerinde hastalık oluşturmada kolonize olur. Ancak, birincil patojen olarak veya diğer hastalıklar ve çevresel streslerin sonucunda sistemik enfeksiyonlara yol açabilir (Clermont diğerleri, 2019; Lozica diğerleri, 2021). Bulaşma, feko-oral ya da aerosollerle gerçekleşir ve enfekte yem ve su, bakterinin yayılmasına neden olabilir. APEC ayrıca patojenik yumurtalar aracılığıyla dikey olarak da iletilebilir (Azam diğerleri, 2020).

İlk enfeksiyon, akciğerlerde ve hava keselerinde meydana gelir; solunum yolu, kan dolaşımına girişte önemli bir yol noktasıdır. Üst solunum yolu enfeksiyonu, APEC'in konakçının bağışıklık sisteminden kaçmasını sağlar (Lozica diğerleri, 2021). Solunum yolu kolonizasyonu, APEC'in virulansı için kritik öneme sahiptir ve adhesinler, artırılmış serumda hayatta kalma genleri, demir alım sistemi, hemolizin, toksin, invazyonla ilişkili proteinler ve CS +2 alt sistemi gibi çeşitli virulans faktörleri tarafından kolaylaştırılır (Denamur diğerleri, 2021). Akciğerlere girdikten sonra, APEC, mukozal tabakalar aracılığıyla çeşitli organlara yayılır, bu da sistemik enfeksiyonlara, sepsisemiye ve organ hasarına yol açar.

2.1.3. *E. coli* Serotiplerinin Yaygınlığı

ExPEC arasında, birçok APEC izolatı O1, O2, (Barbieri diğerleri, 2017) O18 veya O78 serotiplerine sahiptir (Li diğerleri, 2020). APEC enfeksiyonlarının %80'inden fazlası O1, O2 ve O78 serotipleri tarafından oluşturulmaktadır (Nawaz ve diğerleri, 2024). O145 serotipi, son zamanlarda Çin'de ciddi hastalıklar ve insan salgınları ile sıkça ilişkilendirilmesi nedeniyle önem kazanmıştır. Bu serotip, STEC ailesinin önemli bir üyesi olup, ruminantlarda ve insanlarda enfeksiyonlarla bağlantılı olan yaygın bir O157 olmayan serotiptir. Alan salgınlarında, O9, O78 ve O145 gibi APEC serotipleri dünya çapında dikkatle yaygındır (Nawaz ve diğerleri, 2024).

2.1.4. *E. coli*'nin Filogenetik Sınıflandırması

E. coli'nin filogenetik sınıflandırması, genomik analizler ve belirli genetik işaretçiler kullanılarak yapılmaktadır (Clermont ve diğerleri, 2019). Clermont şemasına göre, APEC sekiz filogenetik gruba ayrılmaktadır: A, B1, B2, C, D, E, F ve grup I (Clermont ve diğerleri, 2013). Bu sınıflandırma, *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2 ve *arpA* gibi dört spesifik gen kullanılarak gerçekleştirilir. C grubu, komensal bakterilerle ilişkilidir ve özellikle yumurta kesesi enfeksiyonları ve septisemiye yol açan APEC izolatları A ve B1 gruplarına aittir (Clermont ve diğerleri, 2013). D, E, F grupları ve grup I'ye ait suşlar ise, insanlarda ve hayvanlarda ekstraintestinal enfeksiyonlarla ilişkilidir (Kathayat ve diğerleri, 2021). Bu suşların, insan veya hayvan konaklarında köken alarak, kuş hastalıkları oluşturacak şekilde adapte oldukları düşünülmektedir (Clermont ve diğerleri, 2019).

E. coli filotipleri, genetik çeşitliliklerine ve patojenite özelliklerine göre sınıflandırılır. Virulans seviyesi, patojenik özellikler ve bulunduğu yerler, suşların genetik yapısı ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Clermont diğerleri, 2013; Clermont diğerleri, 2019). Her filotipin virulans seviyesi, patojenik özellikleri ve bulunduğu yerler farklılık gösterir. *E. coli* filotiplerinin özellikleri Tablo 1.'de özetlenmiştir:

Tablo 1. *E. coli* filotiplerinin en önemli özellikleri.

Filotip	Virulans	Patojenik Özellikler	Bulunduğu yerler
A	Düşük	Genellikle kommensal bakteriler, Bağırsak florasının normal üyesi	İnsan ve hayvan bağırsakları
B1	Düşük	Çoğunlukla kommensal, bazı suşlar patojenik olabilir.	İnsan ve hayvan bağırsakları, çevresel kaynaklar
B2	Yüksek	Ekstraintestinal patojenik <i>E. coli</i> , üriner sistem enfeksiyonları, neonatal menenjit	İnsan ve hayvan bağırsakları, üriner sistem
C	Orta	Patojenik potansiyel taşıyan suşlar, bazı suşlar üriner sistem enfeksiyonlarına neden olabilir	İnsan ve hayvan bağırsakları
D	Orta	Ekstraintestinal enfeksiyonlar, üriner sistem enfeksiyonları, sepsis.	İnsan ve hayvan bağırsakları, üriner sistem
E	Orta	Potansiyel patojen, bazı suşlar ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olabilir	İnsan ve hayvan bağırsakları
F	Orta	Ekstraintestinal enfeksiyonlar, üriner sistem enfeksiyonları	İnsan ve hayvan bağırsakları, üriner sistem
Clade I	Düşük	Genellikle kommensal, patojenik potansiyeli düşük	Çevresel kaynaklar, hayvan bağırsakları

Özetle, *E. coli* filotipleri arasında özellikle B2 grubunun yüksek patojenite potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Diğer filotipler genellikle düşük ila orta düzeyde patojenite gösterir (Nawaz ve diğerleri, 2024). *E. coli* filogrup F ile ilgili literatürdeki bilgiler sınırlıdır, ancak mevcut veriler, bu filogrubun genellikle düşük sıklıkla izole edildiğini ve belirli virulans faktörleri taşıyabildiğini göstermektedir. Virulansı, izolatın genetik yapısına ve sahip olduğu virulans genlerine bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bazı çalışmalarda, filogrup F'nin bağırsak enfeksiyonlarında veya ekstraintestinal enfeksiyonlarda rol oynayabileceği, ancak bunun diğer patojenik filogruplara (örneğin, B2 ve D) kıyasla daha az belirgin olduğu bildirilmiştir. F filotipi B1'den daha tehlikeli olarak değerlendirilebilir, ancak B2 ve D gibi yüksek virulansa sahip filotiplere kıyasla daha düşük patojeniteye sahiptir (Nadalian ve diğerleri, 2022).

2.1.5. Virulans Faktörleri

APEC suşları, kanatlı hayvanlarda kolonizasyon ve enfeksiyon oluşturmalarını sağlayan birçok virulans ve patogeneze faktörü geliştirmiştir. Bu faktörler arasında adezinler, salgı sistemleri, transkripsiyonel düzenleyiciler, demir alım sistemleri, metabolizmayla ilişkili genler, kapsüller, çoğunluğu algılama (QS) sistemi, toksinler, bağışıklık kaçış mekanizmaları ve iki bileşenli sistemler bulunmaktadır (Awad diğerleri, 2020). APEC'in virulans faktörleri, konak hücrelere tutunma, doku invazyonu, bağışıklık kaçışı ve toksin salgılama gibi patojenik süreçleri düzenleyerek geniş bir yelpazede klinik semptomlara yol açar. Bu faktörlerin hedef alınması, daha etkili tedavi ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilir.

2.1.5.1. Adezinler

Adezinler, bakterilerin yüzeyinde bulunan ve konak hücrelere veya yüzeylere tutunmalarını sağlayan temel proteinlerdir (Wang diğerleri, 2017). APEC'te adezyon, özellikle S fimbria, tip 1 fimbria ve P fimbria ile gerçekleştirilir (Kabiswa diğerleri, 2018; Lozica diğerleri, 2021). Bu süreçte rol oynayan genler şunlardır:

Oto taşıyıcı adezin genleri: *aatA*, *upaB*, *aatB* (Thomrongsuwannakij diğerleri, 2020)

Fimbria genleri: *afaIBC*, *bmaE*, *crl*, *csg*, *ecpR*, *fdeC*, *fdtA*, *felA* (F1C fimbria), *fimC*, *fimH* (tip 1 fimbria), *hrrA/hrrA/hek* (ısıya dayanıklı aglütinin), *iha* (*IrgA* homolog adezin), *lpfA* (uzun polar fimbria), *papA*, *papEF*, *papGII* ve *papGIII* (P-pilus adhezinleri). Bu adezinler, hem kanatlı hem de insan hücre hatlarına tutunmayı düzenler (Chatterjee diğerleri, 2020).

2.1.5.2. İnvazinler

İnvaziv faktörler, enfeksiyonun erken evrelerinde patojenlerin konak hücrelerine girişini, invazyonunu ve adezyonunu kolaylaştırır (Delannoy diğerleri, 2021).

2.1.5.3. Demir Kazanım Sistemleri

Demir, APEC dahil birçok bakteri için metabolik süreçlerde kritik bir elementtir, ancak konak ortamında genellikle sınırlıdır. APEC, demir elde etmek için siderofor adı verilen yüksek afiniteli küçük molekülleri salgılar ve bunları bakteriyel hücrelere alır (Kathayat diğerleri, 2021).

APEC'in kullandığı sideroforlar ve ilgili genler şunlardır: Sideroforlar: yersiniabaktin, aerobaktin, salmochelin, Genler: *chuA* (dış membran hemin reseptörü), *iroBCDEN* (salmochelin), *iucCD* (demir alım şelat sentetaz genleri C ve D), *iutA* (demir alım taşıyıcı proteini A) (Alber diğerleri, 2021). Bu sistemler sadece demir alımını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda diğer virulans genlerinin ifadesini, kolonizasyonu ve çevresel streslere toleransı artırır (Barbieri diğerleri, 2017).

2.1.5.4. Protektinler

Protektinler, LPS, bakteriyel kapsüller, dış membran proteinleri ve makrofaj fagositik kaçış mekanizmaları gibi bileşenleri içerir. Bu faktörler, bakteriyel hücreleri konak bağışıklık

sisteminden korur ve APEC adezyonunu (Delannoy diğerleri, 2021), invazyonunu, hücre içi hayatta kalmasını, kolonizasyonunu ve çoğalmasını kolaylaştırır (Chatterjee diğerleri, 2020).

APEC'deki çeşitli genler protektin üretimini kodlamaktadır:

betA (kolin dehidrogenaz),

iss (serumda hayatta kalma),

kfiC-K5 (glikozil transferaz),

kpsMT(III) (kapsül) (Nielsen diğerleri, 2020),

neuC, *neuS*, *neuD* (kapsül genleri) (Xu diğerleri, 2013),

ompT (dış membran proteaz),

OmpA (dış membran proteini),

traT (kompleman direnci proteini) (Barbieri diğerleri, 2017; Wang diğerleri, 2017).

Ek olarak, *lpxM* (miristoil transferaz) lipid A üretiminde rol oynarken, *sodA* (süperoksit dismutaz), APEC'i reaktif oksijen türleri (ROS) aracılığıyla oluşan savunma mekanizmalarına karşı korur ve biyofilm oluşumunu destekler. Bu protektinler, APEC'in konağın bağışıklık savunmasını aşmasına ve enfeksiyonu etkin bir şekilde oluşturmaya yardımcı olur (Xu diğerleri, 2019).

2.1.5.5. Toksinler

Toksinler, bakterilerin dokuya girişini ve hasarını sağlayan biyolojik maddelerdir (Nhung diğerleri, 2017; Azam diğerleri, 2020). APEC'te birçok toksin aşağıdaki genler tarafından kodlanmaktadır:

ace4/35 (asetilkolinesteraz),

astA (ısıya dayanıklı enterotoksin),

cdtB ve *cdtS* (sitolotal distandiren faktör),

espC (serin proteaz),

hlyF, *hlyA*, *hlyE* (putatif avian hemolizin) (Pourhassan diğerleri, 2023),

pic (serin proteaz oto-transporter),

sat (sekrete edilen oto-transporter toksin),

stx2f (Shiga toksini varyantı) ve

vat (vakuolize edici oto-transporter toksin) (Xu diğerleri, 2019; Thomrongsuwannakij diğerleri, 2020).

Bu toksinler, doku invazyonu, zarar, motilite, kolonizasyon, aglütinasyon, vakuolizasyonun indüksiyonu, biyofilm oluşumu ve dış membran veziküllerinin üretimini kolaylaştırır. Bu çok yönlü mekanizmalar, APEC'in enfeksiyonları oluşturmasını ve konak savunmalarından kaçmasını sağlar (Murase diğerleri, 2016).

2.1.5.6. Quorum Sensing Sistemi

Quorum-sensing (QS), bakterilerin popülasyon yoğunluğunu izleyerek gen ekspresyonunu düzenlemesini sağlayan hücre-hücre iletişim sürecidir. QS, motilite, biyofilm oluşumu ve patojenite gibi süreçleri etkiler (Zhao diğerleri, 2019). APEC'teki QS sistemi iki tür otoindükleyici içerir: AI-1 ve AI-2.

AI-1, LuxI homologu *SdiA* tarafından üretilir ve LuxR homologu *QseA* tarafından algılanır. Virulans ve biyofilm oluşumunu düzenler (Yin diğerleri, 2019).

AI-2 molekülü ise LuxS tarafından üretilir ve LsrABCDFGK operonu tarafından düzenlenir (Zuo diğerleri, 2019). Diğer düzenleyici bileşenler arasında LuxS, Pfs (aktif metil döngüsü yolu) ve *ptsI* (fosfotransferaz sistemi) bulunur (Zuo diğerleri, 2019). QS, APEC'te kalıcılık, hücre zararları, invazyon, motilite ve virulans genlerinin ekspresyonu gibi süreçlerde rol oynar (Xu diğerleri, 2017).

2.1.5.7. Sekresyon Sistemleri

Bakteriyel sekresyon sistemleri, bakteriyel hücre membranlarında bulunan ve proteinlerin konak hücrelere salınmasını sağlayan mekanizmalardır. APEC'te, III ve VI tipi sekresyon

sistemleri patogeneizde önemli roller oynar. Bu sistemlere ek olarak *cpxA* (zarf stres yanıt sistemi), *cpxR*, *clpV* (ATPaz), *dotU* (organel taşınma proteini), *hcp* (hemoliz düzenleyici protein), *icmF* (hücre içi çoğalma faktörü) ve *vrgG* (ekstraselüler protein) de dahil edilir (Wang diğerleri, 2017; Xue diğerleri, 2019). Bu mekanizmalar, biyofilm oluşumu, invazyon ve kolonizasyon gibi süreçlerde etkili olur (Xu diğerleri, 2017).

2.1.5.8. İki Bileşenli Sistemler

İki bileşenli sistemler (TCS), bakterilerin çevresel koşullara uyum sağlamasını ve gen ekspresyonunu düzenlemesini sağlayan önemli sinyal proteinleridir. APEC'te çeşitli TCS'ler patogeneizde rol oynar:

PhoPQ, flagella oluşumu ve kolonizasyon gibi süreçleri düzenler (Yu diğerleri, 2020).

BasSR, ABC taşıyıcılarını etkiler (Tu diğerleri, 2016).

KdpDE, potasyum taşınmasını kontrol eder (Xu diğerleri, 2019; Awad diğerleri, 2020).

RstAB, azot metabolizmasını düzenler.

BarA-UvrY, quorum-sensing ve kemotaksis süreçlerinde görev alır (Yin diğerleri, 2019; Thomrongsuwannakij diğerleri, 2020).

Bu sistemler biyofilm oluşumu, motilite, invazyon ve serum bakterisidal aktivitesine direnç gibi süreçlerde etkilidir (Li diğerleri, 2020).

2.1.5.9. Transkripsiyonel Düzenleyiciler

APEC patogeneizinde birçok transkripsiyonel düzenleyici kritik rol oynar:

autA ve *autR*, K1 kapsülü oluşumunu ve asit direnci sistemlerini düzenler (Xu diğerleri, 2019).

fnr, motilite, yapışma ve tip 1 fimbria gelişiminde görev alır (Kabiswa diğerleri, 2018).

mcbR ve *rfaH*, Tip VI sekresyon sistemlerini teşvik eder.

tyrR, aromatik amino asit taşınmasını düzenler ve serum direncini artırır (Awad diğerleri, 2020).

yjjQ, motilite ve invazyonu teşvik eder (Kot, 2019).

Bu düzenleyiciler, APEC'in çevresel değişikliklere uyum sağlamasını, enfeksiyon süreçlerini kolaylaştırmasını ve konağın bağışıklık tepkilerini aşmasını sağlar.

Aşağıda, *E. coli*'nin virulans faktörleri, ilgili genler ve bu faktörlerin işlevleri Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. *E. coli*'nin virulans faktörleri, ilgili genler ve bu faktörlerin işlevleri.

Başlık	Virulans Faktörleri	İlgili Genler	İşlevleri
Koruyucu Faktörler	Lipopolisakkarit (LPS), kapsüller, dış membran proteinleri, fagositoz kaçışı mekanizmaları	betA, iss, kfiC-K5, kpsMT(III), neuC, neuS, neuD, ompT, OmpA, traT, lpxM, sodA	Konak bağışıklığından korunma, yapışma, invazyon, kolonizasyon, hücre içi hayatta kalma, biyofilm üretimi, reaktif oksijen türlerine direnç.
Toksinler	Asetilkolin esterase (Ace4/35), ısıya dayanıklı enterotoksin (astA), hemolizinler (hlyF, hlyA, hlyE), sitotoksinler (cdtB, cdtS), proteazlar (espC, pic)	ace4/35, astA, cdtB, cdtS, espC, hlyF, hlyA, hlyE, pic, sat, stx2f, vat	Doku invazyonu ve hasar, motilite, kolonizasyon, hücre vakuolizasyonu, biyofilm üretimi, dış membran veziküllerinin üretimi.
Quorum Sensing Sistemi	AI-1 (SdiA), AI-2 (LuxS, Pfs), Lsr operonu	LuxS, Pfs, ptsI, LsrABCDGK	Gen ekspresyonunun düzenlenmesi, biyofilm oluşumu, motilite, adezyon, hücre hasarı, kolonizasyon, invazyon, virulans genlerinin ifadesi.
Salgı Sistemleri	Tip III ve Tip VI salgı sistemleri, zarf stres yanıtı mekanizmaları (CpxA, CpxR), ATPaz (ClpV), hemoliz ko-regülasyon proteini (hcp)	cpxA, cpxR, clpV, dotU, hcp, icmF, vrgG	Hücre zarından protein salınımı, hücre hasarı, adezyon, biyofilm oluşumu, hücre içi hayatta kalma, serum direnci, kolonizasyon, bakteriler arası rekabet.
İki Bileşenli Sistemler	Çevresel değişimlere adaptasyon sağlayan sinyal proteinleri	PhoPQ, BasSR, KdpDE, RstAB, BarA-UvrY	Hareketlilik, biyofilm oluşumu, adezyon, invazyon, hücre içi hayatta kalma, sistemik yayılım, serum bakterisidal aktivitesine direnç, ekzo-polimer üretimi.
Transkripsiyonel Regülatörler	K1 kapsül regülasyonu, tip I fimbrialar, oksidatif tolerans, aromatik amino asit taşınması, serum direnç genleri, motilite	autA, autR, fnr, mcbR, rfaH, tyrR, yjjQ	Çevresel adaptasyon, enfeksiyon süreçlerinin düzenlenmesi, konak bağışıklığından kaçış, patojenik potansiyelin artırılması.

2.1.6. Zoonotik Potansiyel

APEC, genetik olarak insanlarda ExPEC ile benzerlik göstermektedir. Bu durum, APEC'in gıda kaynaklı bir zoonotik tehdit ve insanlarda ekstraintestinal enfeksiyonlar için bir rezervuar olabileceğini ortaya koymaktadır. Genetik analizler, APEC ile bazı insan ExPEC klonları arasında örtüşme olduğunu göstermiş ve bu bakterilerin hem kümes hayvanlarını hem de insanları enfekte etme potansiyeline işaret etmiştir (Denamur ve diğerleri, 2021; Zhuge ve diğerleri, 2021).

Filogenomik analizler, belirli serogrup APEC izolatları ile insan ExPEC suşları arasında genetik benzerlik olduğunu ortaya koymuş ve bu durum zoonotik bulaşma riski ihtimalini desteklemiştir (Zhuge ve diğerleri, 2021). Hem APEC hem de ExPEC suşlarının insan böbrek hücrelerine bağlanabildiği ve invazyon yapabildiği, biyofilm oluşturabildiği ve serum bakterisidal aktivitesine direnç gösterebildiği, böylelikle zoonotik potansiyel taşıdığı belirtilmiştir (Chatterjee ve diğerleri, 2020; Delannoy ve diğerleri, 2021).

APEC'in insanlara bulaşmasını önlemek ve gıda güvenliğini sağlamak için önlemler alınması gereklidir (Awad ve diğerleri, 2020). APEC'in zoonotik bulaşma potansiyelini ve bunun insan sağlığı üzerindeki etkilerini anlamak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Denamur ve diğerleri, 2021).

2.1.7. Önleme ve Kontrol

Stres yönetimi, biyogüvenlik önlemleri ve APEC ile ilişkili viral hastalıklara karşı aşılama, avian kolibasillozisin önlenmesinde hayati önem taşır. Genetik mühendislik, APEC'e karşı artmış doğal direnç taşıyan tavuk ırklarının geliştirilmesine olanak tanımaktadır (Sgariglia ve diğerleri, 2019).

Damızlıklardan yumurtalara APEC'in dikey bulaşımının izlenmesi ve kontrol edilmesi, APEC'in tavuk sürülerine girmesinin önlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu stratejiler, kümes hayvanlarında avian kolibasillozisin önlenmesi ve yönetilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Kabiswa ve diğerleri, 2018).

2.1.7.1. Yönetim ve Biyogüvenlik Önlemleri

Kanatlı üretim tesislerinde APEC enfeksiyonlarını önlemede, amonyak ve toz gibi çevresel stres faktörlerinin yönetilmesi, iyi bir altlık ve hava kalitesinin sağlanması gibi temel unsurlar önceliklidir. Doğru havalandırmanın yanı sıra optimum sıcaklık, nem oranı ve hayvan yoğunluğunun korunması, tavuklardaki çevresel stresin azaltılmasına yardımcı olur (Kathayat ve diğerleri, 2021). Ayrıca, *Mycoplasma gallisepticum*, *Infectious Bronchitis Virus*, *Newcastle Disease Virus* ve *Infectious Bursal Disease* gibi hastalıklara karşı aşılama yapılarak, APEC enfeksiyonlarının oluşma olasılığı azaltılabilir. İyi bir beslenme düzeni ve güçlü bağışıklık sistemine sahip hayvanlar da kolibasillozis insidansını düşürmede önemli bir rol oynar (Kathayat ve diğerleri, 2021). APEC'in dikey bulaşması, üretim zincirinin başlangıcında, yani damızlık seviyesinde, bazı müdahalelerle önlenir. Bu müdahaleler arasında APEC enfeksiyonlarına karşı dirençli genotiplere sahip ırkların geliştirilmesi, kuluçkalık yumurtaların temizlenip dezenfekte edilmesi ve zemine düşen yumurtaların kullanımının en aza indirilmesi yer alır (Kathayat ve diğerleri, 2021). APEC'in yatay bulaşmasının sınırlandırılması için "tam dolu-tam boş" üretim sistemlerinin uygulanması, zayıf civcivlerin ilk hafta içinde sistematik olarak ayıklanması ve etkili temizlik programlarının devreye alınması önerilmektedir. APEC'in çiftliklere girişini engellemek için doğru ve etkin biyogüvenlik önlemleri gereklidir. Bu önlemler, yem ve suyun (örneğin klorlama yoluyla) dekontaminasyonu, kümesler, yem fabrikaları, çiftlik ekipmanları ve tesislerin dezenfeksiyonu gibi adımları içermelidir. Ek olarak, ev sinekleri, yabani kuşlar ve kemirgenler gibi vektörlerin kümeslere erişiminin engellenmesi, APEC'in kanatlı tesislerinden uzak tutulması için kritik bir biyogüvenlik önlemidir (Kathayat ve diğerleri, 2021).

2.1.7. 2. Antibiyotiklerin Kullanımı ve Direnç Sorunları

Kanatlı hayvancılık sektöründe, APEC enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasında sıkça antibiyotik kullanılmaktadır. Bu amaçla farklı sınıflara ait çok sayıda antibiyotik kullanılmaktadır:

Tetrasiklinler: Tetrasiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin

Sülfonamidler: Sulfadimetoksin, trimetoprim, sulfadiazin, sulfametazin, sulfaquinoxalin, ormetoprim

Aminoglikozitler: Apramisin, gentamisin, neomisin, spektinomisin

Penisilinler: Amoksisilin, ampisilin

Sefalosporinler: Seftiofur

Kinolonlar: Danofloksasin, sarafloksasin, enrofloksasin

Polimiksinler: Kolistin

Kloramfenikoller: Florfenikol

Makrolidler: Eritromisin

Linkozamidler: Linkomisin (Kathayat ve diğerleri, 2021).

Bununla birlikte, APEC izolatlarında çoklu antibiyotik direnci bildirilmiştir. Bu durum, antibiyotiklerin kullanımını sınırlamakta ve gelecekte bu ilaçların kullanımında önemli zorluklar doğurabileceğini göstermektedir (Kathayat ve diğerleri, 2021). 2015-2020 yılları arasında veriler, karbapenemler hariç hemen hemen tüm antibiyotik sınıflarına karşı APEC direnci olduğunu göstermektedir. Ancak, son dönemlerde imipeneme karşı direnç de rapor edilmiştir (Kathayat ve diğerleri, 2021). En yaygın direnç; ampisilin, tetrasiklin, trimetoprim, sulfametoksazol ve streptomisin gibi antibiyotiklere karşı gözlemlenmektedir. Ayrıca, β -laktamlar ve kolistin gibi tıbbi açıdan önemli antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde direnç bildirilmiştir. Bu durum, antibiyotik dirençli bakterilerin ve direnç genlerinin gıda zinciri yoluyla insanlara taşınması nedeniyle halk sağlığı açısından ciddi bir risk oluşturabilir (Osman ve diğerleri, 2018). ABD ve Avrupa Birliği tarafından uygulanan, gıda hayvanı üretiminde antibiyotiklerin büyüme teşvik amaçlı kullanımını sınırlandırma ve tıbbi açıdan önemli antibiyotiklerin tedavi amaçlı kullanımını kısıtlama stratejileri, bu riski azaltmaya yardımcı olabilir (Tang ve diğerleri, 2017). Ancak, bu tür önlemlerin antibiyotik direncini kontrol altına alma konusundaki faydalarının zamanla ortaya çıkabileceği unutulmamalıdır. Gıda hayvanı üretiminde kullanılmak üzere, çapraz direnç riski taşımayan antibakteriyellerin geliştirilmesi veya antibiyotik yerine geçebilecek alternatiflerin belirlenmesi, antibiyotik direnci sorunlarıyla mücadelede etkili bir çözüm olabilir (Kathayat, ve diğerleri, 2021).

Tavuklarda APEC enfeksiyonlarıyla mücadele için en yaygın strateji çeşitli antibiyotiklerin kullanımını içerir (Barbieri ve diğerleri, 2017). Ancak, antibiyotiklere dirençli

APEC suşlarının ortaya çıkışı, hayvan sağlığı ve gıda güvenliğini etkileyen önemli bir küresel sağlık tehdidi oluşturmaktadır (Thomrongsuwannakij ve diğerleri, 2020). Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonlara karşı son çare olarak kullanılan polimiksinler, karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'nin artışıyla etkisiz hale gelmiştir.

Polimiksin direnci genellikle lipopolisakkaritlerdeki kromozomal değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Barbieri ve diğerleri, 2017; Kabiswa ve diğerleri, 2018). Kümes hayvancılığı sektöründe antibiyotiklerin yaygın ve yanlış kullanımı, antibiyotiklere dirençli APEC suşlarının sorununu daha da artırmıştır. Bu suşların, diğer patojenik *E. coli* türlerinde antibiyotik direnç genlerini aktive ettiği ve insanlarla hayvanlar arasında direnç yayılmasını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Sgariglia ve diğerleri, 2019; Thomrongsuwannakij ve diğerleri, 2020). APEC, karbapenemler, imipenem, streptomisin ve tetrasiklin dışında neredeyse tüm antibiyotik sınıflarına direnç göstermektedir. Bu bulgular, APEC'teki antibiyotik direnci sorununu ele almak ve halk sağlığını korumak için kapsamlı stratejilerin aciliyetini vurgulamaktadır (Kabiswa ve diğerleri, 2018; Kot, 2019; Xu ve diğerleri, 2019).

2.1.7.3. Aşılar

Tavukları APEC enfeksiyonlarına karşı korumak için çoğunlukla canlı-attenüe ve rekombinant aşılar olmak üzere çeşitli aşı adayları araştırılmıştır (Kathayat ve diğerleri, 2021). Geçmişte inaktif (ölü) aşılar üzerinde çalışmalar yapılmış olsa da, son araştırmalar daha çok tavuklarda canlı-attenüe ve rekombinant aşıların değerlendirilmesine odaklanmıştır. Bu aşılarla koruma dereceleri değişkenlik göstermiş; bazı durumlarda hiç koruma sağlanamazken, bazen kısmi veya tam koruma elde edilmiştir (Kathayat ve diğerleri, 2021). Test edilen aşılar arasında, dış membran vezikülleri, bakteri hayalet aşıları, rekombinant iss, ExPEC antijenlerini içeren rekombinant antijen aşıları, APEC antijenlerini içeren *Salmonella* temelli aşılar, vs. tavuklarda ölüm oranını, doku hasarını ve bakteriyel yükü azaltmayı başarmıştır. Aynı zamanda, bu aşılar bağışıklık yanıtını (IgG ve IgA antikorlarının üretimi) uyatarak önemli bir bağışıklık koruması sağlamıştır (Kathayat ve diğerleri, 2021). Deneysel çalışmalarda tavuklarda etkili olduğu kanıtlanan birçok aşı adayına rağmen, şu anda ticari olarak yalnızca iki aşı bulunmaktadır: canlı-attenüe APEC O78 DaroA Poulvac® *E. coli* aşısı ve inaktive edilmiş, F11 fimbria ve FT flagella antijenlerini içeren Nobilis® *E. coli* aşısı. Ancak, bu aşıların en önemli dezavantajı,

farklı APEC serotiplerinden kaynaklanan heterojen enfeksiyonlara karşı yeterli koruma sağlayamamasıdır (Ghunaim ve diğerleri, 2014). İdeal bir APEC aşısının, birden fazla APEC serotipine karşı çapraz koruma sağlaması ve oral (yem veya su yoluyla) ya da sprey gibi toplu bağışıklama yöntemleriyle uygulanabilir olması beklenir (Ghunaim ve diğerleri, 2014). Çeşitli APEC serotiplerinin hastalığa neden olmak için kullandığı ortak ya da korunmuş virulans ve patogeneze mekanizmalarının tanımlanması, geniş spektrumlu yeni aşılarda geliştirilmesini kolaylaştırabilir (Kathayat ve diğerleri, 2021). APEC'in yeni virulans ve patogeneze faktörleriyle ilgili elde edilen bilgiler, güçlü aşı adaylarının tasarlanmasında kullanılabilir. Örneğin, Tıp VI salgı sistemi ve quorum sensing sistemi, APEC'in virulansı ve patogenezi üzerindeki önemli rolleri nedeniyle yeni aşı hedefleri olarak değerlendirilebilir (Kathayat ve diğerleri, 2021).

Tavuklarda APEC enfeksiyonlarına karşı etkili bağışıklama sağlama talebindeki artış, çeşitli zorlukları beraberinde getirmektedir. Bu zorluklar arasında farklı APEC suşlarına karşı çapraz koruma sağlama, ekonomik uygulanabilirlik ve güvenli aşı dağıtım yöntemleri yer almaktadır (Wang ve diğerleri, 2017). Bu zorlukların üstesinden gelmek, tavuklarda kolibasillozis kontrolü için hayati önem taşımaktadır. Virulans gen ekspresyonlarının araştırılması, çoğu APEC salgınına karşı koruma sağlayabilecek umut verici aşı adaylarının tanımlanmasına olanak sağlayabilir (Zuo ve diğerleri, 2019). APEC enfeksiyonlarına karşı tavukları koruma etkinliği açısından çeşitli aşı türleri incelenmiştir. Bu aşılarda canlı-attenué aşılarda, otolog (autojen) aşılarda, formalin-inaktive bakterinler, dış membran vezikül aşılarda ve rekombinant aşılarda bulunmaktadır (Zhuge ve diğerleri, 2019; Rezatofighi ve diğerleri, 2021). Bu aşılarda, APEC patogenezinin farklı yönlerini hedeflemektedir. Hedef alınan alanlar arasında bakteriyel metabolizma, demir alım sistemleri, quorum sensing sistemleri ve salgı sistemleri yer almaktadır (Barbieri ve diğerleri, 2017; Alber ve diğerleri, 2021). Tavuklar için optimal anti-APEC tedavilerinin geliştirilmesi, bu değişkenlerin koordine ve örtüşen etkilerini dikkate alan kapsamlı bir yaklaşımı gerektirmektedir (Yu ve diğerleri, 2019).

2.1.7.3.1. Poulvac® *E. coli* Aşısı

Poulvac® *E. coli*, Zoetis tarafından geliştirilen, attenüe canlı *E. coli* aşısıdır. Aşı, serotip O78 (*aroA* gen eksikliği olan) bir *E. coli* suşunu içerir. Bu suş, özellikle kanatlı hayvanlarda kolibasillozise neden olan APEC enfeksiyonlarına karşı bağışıklık oluşturmaya hedefler.

Aşı, iki ana yolla uygulanır:

Sprey yöntemiyle: Toplu aşılama, genellikle ilk gün uygulanır.

İçme suyu yöntemiyle: Aşının kuşlara eşit şekilde dağılmasını sağlamak için klor içermeyen suyla hazırlanır.

Tavuklarda: İlk gün sprey olarak uygulanabilir veya 5. günden itibaren içme suyuyla veya sprey olarak verilebilir.

Aşının kanatlılara eşit bir şekilde dağılması ve etkili olması için kullanılan suyun temiz ve kimyasallardan arındırılmış olması gerekir. Aşı genellikle düşük yağlı süt tozu veya yağsız süt ile stabilize edilir.

Bağışıklık Mekanizması ve Etkileri:

Aşı, kuşların bağışıklık sistemini aktive ederek serotip O78 kaynaklı enfeksiyonlara karşı direnç geliştirir. Bu bağışıklık: APEC kaynaklı enfeksiyonları azaltır, mortalite oranını düşürür, hayvanların genel sağlık durumunu iyileştirir.

Güvenlik ve Çevresel Faktörler:

Aşı güvenli kabul edilir ve 12 haftaya kadar etkili bağışıklık sağlar. Aşılanan kanatlılardan çevreye kısa süreli bir süre boyunca suş bulaşabilir; bu nedenle, çevre temizliğine özen gösterilmesi önerilir. İnsanlar için herhangi bir risk taşımadığı belirtilmekle birlikte, bağışıklığı baskılanmış kişiler aşı uygulaması sırasında dikkatli olmalıdır

Avantajları:

Antibiyotik kullanımını azaltır: APEC ile mücadelede antibiyotiklere duyulan ihtiyacı azaltır ve direnç sorunlarına karşı alternatif bir çözüm sunar. Yumurta kalıntısı riski yoktur: Bu özellik, özellikle ticari yumurta üreticileri için önemlidir (Zoetis, 2024).

2.1.7.4. Probiyotikler

Farklı probiyotikler, tavuklarda APEC enfeksiyonlarını önlemedeki etkinlikleri açısından test edilmiştir. *Lactobacillus plantarum* B1'in etkinliği, broyler yemine eklenerek (2×10^9 CFU/kg) *E. coli* (K88) enfeksiyonuna karşı değerlendirilmiştir. Bu probiyotikle beslenen

broylerlerde, sekumda *E. coli* sayıları belirgin şekilde azalırken, büyüme performansı, villus yüksekliği/kript derinliği oranı, ileal mukozal sIgA konsantrasyonu ve sekal laktik asit bakteri sayıları artmıştır (Kathayat ve diğerleri, 2021).

Benzer şekilde, *L. plantarum* 15-1 ile fruktooligosakkaritlerin (FOS) kombinasyonu, yem takviyesi (1×10^8 CFU/kg) ile APEC (O78) enfeksiyonuna karşı test edilmiştir. Bu kombinasyonu alan broylerlerde ölüm oranı ve serum diamine oksidaz seviyeleri azalmış, IgA ve IgG konsantrasyonları ise artmıştır (Kathayat ve diğerleri, 2021).

Enterococcus faecalis'in etkisi, büyümenin ilk üç günü boyunca içme suyuyla (1×10^8 CFU) uygulandığında APEC (O78) ile enfekte edilmiş broylerlerde değerlendirilmiştir. Bu takviye, büyüme performansını ve bağışıklık yanıtını artırmış, ölüm oranını azaltmış ve APEC'in viseral organlardaki yayılımını düşürmüştür (Kathayat ve diğerleri, 2021).

Ayrıca, çoklu suş içeren ticari bir probiyotik karışımı (*Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum*, *L. plantarum*) da broyler yemine eklenerek APEC (O78) enfeksiyonuna karşı test edilmiştir. Bu karışımı alan broylerlerde ölüm oranı (%13.6'dan %0'a), karaciğer ve dalaktaki APEC sayıları azalmış; büyüme performansı ve laktobasil popülasyonu artmıştır. Başka bir ticari probiyotik karışımı (*B. subtilis*, *L. acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Saccharomyces pastorianus*) ise rekombinant attenüe *Salmonella* aşısı ile kombine edilerek, hem APEC (O78:K80) hem de *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı katman tavuklarda yemle uygulanmıştır. Bu uygulama, havayolu kesesi iltihabı, perihepatitis ve perikarditis belirtilerini azaltmış ve kanda APEC yükünü düşürmüştür (Kathayat ve diğerleri, 2021).

Bu çalışmalar, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium* ve *Pediococcus* cinsine ait probiyotiklerin, APEC enfeksiyonlarını önleme, büyüme performansını artırma, sağlıklı bağırsak mikrobiyotasını koruma ve bağırsak mukozal bağışıklığını güçlendirme açısından etkili olduğunu göstermektedir (Kathayat ve diğerleri, 2021).

Ek olarak, tavuklarda bağırsak sağlığını desteklemek ve bağışıklık durumunu güçlendirmek için ticari olarak mevcut birçok probiyotik ürün bulunmaktadır (Sav-A-Chick® Probiotic Poultry Supplement, Probios®, HealthyGut™ Probiotics ve SuperDFM-Poultry gibi). Bu probiyotikler, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *Enterococcus faecium*, *E. thermophilus*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*,

Bifidobacterium bifidum, *B. animalis*, *Propionibacterium shermanii* ve *P. freudenerichii* gibi faydalı mikroorganizmalar içermektedir (Kathayat ve diğerleri, 2021).

Bu probiyotikler spesifik olarak APEC'e karşı geliştirilmemiş olsa da, geniş spektrumlu etkileri nedeniyle kümes hayvanı çiftliklerinde APEC enfeksiyonlarının görülme sıklığını azaltabilirler. Bunun yanı sıra, APEC enfeksiyonlarına karşı üstün koruma sağlayacak yeni probiyotiklerin belirlenmesi gereklidir. Bu, antibiyotiklere alternatif oluşturacak ve antibiyotik direncinin gelişimini azaltacaktır. Örneğin, sağlıklı ve APEC ile enfekte tavukların mikrobiyotası araştırılarak APEC enfeksiyonlarına direnç göstermede kritik olan faydalı bakteriler tanımlanabilir ve bu bakterilere yönelik yeni nesil probiyotikler geliştirilebilir (Kathayat ve diğerleri, 2021).

2.1.7.5. Bakteriyofajlar

Bakteriyofajların, tavuklarda APEC enfeksiyonlarına karşı koruyucu ve tedavi edici etkilerini değerlendirmek amacıyla bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin, bir çalışmada SPR02 ve DAF6 faj karışımının, APEC (O2) ile enfekte tavuklarda sprey ve intramüsküler yollarla uygulanmasının etkinliği incelenmiştir. APEC enfeksiyonundan üç gün önce uygulanan faj tedavisi, tavuklardaki ölüm oranını %40'tan %3'e düşürmüştür. Benzer şekilde, enfeksiyondan 24 ve 48 saat sonra yapılan faj tedavisi de ölüm oranını %55'ten %20'nin altına indirmiştir (Kathayat ve diğerleri, 2021).

Bir diğer çalışmada, phi F78E (Myoviridae), phi F258E (Siphoviridae) ve phi F61E (Myoviridae) içeren bir faj kokteylinin, deneysel olarak APEC (O78) ile enfekte edilen tavuklarda ve antibiyotik tedavisine dirençli doğal enfeksiyon görülen sürülerde ağızdan veya sprey yoluyla uygulanması test edilmiştir. Tedavi, deneysel olarak enfekte tavuklarda ölüm oranını %25 oranında azaltırken, doğal enfekte sürülerde ölüm oranını %0.5'in altına düşürmüştür (Kathayat ve diğerleri, 2021).

Başka bir çalışmada, TM1, TM2, TM3 ve TM4 fajlarını içeren bir kokteylin, APEC (O78:K80 ve O2:K1) ile enfekte tavuklara intramüsküler enjeksiyonla uygulanmasının etkisi incelenmiştir. Bu tedavi, ölüm oranını %46.6'dan %13.6'ya düşürmüş, akciğerlerdeki APEC

yükünü azaltmış, akciğer, karaciğer ve kalpteki APEC lezyonlarını hafifletmiş ve tavukların vücut ağırlığını artırmıştır (Kathayat ve diğerleri, 2021).

Bir diğer yenilikçi yaklaşımda, C-FKAZ14 adı verilen faj yüklü kitosan nanoparçacıklarının, APEC (O1:K1:H7) enfeksiyonuna karşı etkisi değerlendirilmiştir. Ağız yoluyla uygulanan bu tedavi, ölüm oranını %58.33'ten %16.7'ye düşürmüş, bağırsakta APEC kolonizasyonunu ve dışkı yoluyla atılımını önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca tavukların vücut ağırlığını artırmış ve klinik belirtileri hafifletmiştir (Kathayat ve diğerleri, 2021).

Bu çalışmalar, faj tedavisinin APEC enfeksiyonlarını kontrol altına almak için umut verici bir yöntem olduğunu göstermektedir. Ancak, şu ana kadar faj tedavisi sahada uygulanabilir bir yöntem haline gelememiştir. Bunun temel nedenleri arasında büyük ölçekli üretim zorlukları ve tavukçuluk sektöründe kullanım onayı ile ilgili tartışmalar yer almaktadır. Eğer sahada güvenli ve etkili olduğu kanıtlanırsa, fajlar, tavuk üretiminde antibiyotiklere değerli bir alternatif olabilir (Kathayat ve diğerleri, 2021).

2.1.7.6. Yeni Alternatif Yaklaşımlar

Antibiyotikler, aşılar, probiyotikler ve bakteriyofajların yanı sıra, tavuklarda APEC enfeksiyonlarına karşı koruyucu etkileri incelemek amacıyla çeşitli yenilikçi yaklaşımlar araştırılmıştır. Bu yaklaşımlar arasında doğuştan gelen bağışıklık sistemini uyaran maddeler, virulans ve büyüme engelleyiciler ile antimikrobiyal peptitler yer almaktadır (Kathayat ve diğerleri, 2021). Bu yöntemler, APEC enfeksiyonlarına karşı alternatif koruma stratejileri sunarak enfeksiyon kontrolünde yeni bir ufuk açmaktadır.

2.1.8. Sorunlar ve Öneriler

Kolibasillosis salgınlarının tedavisinde etkili ilaçların azalması, yeni tedavi yaklaşımlarına duyulan ihtiyacı ortaya koymaktadır. Antibiyotik kullanımından önce izole edilen suşların duyarlılık testlerinin yapılması, etkisiz tedavilerin ve antibiyotik direncinin yayılmasının önlenmesini sağlayabilir. Çoklu ilaç dirençli APEC suşları, artan ölüm oranları

ve uzamış hastane yatışlarıyla ilişkilidir ve etkili tedavi geliştirme konusundaki aciliyeti vurgulamaktadır (Nawaz ve diğerleri, 2024).

Bakteriyel metabolizma, salgı sistemleri, demir alım mekanizmaları ve quorum sensing sistemleri gibi faktörleri dikkate alan bütüncül bir yaklaşım, etkili anti-APEC terapilerinin geliştirilmesi için gereklidir. APEC'in insanlara zoonotik geçişine dair net kanıtların sağlanması ve mevcut antibiyotiklere çapraz direnç göstermeyen hayvana özgü antibakteriyel ajanların geliştirilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Nawaz ve diğerleri, 2024).

Çeşitli serotiplere karşı çapraz koruma sağlayabilecek ideal bir APEC aşısı geliştirilmesi elzemdir. Bu doğrultuda, APEC virulansı ve patogeneze süreçlerine dair bilgiler kullanılarak yeni aşı adaylarının belirlenmesi gereklidir. Ayrıca, küçük moleküllü virulans inhibitörleri, büyüme inhibitörleri ve yeni hedeflere sahip antimikrobiyal peptitler gibi tamamlayıcı tedavi yöntemlerinin kolibasillosis önlenmesindeki potansiyelleri araştırılmalıdır. Bakteriyo-fajlar, antibiyotiklere alternatif olarak araştırılmaktadır ve doğada bol bulunmaları, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde doğal olarak yer almaları, güvenli olmaları gibi avantajlar sunmaktadır (Nawaz ve diğerleri, 2024).

2.1.9. Sonuçlar ve Gelecek Perspektifleri

Kanatlılarda yaygın bir bakteriyel enfeksiyon olan APEC, küresel kanatlı hayvan endüstrisine önemli ekonomik yükler getirmektedir. APEC'in etkili bir şekilde yönetilmesi, hem hayvan hem de insan sağlığını korumak için hayati önem taşımaktadır. O1, O2, O6, O7, O26, O45, O55, O78, O88, O121, O103, O111, O104, O114, O119, O124, O145, O157, O1:K1, O2:K1, O6:K2, O18:K1, O124, O143, O148 ve O164 gibi yaygın APEC serotipleri, insanlarda ekstra-intestinal enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir. Bu durum, hayvan ve insan sağlığının birbirleriyle bağlantılı olduğunu göstermektedir (Nawaz ve diğerleri, 2024).

Önceki çalışmalar, APEC'in imipenem, streptomisin, tetrasiklin, ampisilin, sulfametoksazol, trimetoprim, beta-laktamlar ve kolistine karşı artan direncini ortaya koymuş, bu da hedefe yönelik antimikrobiyal yönetim stratejilerinin geliştirilmesinin aciliyetini vurgulamaktadır. Ayrıca, APEC'in insanlara bulaşmasını önlemek için proaktif önlemlerin

alınması, gıda güvenliğini ve halk sağığını bu patojenin giderek artan tehdidine karşı korumak için gereklidir (Nawaz ve diğeri, 2024).

APEC, dünya genelinde kümes hayvancılığında önemli ekonomik kayıplara neden olan en yaygın bakteriyel patojenlerden biridir. APEC'in etkili bir şekilde kontrol altına alınması hem hayvan sağığı hem de insan sağığı açısından faydalıdır. APEC'in sistemik enfeksiyonlara neden olmasında demir alım sistemleri, quorum sensing sistemi, bakteriyel metabolizma ve salgı sistemleri gibi birçok virulans ve patogeneze faktörü birlikte rol oynar. Bu nedenle, gelecekte etkili anti-APEC tedavilerinin geliştirilmesi için bu faktörlerin tümünü kapsayan bütüncül bir yaklaşıma ihtiyaç vardır (Kathayat ve diğeri, 2021).

APEC'in insanlara zoonotik bulaşını kanıtlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle ST95 ve ST131 gibi klonal gruplar veya O1, O2 ve O18 serogrubuna ait APEC izolatları, insanlarda bağırsak dışı enfeksiyonların kaynağı olabilir. Antibiyotik direnci sorunları ve dirençli bakterilerin ve genlerin insanlara bulaşma riski göz önüne alındığında, sadece hayvanlar için kullanılan ve mevcut antibiyotiklerle çapraz direnç göstermeyen antibakteriyellerin geliştirilmesi, gelecekte çözüm sunabilir (Kathayat ve diğeri, 2021).

Ayrıca, birden fazla APEC serotipine karşı çapraz koruma sağlayacak ideal bir APEC aşısının geliştirilmesine ihtiyaç vardır. APEC'in virulans ve patogeneze mekanizmalarına ilişkin edinilen bilgiler, yeni aşı adaylarının belirlenmesinde kullanılmalıdır. Son olarak, alternatif tedavi yöntemleri de değerlendirilmelidir. Özellikle, küçük molekülü virulans veya büyüme engelleyiciler ile yenilikçi hedeflere sahip antimikrobiyal peptitler, kümes hayvanlarında kolibasillozis kontrolünde etkili olabilecek potansiyele sahiptir (Kathayat ve diğeri, 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

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

3.1.2. Materyal

Bu çalışmanın materyalini, 2022 yılı boyunca bir broiler işletmesinin 15 farklı çiftliğinden, aşılama öncesinde (0-5. gün) 180 ve aşılama sonrasında (35-42. gün) 180 olmak üzere, toplam 360 *E. coli* izolatu oluşturdu. Hasta broylerlerde solunum güçlüğü, burun akıntısı, gözlerde sulanma, durgunluk, iştahsızlık, artritis ve yüksek mortalite gözlemlenmiştir. *E. coli* izolatları, çiftlik laboratuvarlarında gerçekleştirilen nekropsiler sırasında, morfolojik olarak değişime uğramış karaciğerlerden elde edildi. Her çiftlikteki broylerlerden elde edilen toplam 12 izolat, soğuk zincir koşulları altında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis ve Analiz Laboratuvarı'na ulaştırılmıştır. Çiftliklerdeki sürüler, attenüe canlı ticari bir aşı ile (Poultvac® *E. coli* aşısı) yaşamlarının 5. gününde sprey yöntemi kullanılarak aşılanmışlardır.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ADÜ-HADYEK)'nın 29.09.2021 tarih ve 64583101/2021/141 sayılı kararı ile etik açıdan herhangi bir sakınca bulunmadığı bildirilmiştir.

3.1.3. Referans Suşlar

Moleküler çalışmalarda internal kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu negatif kontrol olarak da *S. Enteritidis* ATCC 13076 suşu; antibiyotik duyarlılık testinde ise kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

3.1.4. Besiyerleri

Çalışmada *E. coli* izolasyonu ve identifikasyonu amacı ile Eosin-Methylene Blue Agar (Merck 103858, Almanya), MacConkey Agar (Merck 105465, Almanya), izolatların pasajlanmasında kanlı agar (Merck 110886, Almanya), nutrient agar (Oxoid CM003, İngiltere), nutrient broth (Merck 105443, Almanya), izolatların uzun süreli saklanması için %20 gliserinli brain heart infusion broth (Oxoid CM1135, İngiltere) kullanıldı.

3.1.4.1. Eosin Methylene Blue Agar

Bir litre distile suya 36 g besiyeri eklenip mikrodalgada eritildi, pH 7,2±0,2 ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilip, 45-50°C'ye soğutularak petrilere döküldü.

3.1.4.2. MacConkey Agar

Bir litre distile su içerisine 50 g olacak şekilde tartılan besiyeri mikrodalga fırında eritildi. pH'sı 7,2±0,2 olarak ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilip 45-50°C'ye kadar soğutularak petrilere döküldü.

3.1.4.3. Kanlı Agar

Bir litre distile su içerisine 40 g olacak şekilde tartılan besiyeri mikrodalga fırında eritildi. pH'sı $7,2\pm0,2$ olarak ayarlandı. Otoklavda 121°C 'de 15 sterilize edilip $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutuldu. İçerisinde %7 oranında steril insan kanı olacak şekilde kan ilave edilerek petrilere döküldü.

3.1.4.4. Nutrient Agar

Bir litre distile su içerisine 28 g olacak şekilde tartılan besiyeri mikrodalga fırında eritildi. pH'sı $7,2\pm0,2$ olarak ayarlandı. Otoklavda 121°C 'de 15 sterilize edilip $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutularak petrilere döküldü.

3.1.4.5. Nutrient Broth

Bir litre distile su içerisine 8 g olacak şekilde tartılan besiyeri mikrodalga fırında eritildi. pH'sı $7,2\pm0,2$ olarak ayarlandı. Tüplere 5'er ml olacak şekilde dağıtılıp otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edildi.

3.1.4.6. Brain Hearth Infusion Broth

Yüzde yirmi gliserinli brain heart infusion broth hazırlamak için bir litre distile su içerisine 3,7 g olacak şekilde besiyeri tartılarak mikrodalga fırında eritildi. Üzerine 20 ml gliserin eklendi ve tekrar mikrodalga fırın yardımı ile homojenize edildi. pH'sı $7,2\pm0,2$ olacak şekilde ayarlandı. Besiyeri endorf tüplere yaklaşık bir ml olacak şekilde dağıtılarak otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanan besiyerleri kullanılıncaya kadar buzdolabı ısısında ($2-8^{\circ}\text{C}$) saklandı.

3.1.5. Ayıraç ve Boyalar

3.1.5.1. Gram Boyama

İzolatların Gram boyama morfolojilerini belirlemek amacıyla, ticari bir Gram boyama seti (Merck 111885) kullanılmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Saf kültürlerden alınan koloniler, lam üzerinde fizyolojik tuzlu su ile süspanse edilmiştir. Bu süspanسیون havada kurutulmuş ve fikse edilmiştir. Preparatlar, bir dakika boyunca kristal viyole ile boyandıktan sonra boya dökülerek distile su ile yıkanmıştır. Ardından üzerine lugol çözeltisi damlatılarak bir dakika bekletilmiş ve tekrar distile su ile yıkanmıştır. Bu aşamayı takiben, %95'lik alkol ile 15 saniye işlem yapılmış ve preparatlar yeniden su ile durulanmıştır. Sonrasında, 30 saniye boyunca safranin ile boyama yapılmış ve nihayetinde su ile yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Hazırlanan preparatlar kurutulduktan sonra, 100x immersiyon objektifi kullanılarak mikroskop altında incelenmiştir (Quinn ve diğerleri, 2011).

3.1.5.2. Oksidaz Test Kiti

Elde edilen izolatların oksidaz aktivitelerinin belirlenebilmesi amacı ile oksidaz test kiti (Oxoid, BR 64) ticari olarak temin edilerek oda ısısında (2-8°C) muhafaza edildi.

3.1.5.3. Hidrojen Peroksit

İzolatların katalaz aktivitelerini belirlenebilmesi amacı ile için ticari olarak %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu kullanıldı.

3. 1. 5. 4. Kovaks Ayıracı

İzole edilen izolatların indol aktivitelerinin belirlenebilmesi amacı ile kullanılmıştır. Kullanıma hazır olarak temin edilen kovaks indol ayıracı buzdolabında (2-8°C) muhafaza edilmiştir.

3.1.6. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Bakteriyel tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri eş zamanlı olarak BD Phoenix 100™ cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Testlerde, Gram-negatif bakteriler için tasarlanmış NMIC/ID-433 identifikasyon kartları tercih edildi. Bu sistem, BD Phoenix cihazı ve ilgili panellerden oluşmaktadır. Bakteri tanımlama işlemi sırasında, türbidometri yöntemi ile birlikte oksidasyon-redüksiyon göstergesi kullanılarak bakteri üremesi izlenmiş ve değerlendirilmiştir (BD Phoenix, 2023).

3.1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

3.1.7.1. Solusyon ve Boyalar

3.1.7.1.1. Tris Borik Asit EDTA Buffer

Stok solüsyonu olan 10x Tris Borik Asit EDTA Buffer (TBE) aşağıdaki gibi hazırlanarak kullanım süresince oda ısısında muhafaza edildi.

Tris (hidroksimetil aminometan).....	108 g
Borik asit.....	55 g
EDTA.....	7,5 g

Tartılan maddeler 800 ml distile suda eritildi. Daha sonra toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanarak pH 8,0'e ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edildi. Hazırlanan stok solüsyon oda ısısında muhafaza edildi.

Kullanım solüsyonu olan 0,5x TBE buffer aşağıdaki gibi hazırlanarak kullanım süresince oda ısısında muhafaza edildi.

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

Hazırlanan kullanım kullanma solüsyonu, agaroz jel hazırlanmasında ve elektroforez işlemi esnasında tank içerisinde kullanıldı.

3.1.7.1.2. Yükleme Tamponu

Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jelde analiz edilebilmesi için elektroforez işlemine hazırlık yapıldı. Bu amaçla, 5 µl ampikon örneği ile 1 µl yükleme tamponu (6x, ThermoFisher R0611) karıştırılarak toplam 6 µl hacminde bir karışım hazırlandı. Kullanılan ticari yükleme tamponu, 2-8°C arasında buzdolabında saklanarak uygun koşullarda muhafaza edildi.

3.1.7.1.3. 5x FirePol® Master Mix

Bu çalışmada, polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan 5x FirePol® Master Mix, gerekli tüm reaktifleri içeren kullanıma hazır bir çözeltidir. Bu çözeltinin bileşimi şu şekildedir:

FirePol® DNA Polimeraz: Yüksek özgülük ve verimlilik sağlayan enzim.

5x Reaksiyon Tamponu B: 0,4 M Tris-HCl, 0,1 M (NH₄)₂SO₄ ve %0,1 (ağırlık/hacim) Tween-20 içerir, PZR reaksiyonu için ideal bir ortam oluşturur.

Magnezyum Klorür (MgCl₂): 12,5 mM konsantrasyonda sağlanmış olup, 1x PZR çözeltisi için nihai MgCl₂ konsantrasyonu 2,5 mM'dir.

Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTP): Her biri 1 mM başlangıç konsantrasyonunda sağlanmıştır (1x PZR çözeltisinde: 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP ve 200 µM dTTP).

3.1.7.3. Primerler

E. coli izolatlarının filogrup dağılımı, *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*, *arpA* genleri hedef alınarak multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle belirlenmiştir (Clermont ve diğerleri, 2013). Grup C ve grup E'nin tanımlanmasında ise *trpA* (Clermont ve diğerleri, 2008) ve *arpA* genleri hedef alınarak filogrup sınıflandırması yapılmıştır (Lescat ve diğerleri, 2013). Bu filotiplendirme çalışmasında, toplamda yedi kodlayıcı hedef gen kullanılarak *E. coli* sekiz farklı filogrupla (A, B1, B2, C, D, E, F, clade I) sınıflandırılmıştır (Clermont ve diğerleri, 2013). Çalışmada kullanılan tüm primerler, Tablo 1'de sunulmaktadır.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan primerler.

	Primer	Hedef Gen	Dizi (5'-3')	Amplikon boyutu (bp)	T _m
Dörtlü PZR	<i>chuA</i> .1b <i>chuA</i> .2	<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288	60,5 60,5
Dörtlü PZR	<i>yjaA</i> .1b <i>yjaA</i> .2b	<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTGTCAGGAG AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211	58,4 58,4
Dörtlü PZR	<i>TspE4C2</i> .1b <i>TspE4C2</i> .2b	<i>TspE4.C2</i>	CACTATTTCGTAAGGTCATCC AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	152	56,4 62,5
Dörtlü PZR	<i>AceK</i> F <i>ArpA1</i> R	<i>arpA</i>	AACGCTATTGCGCCAGCTTGC TCTCCCCATACCGTACGCTA	400	60,5 60,5
Grup E	<i>ArpAgpE</i> F <i>ArpAgpE</i> R	<i>arpA</i>	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	301	60,1 58,4
Grup C	<i>trpAgpC</i> .1 <i>trpAgpC</i> .2	<i>trpA</i>	AGTTTATGCCCCAGTGCGAG TCTGCGCCGGTCACGCCCC	219	58,4 68,1
İnternal Kontrol	<i>trpBA</i> .F <i>trpBA</i> .R	<i>trpA</i>	CGGCGATAAAGACATCTTCAC GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	489	59,4 68,7

3.1.7.4. AgaroZ Jel

0,5X konsantrasyonunda 100 ml TBE tamponu içerisine 2 gram agaroz tartılarak eklendi. Karışım, mikrodalga fırında orta sıcaklıkta yaklaşık 3 dakika ısıtılarak agarozun tamamen çözünmesi sağlandı. Ardından, karışım 45-50°C'ye kadar soğutuldu ve içerisine DNA boyası olarak 6 µl Safe View (ABM, Kanada) eklendi ve iyice karıştırıldı. Hazırlanan agaroz çözeltisi, elektroforez tablasına döküldü ve jelin katılaşması için yaklaşık 30-45 dakika süreyle bekletildi.

3.1.7.5. Marker

Oluşan bantların boyutlarını belirlemek amacıyla, 100-1000 bp aralığında işaretlenmiş 100 bp'lik Fermentas® (USA) marka DNA ladder kullanılmıştır

3.1.7.6. Elektroforez

Hazırlanan agaroz jel, elektroforez tankına yerleştirildi ve 0,5X TBE tampon çözeltisi, jelin üzerine yerleşecek şekilde tank içerisine eklenerek jel ile tamamen temas etmesi sağlandı. Amplikonlardan 5 µl örnek alındı ve buna 1 µl 6X yükleme tamponu eklenerek karıştırıldı. Ardından, bu karışım uygun kuyucuklara yerleştirildi. Elektroforez işlemleri, 100 voltluk bir gerilimde 45 dakika süreyle gerçekleştirildi.

3.1.7.7. Görüntüleme ve Değerlendirme

Elektroforez işlemleri tamamlanan agaroz jel, bilgisayarlı UV transillüminatör sistemine yerleştirilerek görselleştirildi. Görüntüleme işleminden sonra amplikon boyutları, pozitif ve negatif kontrollerin sonuçları değerlendirildi. Amplifiye edilen ürün, Tablo 1'de belirtilen beklenen boyutta ve belirgin bir bant oluşturduğunda, incelenen gen açısından pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. İzolatların Saflaştırılması ve Saklanması

E. coli izolatları, MacConkey agarına ekilerek inkübasyona bırakıldı. Ekim sonrası petriler, aerobik koşullarda 37°C'de 18-24 saat süreyle inkübe edildi. MacConkey agarda laktozu fermente eden pembe kolonilerden bir tanesi seçilip, Eozin Metilen Blue agara pasajlandı. EMB agarda da aynı inkübasyon koşullarında 37°C'de 18-24 saat bekletildi. EMB agarda metalik yeşil renk gösteren koloniler, Gram boyama ve biyokimyasal testlere (oksidaz, katalaz, indol) tabi tutuldu. Gram negatif çomak şeklinde olan, oksidaz negatif, katalaz ve indol testleri pozitif olan izolatlar, *E. coli* şüpheli olarak kabul edildi (Quinn ve diğerleri, 2011). Bu izolatlar, -20°C'de %20 gliserollü Brain Heart Infusion Broth içerisinde muhafaza edildi.

3.2.2. İdentifikasyon ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

BD Phoenix 100™ NMIC/ID-433 kiti ile izolatların dokuz antimikrobiyal aileye ait 20 antibiyotiğe (aminoglikozid (AG): amikasin (AN), gentamisin (GM); karbapenem: ertapenem (ETP), imipenem (IMP), meropenem (MEM); sefalosporin (CP): sefazolin (CFZ), sefuroksim (CXM), seftazidim (CAZ), seftriakson (CRO), sefepim (FEP); penisilin (P): ampisilin (AMP); β Laktam (BL): seftolozan tazobaktam (CT), amoksisilin klavulanat (AXC), ampisilin sulbaktam (AS), piperasilin tazobaktam (TZP); lipopeptid (LP): kolistin (COL); folat (F): trimetoprim sülfametoksazol (SXT); kinolon (K): siprofloksasin (CIP), levofloksasin (LF); tetrasiklin (T): tigesiklin (TGC)) karşı direnç durumları değerlendirilmektedir.

Testte, kalite kontrol suşu olarak da *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı. Antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarının yorumlanmasında Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) tarafından 2022 yılında tanımlanan duyarlılık sınır değerleri kullanıldı (EUCAST 2022).

Bakteriyel identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testleri aşağıdaki gibi yapıldı:

Saf olarak üretilen kolonilerden tek bir tanesi alınarak kanlı agara pasajlandı.

Kültürden ID Broth'a (Katalog No: 246001) bulanıklı Mc Farland: 0,5 olacak şekilde süspansiyon yapılarak broth vortekslendi.

AST indikatör solüsyonu AST broth tüpü (8 ml) içine, bir damla olacak şekilde eklendi. Tüpün kapağı kapatıldı solüsyon hafifçe çalkalandı.

ID Broth tüp içindeki süspansiyonundan 25 µl alınıp AST broth tüpü içine aktarıldı. Tüpün kapağı kapatılarak AST tüpü birkaç kez hafifçe çalkalandı.

Bakteriyel identifikasyon ve antimikrobiyal duyarlılık testleri için hazırlanan kullanılacak paneller panel tablası üzerine yerleştirildi.

Hazırlanan bakteri süspansiyonları, panelin uygun ID ve AST broth kuyucuklara boşaltıldı. Panel üzerindeki delikler plastik kapak yardımı ile kapatıldı.

Paneller en en kısa sürede (en fazla 30 dakika içerisinde) cihaza yerleştirildi.

Ana ekran açılarak örneklerin kayıt işlemi gerçekleştirildi. Bakteri süspansiyonlarını içeren paneller cihaza yerleştirilerek 18-24 saatlik inkübasyondan sonra sonuçlar değerlendirildi. Cihazda aynı anda bakteri identifikasyonu yapıldığı gibi antibiyotik duyarlılık test sonuçları da sistem üzerinden alınmıştır.

İzolat en az üç veya daha fazla antimikrobiyal aileye dirençli olması durumunda çoklu antibiyotik dirençli olarak kabul edildi (Magiorakos ve diğerleri, 2012).

3.2.3. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu sonikasyon yöntemi ile yapıldı (Maniatis ve Sambrook, 1989). Sonikasyon yöntemi ile DNA ekstraksiyonu aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

E. coli stok kültüründen kanlı agara ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyon süresi sonunda kültürden tek koloni alınarak Nutrient Broth'a ekim pasajlandı. Aynı şekilde 37°C'de 18-24 saat inkübasyonun ardından tüpler üç dk 12000 rpmde 5 dak santrifüj edildi süpernatant atıldı.

Tortu 1 ml steril deiyonize su ile sulandırıldı ($\sim 10^8$ /ml). Süspansiyon vortekslendi. Süspansiyona 40 Hz'de 10 dakika sonikasyon işlemi (IsoLab, Türkiye) uygulanarak bakteri

hücre duvarının parçalanması sağlandı. Süspansiyon tekrar 12000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantta bulunan DNA her PZR reaksiyonunda 3 µl olarak kullanıldı.

Ekstraksiyonu yapılan genomik DNA'lar miktar tayinleri ve saflık kontrolleri için nanodrop kullanıldı. Bunun için DNA ekstraksiyonu yapılan her DNA'dan 3 µl alınarak 260 nm ve 280 nm'deki absorbans değerleri tespit edildi. OD260/OD280 oranının 1,6-2,0 arasında olması DNA'nın saf ve PZR için uygun olduğunu; aşağıda olması ise RNA kontaminasyonu ve yukarıda olması ise protein kontaminasyonu olduğunu göstermektedir (Turner ve diğerleri, 2004).

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

BD Phoenix 100 otomatize sistemi kullanılarak yapılan bakteriyel identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testlerinin ardından, izolatların *E. coli* olup olmadıkları, *trpA* genine özgü iç kontrol primerleriyle gerçekleştirilen PZR yöntemiyle moleküler olarak doğrulandı. Hem fenotipik hem de genotipik olarak *E. coli* oldukları onaylanan izolatların filotipleri, multipleks PZR ile belirlendi.

Tüm PZR reaksiyonlarında, toplam hacmi 25 µl olacak şekilde master miks hazırlandı. 5x master miks tampon çözeltisi için final konsantrasyon 1x, her bir primer için final konsantrasyon 0,4 pmol, DNA'nın son konsantrasyonu ise OD260/OD280 oranı 1,6-2,0 olarak ayarlandı.

Mastermiksler hazırlandıktan sonra, PZR tüpleri örnek sayısı kadar numaralandı ve her tüpe 22 µl mastermiks eklenerek hazırlık yapıldı. Ardından, DNA ekstraksiyonundan elde edilen her örneğe 3 µl DNA ilave edildi ve tüplerin kapakları sıkıca kapatıldı. Tüpler, termal döngüleme cihazına yerleştirilerek programlandı. DNA amplifikasyonu işlemi, 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon ile başladı ve ardından 30 döngüde, her döngüde 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 57°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 60 saniye uzama işlemleri yapıldı. Son olarak, 72°C'de 10 dakika son uzama gerçekleştirildi.

Kullanılan malzemeler, konsantrasyonları ve miktarları Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. Mastermiksın hazırlanma oranları.

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

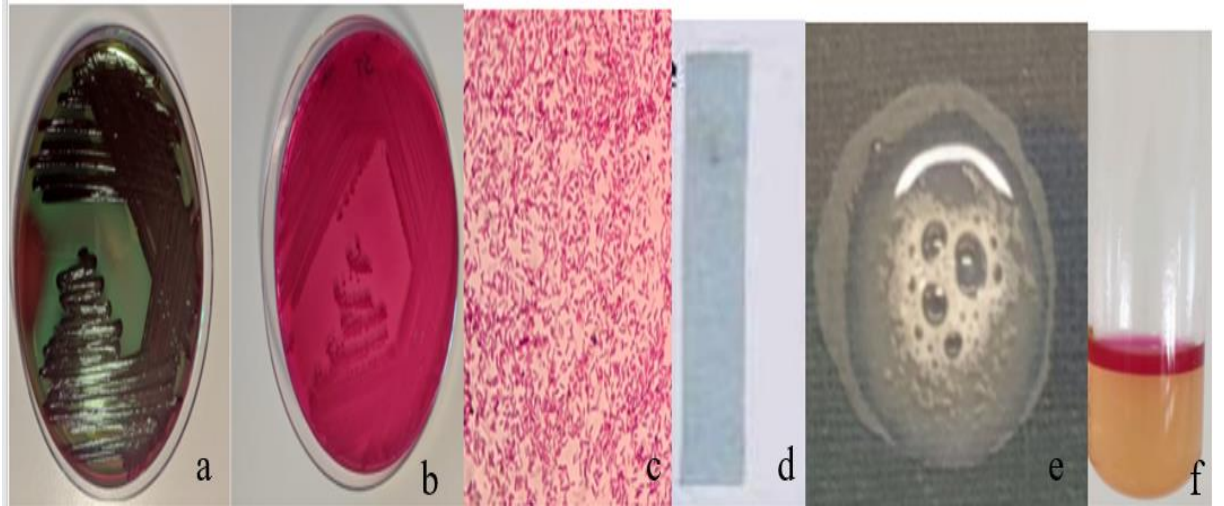
3.2.5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) yazılımının 23.0 sürümü (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Frekans verilerinin karşılaştırılmasında Pearson Ki-kare (χ^2) testi ve gerektiğinde Fisher'in Kesin Testi uygulandı. Bu analizler, broyler sürülerine uygulanan ticari *E. coli* aşısının filogenetik çeşitlilik üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yapıldı. Aşılama öncesi ve sonrası elde edilen izolatların filogenetik gruplarındaki değişiklikler karşılaştırılarak, aşının filogenetik çeşitliliği üzerindeki etkisi ve filogenetik grupların prevalansında anlamlı bir değişim olup olmadığı incelendi. Sonuçların değerlendirilmesinde %95 güven aralığı dikkate alındı ve $p < 0,05$ olan farklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İdentifikasyon

Bu çalışmada, 15 broyler çiftliğinden aşılama öncesi ve sonrası her çiftlikten 12'şer olmak üzere toplamda 360 *E. coli* izolatu elde edildi. İdentifikasyon sürecinde, Eosin Methylene Blue agarda metalik yeşil parlaklık gösteren ve MacConkey agarda pembe koloni oluşturan, oksidaz negatif, katalaz pozitif ve indol pozitif özelliklere sahip Gram negatif çomak şeklindeki bakteriler, *E. coli* için şüpheli izolatlar olarak değerlendirildi. İzolatların identifikasyonu, klasik konvansiyonel mikrobiyolojik tanı yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi (Resim 1).



Resim 1. *E. coli* izolatlarının biyokimyasal testleri. **a.** EMB agarda metalik yeşil parlaklık **b.** MacConkey agarda laktoz pozitif koloni **c.** Gram boyama **d.** Oksidaz testi (negatif) **e.** Katalaz testi (pozitif) **f.** İndol testi (pozitif).

Daha sonra toplam 360 *E. coli* şüpheli izolat, BD Phoenix 100™ otomatize mikrobiyoloji sisteminde NMIC/ID 433 panelleri kullanılarak analiz edilmiş ve izolatların *E. coli* oldukları doğrulanmıştır. Otomatize test sistemi ile gerçekleştirilen identifikasyon işlemi sonucunda elde edilen izolatlara ait biyokimyasal test sonuçları aşağıda sunulmaktadır (Tablo 5).

Tablo 5. *E. coli* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları.

Test	Sonuç	Test	Sonuç	Test	Sonuç
A-ARARR	V	A-GLPRB	-	A-GLYB	-
A-GUGAH	-	A-LARGH	-	A-LGTA	V
A-LEUH	V	A-LPHET	-	A-LPROB	-
A-LPYR	-	A-LTRY	-	A-LYALD	V
A-ACT	-	C-ADO	-	C-CIT	-
C-CLST	V	C-DMNT	V	C-KGA	V
C-MLO	-	C-PXB	V	C-TIG	-
M-NAG	-	N-LGGH	-	N-LPROT	V
P-BDGLU	-	P-BPHO	V	R-BALL	V
R-BGEN	-	R-DEX	+	R-DFRU	+
R-DGAL	V	R-DGUA	+	R-DMLB	V
R-DSBT	V	R-DSUC	-	R-GRA	+
R-LARA	+	R-LRHA	V	R-MBGU	-
R-MTU	-	R-NGA	V	R-NGU	+
S-ORN	V	S-URE	-	t-ESC	-

V: Değişken

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Çalışma kapsamında elde edilen toplam 360 izolatın antibiyotik duyarlılık testleri, BD Phoenix 100™ otomatize mikrobiyoloji sistemi kullanılarak NMIC/ID 433 panelleri ile gerçekleştirilmiştir. Aşılama öncesi (0-5. günlerde) (N=180) ve aşılama sonrası (35-42. günlerde) (N=180) elde edilen izolatlara yapılan antibiyogram testlerine göre direnç oranları aşağıdaki gibi tespit edilmiştir (Tablo 6, Şekil 2).

Aminoglikozidler grubunda, amikasin direnci gözlenmezken (%0), gentamisin için toplam direnç oranı %29 olarak belirlenmiştir (aşı öncesi %12, aşı sonrası %45).

Tablo 6. İzolatların antibiyotik duyarlılık test sonuçları.

Antimikrobiyal Aile	Antibiyotik	0-5. günler (N=180) N (%)	35-42. günler (N=180) N (%)	Tüm İzolatlar (N=360) N (%)
Aminoglikozid	Amikasin	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Gentamisin	22 (12)	81 (45)	103 (29)
Karbapenem	Ertapenem	9 (5)	8 (4)	17 (5)
	Imipenem	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Meropenem	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Sephalosporin	Sefazolin	23 (13)	38 (21)	61 (17)
	Sefuroksim	26 (14)	38 (21)	64 (18)
	Sefotazidim	16 (9)	29 (16)	45 (13)
	Seftriakson	15 (8)	29 (16)	44 (12)
	Sefepim	17 (9)	28 (16)	45 (13)
Penisilin	Ampisilin	114 (63)	137 (76)	251 (70)
Beta laktam	Seftolozan tazobaktam	2 (1)	9 (5)	11 (3)
	Amoksisilin klavulanat	58 (32)	83 (46)	141 (39)
	Ampisilin sulbaktam	46 (26)	77 (43)	123 (34)
	Piperasilin tazobaktam	24 (13)	34 (19)	58 (16)
Polimiksin	Kolistin	2 (1)	7 (4)	9 (3)
Folat	Trimethoprim sulfamethoksazol	55 (31)	96 (53)	151 (42)
Kinolon	Siprofloksasin	75 (42)	112 (62)	187 (52)
	Levofloksasin	46 (26)	107 (59)	153 (43)
Tetrasiklin	Tigesiklin	116 (64)	164 (91)	280 (78)

Karbapenemler grubunda ertapenem, imipenem ve meropenem için direnç oranları düşük seviyede olup, sırasıyla %5, %0 ve %0 olarak saptanmıştır.

Sephalosporinler ailesinden sefalozin (%17), sefuroksim (%18), seftazidim (%13), seftriakson (%12) ve sefepim (%13) antibiyotiklerine karşı direnç gözlenmiştir.

Penisilin grubunda ampisiline direnç oranı oldukça yüksek bulunmuş olup, %70 olarak kaydedilmiştir (aşı öncesi %63, aşı sonrası %76).

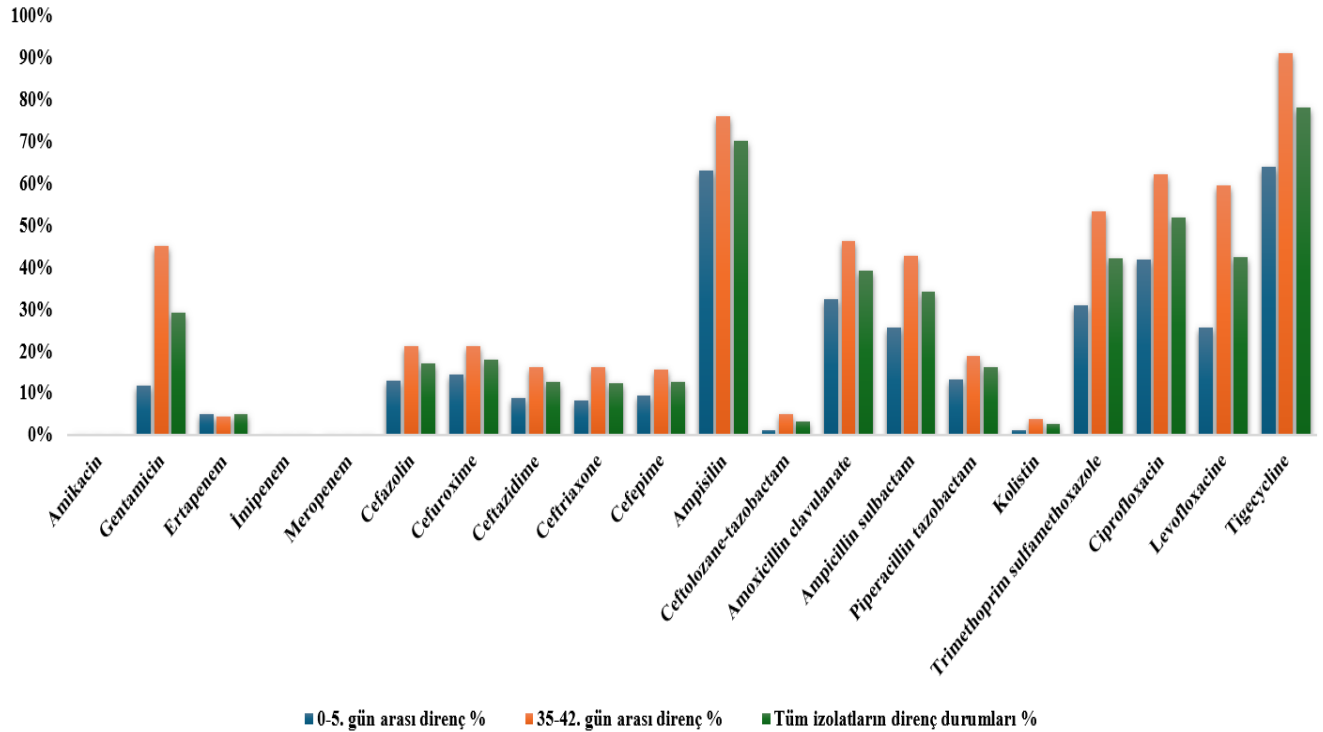
Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri kombinasyonlarında sefotolozan-tazobaktam (%3), amoksisilin-klavulanat (%39), ampisilin-sulbaktam (%34) ve piperasilin-tazobaktam (%16) direnç oranları tespit edilmiştir.

Polimiksin grubunda kolistin direnci oldukça düşük seviyede olup, toplam direnç oranı %3'tür (aşı öncesi %1, aşı sonrası %4).

Folik asit antagonistlerinden trimetoprim-sulfametoksazol için toplam direnç oranı %42 olarak belirlenmiştir (aşı öncesi %31, aşı sonrası %53).

Kinolonlar grubunda siprofloksasin (%52) ve levofloksasin (%43) direnç oranları dikkat çekici bulunmuştur.

Tetrasiklinler grubunda ise tigesiklin, %78 direnç oranı ile en yüksek direnç seviyesine sahip antibiyotik olarak kaydedilmiştir (aşı öncesi %64, aşı sonrası %91).



Şekil 2. *E. coli* izolatlarının antibiyotiklere karşı dirençlilik durumları.

Sonuçlar, özellikle penisilin ve tetrasiklin grubu antibiyotiklere karşı direnç oranlarının oldukça yüksek olduğunu göstermekte, bunun yanı sıra kolistin gibi kritik öneme sahip antibiyotiklere karşı direnç oranının düşük seviyelerde kaldığı dikkat çekmektedir.

4.2.1. Çoklu Antibiyotik Direnci

Bu çalışmada, Pulvac® *E. coli* aşısı, broylerlere 5. günde uygulanmış olup, aşılama gününe (5. gün) kadar ve sonrasında (35-42. gün arası) elde edilen izolatların çoklu antibiyotik direnç durumları analiz edilmiştir (Tablo 7, Şekil 3).

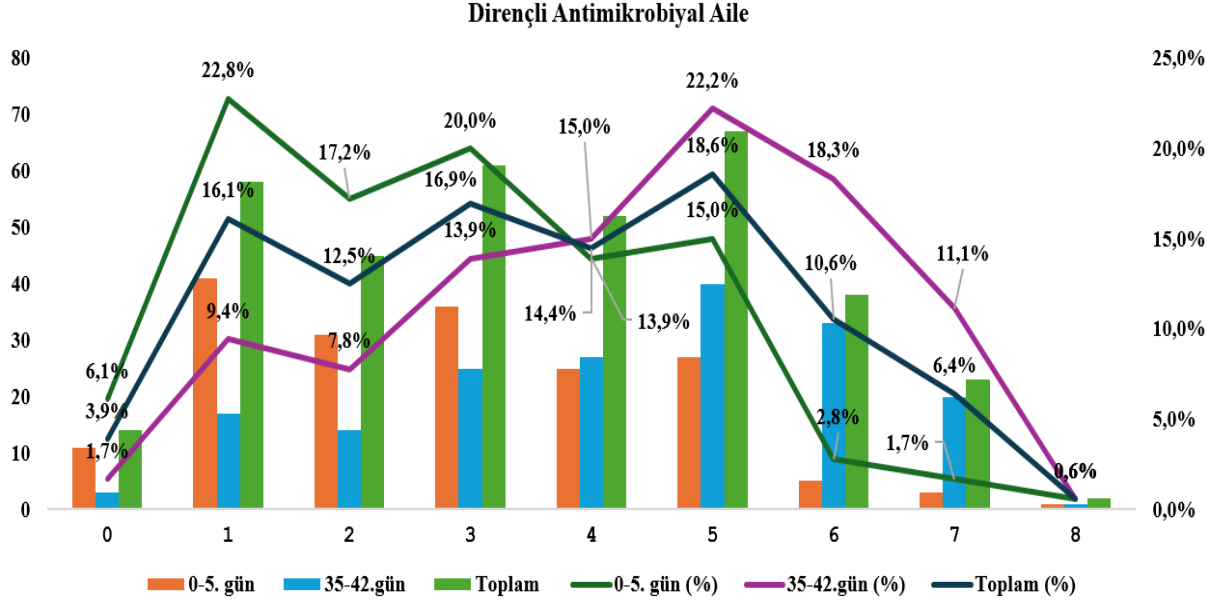
Tablo 7. Aşı öncesi ve sonrası çoklu antibiyotik direnç durumlarının karşılaştırması.

Dirençli Antimikrobiyal Aile Sayısı	0-5. gün, (N=180) N (%)	35-42. gün, (N=180) N (%)	Toplam (N=360) N (%)
0	11 (6,1)	3 (1,7)	14 (3,9)
1	41 (22,8)	17 (9,4)	58 (16,1)
2	31 (17,2)	14 (7,8)	45 (12,5)
3	36 (20,0)	25 (13,9)	61 (16,9)
4	25 (13,9)	27 (15,0)	52 (14,4)
5	27 (15,0)	40 (22,2)	67 (18,6)
6	5 (2,8)	33 (18,4)	38 (10,6)
7	3 (1,7)	20 (11,1)	23 (6,5)
8	1 (0,5)	1 (0,5)	2 (0,5)

Bulgular, broylerlerin yaşamlarının beşinci gününe kadar elde edilen izolatların %53,8'i (97/180)'inin çoklu antibiyotik dirençli olduğunu göstermektedir.

Broylerler 35-42. günlük olduklarında alınan izolatlarda ise çoklu antibiyotik direnç oranının %81,1 (146/180) yükseldiği görülmüştür.

Tüm izolatların %67,5 (243/360) çoklu antibiyotik direncine sahip idi. Bu veriler, broyler üretiminde antimikrobiyal direnç sorununun ciddiyetini ortaya koymaktadır.



Şekil 3. Aşı öncesi ve sonrası çoklu antibiyotik direnç durumları.

4.3. Filotiplendirme

Bu çalışmada, kolibasillozis tanısı konulmuş broylerlerden aşılama öncesi ve sonrasında izole edilen toplam 360 kanatlı patojenik *E. coli* (APEC) izolatının filogenetik dağılımları ve patojenite potansiyelleri değerlendirilmiştir. İzolatların filogenetik grupları, aşılama öncesi (N=180) ve aşılama sonrası (N=180) olmak üzere iki farklı dönemde analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

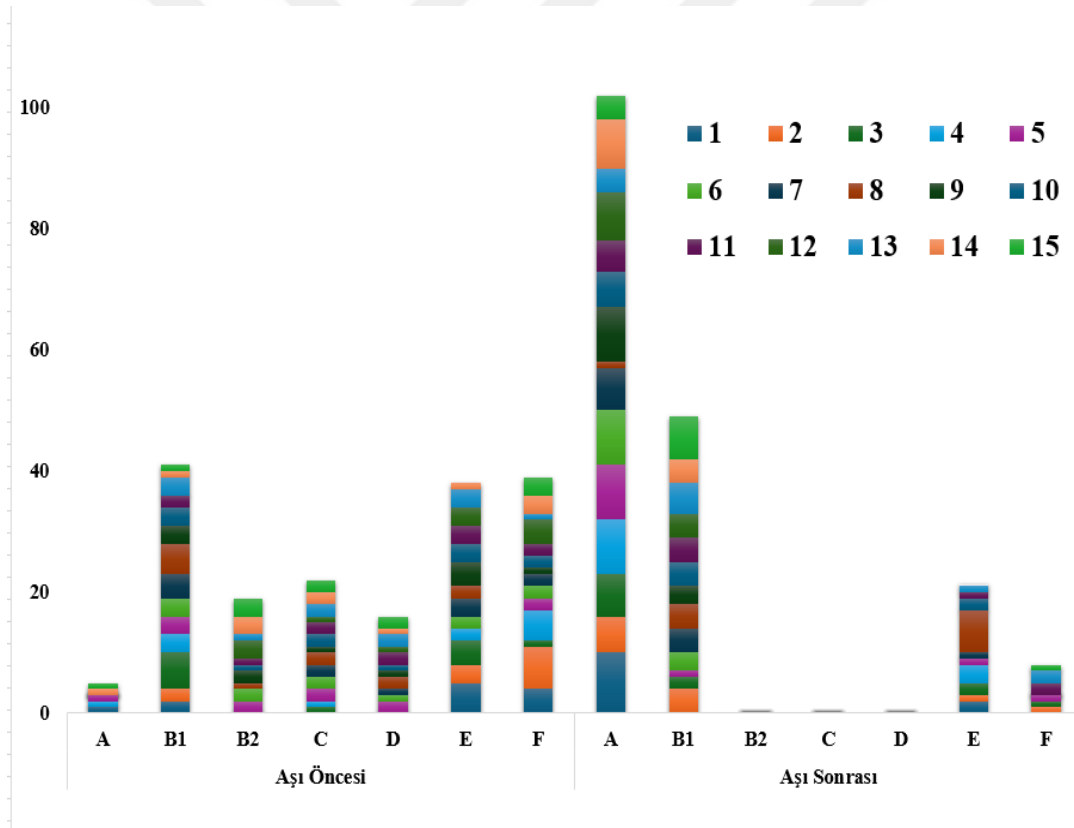
Aşılama öncesinde izolatların büyük bir kısmının üç filotipte (B1: %22,8, F: %21,7, E: %21,1) yoğunlaştığı, diğer filotiplerin ise daha düşük oranlarda dağılım gösterdiği (A: %2,8, B2: %10,6, C: %12,2, D: %8,9) belirlenmiştir.

Aşılama sonrasında izolatların büyük bir kısmının grup A (%56,7) ve B1 (%27,2) filotiplerinde yoğunlaştığı, diğer filotiplerin ise daha düşük oranlarda dağılım gösterdiği (E: %11,7, F: %4,4) ve B2, C, D gruplarının tamamen ortadan kalktığı tespit edilmiştir.

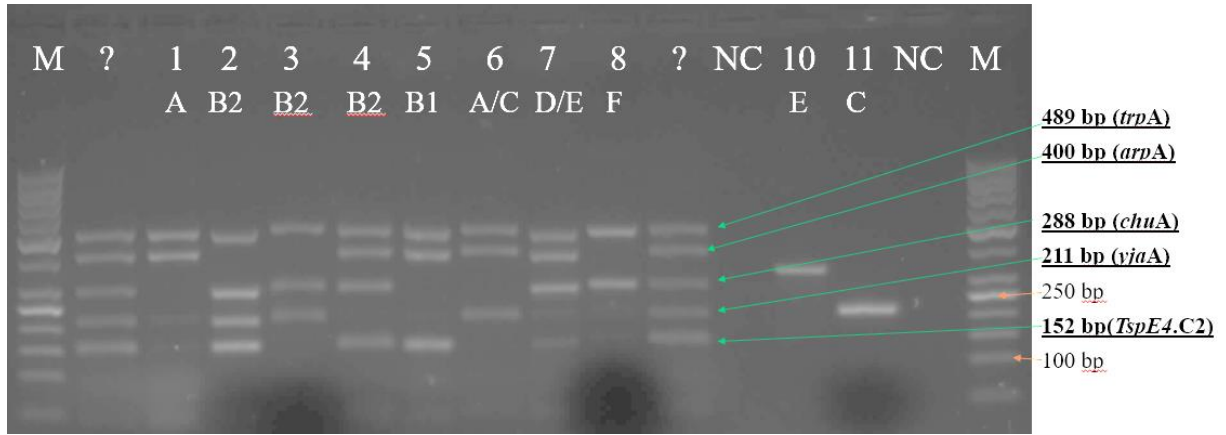
Bu sonuçlar, aşılama sonrası dönemde düşük virulans potansiyeline sahip grup A'nın baskın hale geldiğini ve yüksek ile orta düzeyde virulans potansiyeline sahip grupların prevalansının azaldığını göstermektedir (Tablo 8, Resim 2, Şekil 4).

Tablo 8. Aşılamaya öncesi ve sonrası filogenetik dağılım.

Filogenetik Grup	Aşılamaya Öncesi N=180, (%)	Aşılamaya Sonrası N=180, (%)	Toplam N=360, (%)	Virulans Potansiyeli
A	5 (2,8)	102 (56,7)	107 (29,7)	Düşük
B1	41 (22,8)	49 (27,2)	90 (25,0)	Düşük
B2	19 (10,6)	0 (0)	19 (5,3)	Yüksek
C	22 (12,2)	0 (0)	22 (6,1)	Orta
D	16 (8,9)	0 (0)	16 (4,4)	Orta
E	38 (21,1)	21 (11,7)	59 (16,4)	Orta
F	39 (21,7)	8 (4,4)	47 (13,1)	Orta



Şekil 4. Aşılamaya öncesi ve aşılamaya sonrası çiftliklere göre filotip sayıları.



Resim 2. *E. coli* izolatlarının yeni Clermont filotipleme yöntemine göre filotip profilleri. M: Marker (50 bp, Fermentas), 1. Grup A (– – – + +), 2. Grup B2 (+ + + – +), 3. Grup B2 (– + + – +) 4. Grup B2 (+ – + + +) 5. Grup B1 (+ – – + +), 6. Grup A/C (– + – + +), 7. Grup D/E (– – + + +), 8. Grup F (– – + – +) 9. Bilinmeyen Grup (?) (Daha önce yapılmış çalışmalardan elde edilmiştir) (+ + + + +) (152 bp, 211 bp, 288 bp, 400 bp, 489 bp), NC: DNAsız master miks . 10. Grup C (219 bp) 11. Grup E (301 bp) NC: *S. Enteritidis* ATCC 13076 M: Marker (50 bp, Fermentas).

4.4. İstatistiksel Analiz

Aşılanmanın filogenetik grupların dağılımı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, aşı uygulamasından önce ve sonra gözlenen filotip dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterip göstermediği incelendi. Elde edilen veriler, aşının filotip dağılımı üzerindeki etkisini belirlemek için %95 güven aralığında değerlendirilmiş, $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi. Bu değerlendirme, Kikare testi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

A grubu izolatlarının prevalansı aşı sonrası anlamlı şekilde artış göstermiştir ve bu değişim istatistiksel olarak son derece anlamlıdır ($p < 0.05$, $\chi^2 = 125.12$).

B1 grubu izolatlarının prevalansı aşı sonrası hafif artış göstermiş ve B1 grubu izolatlarına aşılanmanın anlamlı bir etkisi bulunmamıştır ($p = 0.394$, $\chi^2 = 0.95$).

B2 grubu izolatları, aşılama sonrası tamamen ortadan kalkmış ve bu değişim istatistiksel olarak son derece anlamlıdır ($p < 0.05$, $\chi^2 = 20.06$).

C grubu izolatları, aşılama sonrası tamamen ortadan kalkmış ve bu değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$, $\chi^2=23.43$).

D grubu izolatları, aşılama sonrası tamamen ortadan kalkmış ve bu değişim istatistiksel olarak son derece anlamlıdır ($p<0.05$, $\chi^2=16.74$).

E grubu izolatlarında aşılama sonrası azalma görülmüştür ve bu değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$, $\chi^2=5.86$).

F grubu izolatlarında aşılama sonrası azalma görülmüştür ve bu değişim istatistiksel olarak son derece anlamlıdır ($p<0.05$, $\chi^2=23.52$) (Tablo 9).

Tablo 9. Filotip dağılımlarının istatistiksel analizi.

Filotip	Aşı		P	χ^2
	Var	Yok		
A (+)	102	5	0.000	125.12
A (-)	78	175		
B1 (+)	49	41	0.394	0.95
B1 (-)	131	139		
B2 (+)	0	19	0.000	20.06
B2 (-)	180	161		
C (+)	0	22	0.000	23.43
C (-)	180	158		
D (+)	0	16	0.000	16.74
D (-)	180	164		
E (+)	21	38	0.022	5.86
E (-)	159	142		
F (+)	8	39	0.000	23.52
F (-)	172	141		

Bu bulgular, ticari canlı attenüe *E. coli* aşısının filogenetik grupların prevalansında belirgin değişikliklere yol açtığını ve özellikle B1 filogrubu dışında kalan diğer tüm filogruplar (A, B2, C, D, E, F) üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur.

5. TARTIŞMA

Kanatlı hayvan üretimi, dünya genelinde hızla büyüyen bir sektör olmasına rağmen, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar bu sektörü önemli ölçüde olumsuz etkilemektedir (McMullin, 2022). APEC yurdumuzda (Seferoğlu ve diğerleri, 2024) olduğu gibi Avrupa, Asya, Amerika, Afrika ve Avustralya gibi farklı kıtalarda yaygın bir enfeksiyon etkeni olarak görülmekte ve ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Kathayat ve diğerleri, 2021). Örneğin, yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde karkasta meydana getirdiği değişiklikler nedeniyle yıllık ekonomik kayıpların 40 milyon dolara ulaşabileceği bildirilmiştir (Kathayat ve diğerleri, 2021). APEC, genellikle sekonder bir patojen olarak değerlendirilse de, sahip olduğu virulans faktörleri nedeniyle yüksek mortalite oranlarına yol açabilmektedir (Kathayat ve diğerleri, 2021). Aynı zamanda direnç genlerinin bir rezervuarı olarak işlev görmesi, bu bakteriyi yalnızca hayvan sağlığı açısından değil, zoonotik bir tehdit olarak halk sağlığı açısından da önemli kılmaktadır. APEC'nin geniş dağılımı ve kanatlı üretimine olan ekonomik etkileri literatürde sıkça vurgulanmaktadır (Kathayat ve diğerleri, 2021; Hu ve diğerleri, 2022). Bu bağlamda, APEC enfeksiyonlarının kanatlı sağlığı ve üretimi üzerindeki etkilerinin azaltılabilmesi için etkili enfeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilmesi kritik bir gereklilik olarak ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada, ticari zayıflatılmış canlı *E. coli* aşısının uygulandığı broyler sürülerinden elde edilen APEC izolatlarının filogenetik gruplarındaki değişikliklerin, aşının filogenetik çeşitlilik üzerindeki potansiyel etkilerinin ve broylerlerin yaşamlarının erken ve geç dönemlerinde elde edilen APEC izolatlarının antibiyotik direnç profillerinin analiz edilmesi amaçlandı. Bu tür çalışmalar, enfeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilmesine katkı sunarak ekonomik kayıpları azaltma ve halk sağlığını koruma açısından önemli bilgiler sağlamaktadır.

Bu çalışmada, broyler kaynaklı *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Özellikle broylerlerin erken yaşam evrelerinden (ilk 5 gün) ve kesime yakın dönemlerinden (35-42. gün) elde edilen izolatlar karşılaştırılmış, direnç profillerindeki değişimin zaman içindeki eğilimi analiz edilmiştir. Gentamisin direnci, aşılama öncesinde %12 iken, aşılama sonrasında %45'e yükselmiş ve toplam direnç oranı %29 olarak hesaplanmıştır. Penisilin grubu antibiyotiklerden ampisiline karşı direnç oranı, aşılama

öncesinde %63 iken, aşılama sonrası %76'ye ulaşmıştır. Tetrasiklin grubu antibiyotiklerden tigesikline karşı direnç oranı ise aşılama öncesinde %64 seviyesindeyken, aşılama sonrasında %91'e kadar artış göstermiştir. Buna karşılık, kolistin gibi kritik öneme sahip antibiyotiklere direnç oranı oldukça düşük seviyede (%1'den %3'e yükselmiş) kalmıştır. Antibiyotik direnç gelişimindeki farklılıklar, genellikle genetik faktörler, antibiyotik kullanımı ve çevresel seleksiyon baskıları ile ilişkilendirilmiştir (Larsson ve Flach, 2021).

Bu çalışmada gentamisin için tespit edilen direnç oranı (%29), Ukrayna'da yürütülen bir çalışmada bildirilen direnç oranından (%14) daha yüksektir (Nechypurenko diğerleri, 2024). Bu farklılık, aminoglikozid grubu antibiyotiklerin bölgesel kullanım yoğunluğundaki farklılıklar ve yerel direnç mekanizmalarının gelişimi ile açıklanabilir. Penisilin grubundan ampisilin direnci, bu çalışmada %70 olarak tespit edilmiş olup, bu oran Ukrayna'da bildirilen amoksisilin direncine (%78) benzerdir. Buna karşılık, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları (ör. amoksisilin-klavulanat) için daha düşük direnç oranları (%32), Ukrayna çalışmasındaki daha yüksek oranlardan (%69) belirgin şekilde farklıdır. Bu fark, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarının kullanım biçimindeki bölgesel farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir.

Tetrasiklin grubu antibiyotiklerden tigesikline yönelik direnç oranı, bu çalışmada %78 ile en yüksek seviyede bulunmuştur. Tigesiklinin kanatlı hayvanlarda kullanımı ile ilgili, ruhsatlandırılmış bir veteriner ilaç formülasyonu bulunmamaktadır. Tigesikline karşı yüksek direnç oranı büyük ihtimalle genetik direnç mekanizmalarının yayılması veya tetrasiklin grubuna ait diğer antibiyotiklerin yaygın kullanımı ile ilişkilendirilebilir. Tetrasiklin grubu antibiyotiklerin kanatlı hayvanlarda uzun süreli ve yaygın kullanımı bu tür dirençlerin gelişmesine katkı sağlayabilir. Bu durum, antibiyotik direncinin antibiyotiklerin klinik olarak kullanılmadığı alanlarda bile ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Ukrayna'da yapılan çalışmada oksitetrasiklin (%75) ve doksisiklin (%58) için yine yüksek düzeylerde direnç oranları rapor edilmiştir. Önceki çalışmalar, tetrasiklin direncinin *tetA* ve *tetB* genlerinin varlığı ile ilişkilendirildiğini ve bu genlerin dünya genelinde yaygın olarak tespit edildiğini göstermektedir (Castro diğerleri, 2022). Bu durum, tetrasiklinlerin kontrolsüz kullanımına bağlanabilir.

Bu çalışmada, kinolon grubu antibiyotiklerden siprofloksasin (%52) ve levofloksasin (%43) direnç oranları dikkat çekicidir. Ukrayna'da yapılan çalışmada ise enrofloksasin ve flumequine için direnç oranları sırasıyla %56 ve %78 olarak rapor edilmiştir. Siprofloksasin

direncinin dünya genelinde artış gösterdiği ve bu artışın kinolon direnç belirleyici bölgelerdeki mutasyonlarla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Temmerman diğerleri, 2022).

Kolistin direnci, bu çalışmada ortalama olarak %3, Ukrayna'da ise %8 olarak belirlenmiştir. Kolistin, kanatlı hayvanlarda özellikle *E. coli* ve *Salmonella* gibi Gram-negatif bakterilerin neden olduğu sindirim sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir (Kumar ve diğerleri, 2020). Her iki çalışmada da kolistin direncinin düşük seviyelerde kalması, bu antibiyotiğin sınırlı kullanımına bağlanabilir. Ancak, kolistin direnciyle ilişkili *mcr-1* geninin varlığı gibi genetik faktörlerin direnç gelişimindeki etkisi göz ardı edilmemelidir (Hu diğerleri, 2022). Kolistinin veteriner hekimlikte kullanımı, insan sağlığı açısından kritik öneme sahip olması ve antibiyotik direncinin yayılmasını önlemek amacıyla birçok ülkede kısıtlanmıştır. Özellikle Avrupa Birliği, kolistinin hayvanlarda kullanımını sınırlandırmış ve sadece belirli durumlarda kullanılmasına izin vermektedir (Kumar ve diğerleri, 2020). Kolistin direncinin yayılması, hem veteriner hekimlikte hem de insan sağlığında ciddi bir sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle, kolistin ve diğer kritik öneme sahip antibiyotiklerin kullanımında dikkatli olunmalı, gereksiz ve yanlış kullanımdan kaçınılmalı ve antibiyotik direnciyle mücadele için uygun önlemler alınmalıdır.

Antibiyotik direnç oranları, bölgesel farklılıklar gösterebileceğinden, çiftliklerde uygulanan kontrol stratejilerinin bu direnç profilleri dikkate alınarak optimize edilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, amikasin ve kolistin gibi kritik öneme sahip antibiyotiklere karşı düşük direnç oranlarının (%0 ve %3) tespit edilmesi, umut verici bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Buna karşılık tetrasiklin, ampisilin ve kinolonlar gibi yüksek direnç oranlarına sahip antibiyotiklerin kullanımının sınırlandırılması, direnç gelişiminin kontrol altına alınmasında etkili bir strateji olarak öne çıkabilir.

Hem bu çalışmada hem de Ukrayna'da yapılan çalışmada (Temmerman ve diğerleri, 2022) ortalama çoklu antibiyotik direnç oranlarının yüksek (sırasıyla %67,5 ve %59) olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, broyler üretiminde antimikrobiyal direnç sorununun ciddiyetini ortaya koymakta ve artan direnç seviyeleri nedeni ile kontrol stratejilerinin yeniden değerlendirilmesini gerektirdiğini göstermektedir.

Bu çalışmada broylerlerin yaşamlarının ilk beş günlük döneminde *E. coli* izolatlarının %53'ünde çoklu antibiyotik direncinin tespit edilmesi, direnç genlerinin erken dönemde edinildiğini göstermektedir. Bu durum, büyük ölçüde damızlık sürülerden dikey bulaşma,

kuluçkahane ortamındaki hijyen eksiklikleri, yem ve su kaynaklarının kontaminasyonu veya profilaktik antibiyotik kullanımı gibi faktörlere bağlı olabilir. Ayrıca, mobil genetik elemanlar aracılığıyla direnç genlerinin hızla yayılması da bu yüksek oranı açıklanabilir. Özellikle antibiyotik kullanımının rasyonel bir şekilde planlanması ve etkili immünizasyon stratejilerinin hayata geçirilmesi önerilmektedir. Bunun yanı sıra, aşılama ve biyogüvenlik önlemleri, APEC enfeksiyonlarının kontrolünde kritik bir rol oynamaktadır. Antibiyotik direnç genlerinin tespiti için yapılacak moleküler analizler, direnç mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir ve bu genlerin yayılımını kontrol altına alacak stratejilerin geliştirilmesine olanak tanıyabilir. Bu bağlamda, antibiyotik kullanımına ilişkin daha sıkı düzenlemelerin yanı sıra, direnç izleme programlarının uygulanması, hem halk sağlığı hem de veterinerlik uygulamaları açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, ticari attenüe canlı *E. coli* aşısının filogenetik gruplar üzerindeki etkileri ortaya konulmuştur. Aşılama sonrasında filogrup B1'in oranında hafif bir artış, filogrup A'nın oranında ise belirgin bir yükselme gözlemlenirken; yüksek virülansa sahip filogrup B2, C ve D'nin tamamen ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, ticari aşının B1 filogrubu haricindeki tüm filogruplar üzerinde güçlü bir baskılayıcı etki yarattığını düşündürmektedir. Aşılama sonrası A filogrubunun prevalansındaki artış, bu grubun bağışıklık sisteminin etkilerine karşı daha dirençli olabileceğini veya çevresel ve genetik avantajlara sahip olması nedeniyle baskın hale geldiğini göstermektedir. Bu çalışmada, B1 filogrubunun dağılımında anlamlı bir değişiklik gözlenmemesi, bu grubun genellikle düşük patojenite profiline sahip olması ve ticari aşının hedeflediği spesifik virulans faktörlerini taşımama ihtimali ile açıklanabilir. Literatür, B1 filogrubunun çoğunlukla kommensal özellikler taşıdığı ve patojenite potansiyelinin düşük olduğunu desteklemektedir (Clermont ve diğerleri, 2013). Bu durum, ticari aşının filogenetik gruplar üzerindeki seçici baskı mekanizmalarının daha ayrıntılı bir şekilde incelenmesini gerektirmektedir.

Hırvatistan'da Lozica ve çalışma arkadaşları tarafından 2021 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada, otovaksin uygulamasının *E. coli* filogenetik gruplarının dağılımı üzerindeki etkileri incelenmiştir (Lozica ve diğerleri, 2021). Çalışmada, ilk sürülerde ticari aşı, sonraki sürülerde ise otovaksin uygulanmış ve klinik nekropsilerden izole edilen iki farklı çiftlikten toplam 113 *E. coli* suşu materyal olarak kullanılmıştır. İzolatların filogenetik gruplandırması, Clermont multipleks PZR yöntemi ile yapılmıştır. Araştırmada, ticari attenüe aşının genetik olarak heterojen ve yüksek virulans potansiyeline sahip *E. coli* suşları üzerinde sınırlı bir

etkisinin olduğu ve filogenetik çeşitliliği yeterince kontrol edemediği belirlenmiştir. Özellikle çiftlik B’de B2 filogrubunun baskın hale gelmesi, ticari aşının bu gruptaki yüksek virulanslı suşları baskılama kapasitesinin düşük olduğunu göstermiştir. Otovaksin uygulamasının ise filogenetik çeşitlilikte belirgin değişikliklere yol açtığı ve birçok filotipi baskıladığı, ancak B2 gibi bazı filotiplerin varlığını tamamen ortadan kaldıramadığı gözlemlenmiştir. Bu durum, otovaksinlerin hedeflenen filogenetik gruplar üzerindeki etkisinin daha detaylı analiz edilmesi gerektiğini ortaya koymuş ve filotip çeşitliliğinde suş kaymalarının olabileceğini göstermiştir. Lozica ve diğerlerinin bu çalışması (2021), otovaksinlerin filogenetik gruplar üzerindeki seçici etkilerini ve aşılama stratejilerinin etkinliğini optimize etme gerekliliğini vurgulamaktadır.

Bu çalışmada, 2021 yılında Hırvatistan’da gerçekleştirilen çalışmadan farklı olarak, ticari aşının yüksek virulans potansiyeline sahip filogenetik grupları baskılamada daha etkili olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada, ticari aşının A ve B1 filogruplarının oranını artırdığı tespit edilirken, Lozica ve diğerleri (2021) ticari aşı uygulanan sürülerde filotip çeşitliliğinin A ve F gruplarında yoğunlaştığını bildirmiştir. Ancak Lozica’nın çalışmasında ticari aşının uygulanmasından önceki filotip verilerinin eksik olması, aşının bu değişikliklerdeki etkisinin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesini güçleştirmektedir. Bu durum, filotip dağılımındaki değişikliklerin tam olarak aydınlatılabilmesi için daha geniş kapsamlı verilere duyulan ihtiyacı ortaya koymaktadır.

Son yıllarda Lozica ve çalışma arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir diğer araştırma (Lozica ve diğerleri, 2022), otovaksin uygulamasının *E. coli* genomik çeşitliliği, filogenetik grupları ve antimikrobiyal direnç genleri üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Bu çalışmada, ilk sürülerde ticari aşı, sonraki sürülerde ise otovaksin uygulanmış ve materyal olarak iki çiftlikten klinik vakalardan ve hedef organlardan izole edilen 115 *E. coli* suşu kullanılmıştır. Araştırma, Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) analizi ve genotipik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, antimikrobiyal direnç genlerinin zamanla azaldığını ve otovaksin uygulamasının genetik homojenleşmeye yol açtığını ortaya koymuştur. Ayrıca otovaksin, antimikrobiyal direnç genlerini azaltıcı etkilerinin yanı sıra filogenetik çeşitliliği sınırlayıcı bir baskı mekanizması oluşturduğu belirlenmiştir. Çalışma, bu bulguların daha iyi anlaşılabilmesi ve genetik etkilerin detaylı şekilde incelenmesi için daha geniş kapsamlı araştırmalar yapılması gerektiğini önermiştir.

Üç çalışmanın filogenetik analiz sonuçları, aşılamanın etkilerini genel olarak ortaya koymakla birlikte belirgin farklılıklar sergilemektedir. Bu çalışmada, ticari canlı aşının yüksek

virulanslı filogenetik grupları (B2, C, D) tamamen elimine ettiği tespit edilmiştir. Lozica'nın 2021 araştırmasında ise otovaksinin bazı gruplar üzerinde baskılayıcı bir etkisi olduğu, ancak B2 grubunu tamamen ortadan kaldıramadığı bildirilmiştir. Lozica'nın 2022 çalışmasında, otovaksin uygulamasının genetik homojenleşmeyi sağladığı, ancak yüksek patojeniteli bazı suşların (ör. ST117-F, ST390-B2) direnç göstermeye devam ettiği belirlenmiştir. Bu bulgular, aşının etkilerinin yalnızca filogenetik gruplar düzeyinde değil, aynı zamanda spesifik suşların genetik ve fenotipik özellikleri bağlamında değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Aşılar verilen yanıttaki farklılıklar, çevresel faktörler, aşılama stratejileri ve patojen popülasyonlarındaki genetik çeşitlilik ile doğrudan ilişkilidir. Bu karşılaştırma, farklı aşı türlerinin filogenetik gruplar, suş çeşitliliği ve direnç genleri üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak için geniş kapsamlı araştırmalara olan gereksinim bulunmaktadır.

Elde edilen bulgular, aşılama stratejilerinin farklı filogenetik grupların patojenite potansiyellerine göre değişen etkiler gösterebileceğini ve özellikle yüksek virulanslı filotiplerin kontrolünde önemli bir araç olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Bu durum, aşılama stratejilerinin optimize edilmesi ve bölgesel suş profillerine göre uyarlanmasının önemini vurgulamaktadır.

Bu çalışmada kullanılan Poulvac *E. coli* aşısı, canlı zayıflatılmış bir ticari aşı olup, geniş bir *E. coli* suş yelpazesine karşı koruma sağlamayı amaçlamaktadır. Bununla birlikte, bu aşı, spesifik çiftliklere özgü suşları hedeflemez ve ticari aşıların genellikle çapraz koruma sağladığı, ancak belirli bir genotip veya filotipe yönelik doğrudan seçim baskısı oluşturmadığı bilinmektedir (Zoetis, 2024). Filotip A ve B1, genellikle düşük virulanslı ve kommensal olarak kabul edilir. Çalışma bulgularına göre, aşının, daha virulent filotipler üzerinde baskı oluşturarak filotip A'nın baskın hale gelmesine neden olduğu gözlemlenmiştir. Aşının sağladığı bağışıklık, patojeniteyle ilişkili virulans faktörlerine karşı gelişmektedir; örneğin, fimbrial antijenler, toksinler ve kapsüler antijenler. Filotipler arasında, B2, C, D, E ve F gibi daha yüksek patojeniteye sahip olanlar, aşının hedeflediği faktörleri içerebilir ve bu da filotip dağılımlarını etkileyebilir. Sonuç olarak, ticari aşının patojenik filotipleri baskılayarak düşük patojeniteli suşların baskın hale gelmesine yol açtığı görülmüştür. Bu durum, enfeksiyon şiddetini azaltarak sürü sağlığını iyileştirebilir ve ekonomik kayıpları sınırlayabilir. Bununla birlikte, ticari aşının farklı filotipler üzerindeki etkilerinin optimize edilmesi gerektiği ve aşılama stratejilerinin, hedeflenen patojeniteye dayalı olarak tasarlanmasının, önemli bir avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ticari zayıflatılmış canlı *E. coli* aşısının uygulandığı broyler sürülerinden elde edilen APEC izolatlarının filogenetik gruplarındaki değişiklikler incelenmiş, aşının filogenetik çeşitlilik üzerindeki potansiyel etkileri değerlendirilmiş ve broylerlerin yaşamlarının erken ve geç dönemlerinde elde edilen APEC izolatlarının antibiyotik direnç profilleri analiz edilmiştir.

Elde edilen bulgular, kritik öneme sahip antibiyotiklere karşı düşük direnç oranlarının umut verici olduğunu, ancak siprofloksasin, ampisilin ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı yüksek direnç oranlarının antibiyotik kullanımının dikkatle izlenmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Broylerlerin yaşamlarının ilerleyen dönemlerinde MDR oranlarındaki artış, antimikrobiyal direnç sorununun ciddiyetini ortaya koymuştur.

Aşı sonrası filotip A ve B1'in prevalansında artış gözlemlenirken, daha yüksek virulanslı filotipler olan B2, C ve D'nin ortadan kalkması, aşının patojenik filotipler üzerinde baskı kurarak, daha düşük patojeniteli suşların baskın hale gelmesine yol açtığını göstermektedir. Bu durum, aşının enfeksiyon şiddetini azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda bakteriyel popülasyonda anlamlı filotip kaymalarına neden olabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak, filogenetik değişikliklerin yalnızca aşının etkisiyle açıklanamayacağı ve çevresel faktörlerin, hijyen protokollerinin ve antibiyotik kullanım politikalarının da etkili olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Gelecekteki çalışmalarda bu faktörlerin etkilerini değerlendiren daha ayrıntılı bir analiz önerilmektedir.

B1 grubunun düşük değişkenliği, bu grubun çevresel adaptasyon yeteneği ve aşı baskısına karşı genetik avantajlarını işaret edebilir. Bu grup ile aşının etkileri arasındaki ilişkiyi anlamak, gelecekteki araştırmalar için önemli bir odak noktası olacaktır. Ayrıca, enfeksiyonların yayılımını kontrol altına almak için sıkı biyogüvenlik önlemleri, "hepsi içeri/hepsi dışarı" üretim sistemleri ve yüksek hijyen standartlarının uygulanması gerektiği vurgulanmaktadır. Antibiyotik kullanımının sınırlandırılması ve daha sıkı denetimlerin getirilmesi, direnç gelişiminin engellenmesinde kritik bir adım olacaktır.

Direnç genleri ve virulans faktörlerinin moleküler düzeyde analizi, enfeksiyon dinamiklerini anlamada önemli bir rol oynamaktadır ve bu tür analizler, antibiyotik direnç mekanizmalarının ve aşının etkilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Aşıların uzun vadeli etkilerinin değerlendirilmesi ve filogenetik gruplar ile direnç profillerindeki değişimlerin sürekli izlenmesi, aşılama stratejilerinin optimize edilmesine katkı sağlayacaktır.

Veteriner hekimler ve çiftlik çalışanlarına yönelik eğitim programları, enfeksiyon kontrolü, antibiyotik kullanımı ve biyogüvenlik önlemleri hakkında farkındalığı artırmak için kritik öneme sahiptir. Aşıların etkinliğini artırmak için yerel suşlara özgü ticari aşıların geliştirilmesi ve bölgesel patojenik profillerin sürekli izlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmalar, gelecekteki aşılama stratejilerinin etkinliğini daha da artıracak ve enfeksiyon kontrolü ile ekonomik kayıpların azaltılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Alber, A., Stevens, M.P., Vervelde, L. (2021). The bird's immune response to avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Pathology*, 50:382–391. doi:10.1080/03079457.2021.1873246
- Awad, A.M., El-Shall, N.A., Khalil, D.S., Abd El Hack, M.E., Swelum, A.A., Mahmoud, A.H., ... M.E.Sedeik. (2020). Incidence, pathotyping, and antibiotic susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* among diseased broiler chicks. *Pathogens*, 9:114–128. doi:10.3390/pathogens9020114
- Azam, M., Mohsin, M., Rahman, S.U., Saleemi, M.K. (2019). Virulence associated genes and antimicrobial resistance among avian pathogenic *Escherichia coli* from colibacillosis affected broilers in Pakistan. *Tropical Animal Health and Production*, 51:1259–1265. doi:10.1007/s11250-019-01823-3
- Azam, M., Mohsin, M., Johnson, T.J., Smith, E.A., Johnson, A., Umair, M., ... Rahman, S.U. (2020). Genomic land scape of multi-drug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* recovered from broilers. *Veterinary Microbiology*, 247:108766. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108766
- Barbieri, N.L., Vorde, J.A.V., Baker, A.R., Horn, F., Li, G., Logue, C.M., Nolan, L.K. (2017). FNR regulates the expression of important virulence factors contributing to the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7:265. doi:10.3389/fcimb.2017.00265
- BD Phoenix-Otomatik Bakteri İdentifikasyon ve Antibiyotik Duyarlılık Testi. (2023). <https://www.bd.com/en-uk/offerings/capabilities/microbiology-solutions/clinical-microbiology/identification-and-susceptibility-testing/bd-phoenix-automated-identification-and-susceptibility-testing-system>, adresinden erişildi.
- Caneschi, A., Bardhi, A., Barbarossa, A., Zaghini, A. (2023). The use of antibiotics and antimicrobial resistance in veterinary medicine, a complex phenomenon: a narrative review. *Antibiotics*, 12(3):487. doi:10.3390/antibiotics12030487

- Castro, J., Barros, M.M., Araujo, D., Campos, A.M., Oliveira, R., Silva, S., Almeida, C. (2022). Swine enteric colibacillosis: current treatment avenues and future directions. *Frontiers in Veterinary Science*, 9:981207. doi:10.3389/fvets.2022.981207
- Chatterjee, A., Singh, S., Rai, R., Rai, S., Rai, L.C. (2020). Functional characterization of Alr0765, a hypothetical protein from *Anabaena* PCC7120 involved in cellular energy status sensing, iron acquisition and a biotic stress management in *E. coli* using molecular, biochemical and computational approaches. *Current Genomics*, 21:295–310. doi:10.2174/1389202921999200424181239
- Christensen, H., Bachmeier, J., Bisgaard, M. (2021). New strategies to prevent and control avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Avian Pathology*, 50(5):370–381. doi:10.1080/03079457.2020.1845300
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:4555–4558. doi:10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M. (2013). The clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5:58–65. doi:10.1111/1758-2229.12019
- Clermont, O., Lescat, M., O'Brien, C.L., Gordon, D.M., Tenaillon, O., Denamur, E. (2008). Evidence for a human specific *Escherichia coli* clone. *Environmental Microbiology*, 10:1000–1006. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01520.x
- Clermont, O., Dixit, O.V.A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., ... Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*, 21:3107–3117. doi:10.1111/1462-2920.14713
- Delannoy, S., Schouler, C., Souillard, R., Yousfi, L., Devendec, L.L., Lucas, C., ... Kempf, I. (2021). Diversity of *Escherichia coli* strains isolated from day-old broiler chicks, their environment and colibacillosis lesions in 80 flocks in France. *Veterinary Microbiology*, 252:108923. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108923

- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 19:37–54. doi:10.1038/s41579-020-0416-x
- EUCAST. (2022). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 12.0. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf, adresinden erişildi.
- Ezzeroug Ezzraimi, A., Hannachi, N., Mariotti, A., Rolain, J.M., Camoin-Jau, L. (2022). Platelets and *Escherichia coli*: a complex interaction. *Biomedicines*, 10:1636. doi:10.3390/biomedicines10071636
- Ghunaim, H., Abu-Madi, M.A., Kariyawasam, S. (2014). Advances in vaccination against avian pathogenic *Escherichia coli* respiratory disease: potentials and limitations. *Veterinary Microbiology*, 172:13–22. doi:10.1016/j.vetmic.2014.04.019
- Hu, J., Afayibo, D.J.A., Zhang, B., Zhu, H., Yao, L., Guo, W., ... Wang, S. (2022). Characteristics, pathogenic mechanism, zoonotic potential, drug resistance, and prevention of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Frontiers in Microbiology*, 13:1049391. doi:10.3389/fmicb.2022.1049391
- Kabiswa, W., Nanteza, A., Tumwine, G., Majalija, S. (2018). Phylogenetic groups and antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* from healthy chicken in Eastern and Central Uganda. *Journal of Veterinary Medicine*, 2018:9126467. doi:10.1155/2018/9126467
- Kathayat, D., Lokesh, D., Ranjit, S., Rajashekara, G. (2021). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): an overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies. *Pathogens*, 10(4):467. doi:10.3390/pathogens10040467
- Khairullah, A.R., Afnani, D.A., Riwu, K.H.P., Widodo, A., Yanestria, S.M., Moses, I.B., ... Raissa, R. (2024). Avian pathogenic *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and pathogenesis, diagnosis, pathophysiology, transmission, vaccination, and control. *Veterinary World*, 17(12):2747–2762. doi:10.14202/vetworld.2024.2747-2762
- Kimura, A.H., Koga, V.L., de Souza Gazal, L.E., de Brito, B.G., de Brito, K.C.T., Navarro-Ocana, A., ... Kobayashi, R.K.T.K. (2021). Characterization of multidrug-resistant

- avian pathogenic *Escherichia coli*: an outbreak in canaries. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52:1005–1012. doi:10.1007/s42770-021-00443-0
- Kot, B. (2019). Antibiotic resistance among uropathogenic *Escherichia coli*. *Polish Journal of Microbiology*, 68:403–415. doi:10.33073/pjm-2019-048
- Kumar, H., Chen, B.H., Kuca, K., Nepovimova, E., Kaushal, A., Nagraik, R., ... Kumar, D. (2020). Understanding of colistin usage in food animals and available detection techniques: a review. *Animals*, 10(10):1892. doi:10.3390/ani10101892
- Larsson D.G.J., Flach, C.F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5):257-269. doi:10.1038/s41579-021-00649-x
- Lescat, M., Clermont, O., Woerther, P.L., Glodt, J., Dion, S., Skurnik, D., ... Denamur, E. (2013). Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host dependant population structure. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1):49-57. doi:10.1111/j.1758-2229.2012.00374.x
- Li, Q., Yin, L., Xue, M., Wang, Z., Song, X., Shao, Y., ... Qi, K. (2020). The transcriptional regulator PhoP mediates the tolC molecular mechanism on APEC biofilm formation and pathogenicity. *Avian Pathology*, 49:211–220. doi:10.1080/03079457.2019.1701182
- Lozica, L., Kabalin, A.E., Dolencic, N., Vlahek, M., Gottstein, Z. (2021). Phylogenetic characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* strains longitudinally isolated from broiler breeder flocks vaccinated with autogenous vaccine. *Poultry Science*, 100:101079. doi:10.1016/j.psj.2021.101079
- Lozica, L., Villumsen, K.R., Li, G., Hu, X., Maljković, M.M., Gottstein, Ž. (2022). Genomic analysis of *Escherichia coli* longitudinally isolated from broiler breeder flocks after the application of an autogenous vaccine. *Microorganisms*, 10: 377. doi: 10.3390/microorganisms10020377
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., ... Monnet, D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug resistant and pandrug resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18:268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

- Maniatis, T., Sambrook, J. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, USA.
- McMullin, P. (2022). Infectious diseases in free-range compared to conventional poultry production. *Avian Pathology*, 51(5):424-434. doi:10.1080/03079457.2022.2086448
- Meng, J., Wang, J., Zhu, J., Li, S., Qiu, T., Wang, W., ... Liu, J. (2023). Bacteriostatic effects of yujin powder and its components on clinical isolation of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Sciences*, 10:328–342. doi:10.3390/vetsci10050328
- Miglani, S. (2023). APEC report. *Australian Endodontic Journal*, 49:466–467. doi:10.1111/aej.12818
- Murase, K., Martin, P., Porcheron, G., Houle, S., Helloin, E., Penary, M., ... Oswald, E. (2016). HlyF produced by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a virulence factor that regulates outer membrane vesicle biogenesis. *The Journal of Infectious Diseases*, 213:856–865. doi:10.1093/infdis/jiv506
- Nadalian, B., Nadalian, B., Hourri, H., Shahrokh, S., Abdehagh, M., Yadegar, A., Ebrahimipour, G. (2022). Phylogrouping and characterization of *Escherichia coli* isolated from colonic biopsies and fecal samples of patients with flare of inflammatory bowel disease in Iran. *Frontiers in Medicine*, 9:985300. doi:10.3389/fmed.2022.985300
- Nawaz, S., Wang, Z., Zhang, Y., Jia, Y., Jiang, W., Chen, Z., ... Han, X. (2024). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): current insights and future challenges. *Poultry Science*, 103:104359. doi:10.1016/j.psj.2024.104359
- Nechypurenko, O.O., Avdeeva, L.V., Dreval, D.V., Sobko, I.O. (2024). Avian pathogenic *Escherichia coli* and its antibiotic resistance. *Microbiological Journal*, 5:61-74. doi:10.15407/microbiolj86.05.061
- Nielsen, D.W., Ricker, N., Barbieri, N.L., Allen, H.K., Nolan, L.K., Logue, C.M. (2020). Outer membrane protein A (OmpA) of extra intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *BMC Research Notes*, 13:51. doi:10.1186/s13104-020-4917-5
- Osman, K.M., Kappell, A.D., Elhadidy, M., ElMougy, F., El-Ghany, W.A.A., Orabi, A., ... Yousef, H.M.Y. (2018). Poultry hatcheries as potential reservoirs for antimicrobial-

- resistant *Escherichia coli*: a risk to public health and food safety. *Scientific Reports*, 8:5859. doi:10.1038/s41598-018-23962-7
- Panth, Y. (2019). Colibacillosis in poultry: a review. *Journal of Agriculture and Natural Resources*, 2(1):301-311. doi:10.3126/janr.v2i1.26094
- Pourhassan, Z.N., Cui, H., Muckhoff, N., Davari, M.D., Smits, S.H.J., Schwaneberg, U., Schmitt, L. (2023). A step forward to the optimized HlyA type1 secretion system through directed evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107:5131–5143. doi:10.1007/s00253-023-12653-7
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S., Hartigan, P.J. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*, (2nd ed.), Wiley-Blackwell.
- Rezatofghi, S.E., Najafifar, A., Badouei, M.A., Peighambari, S.M., Soltani, M. (2021). An integrated perspective on virulence associated genes (VAGs), antimicrobial resistance (AMR), and phylogenetic clusters of pathogenic and non-pathogenic avian *Escherichia coli*. *Frontiers in Veterinary Science*, 8:758124. doi:10.3389/fvets.2021.758124
- Seferoğlu, Y., Türkyılmaz, M.K., Türkyılmaz, S. (2024). Investigation of antibiotic resistance, phylogenetic groups and clonal relationships of colistin resistant *Escherichia coli* isolates obtained from broilers. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 79(1): 27-40.
- Sgariglia, E., Mandolini, N.A., Napoleoni, M., Medici, L., Fraticelli, R., Conquista, M., ... Perugini, G. (2019). Antibiotic resistance pattern and virulence genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from different breeding systems. *Veterinaria Italiana*, 55:26–33. doi:10.12834/Vetlt.1617.8701.1
- Tang, K.L., Caffrey, N.P., Nóbrega, D.B., Cork, S.C., Ronksley, P.E., Barkema, H.W., ... Ghali, W.A. (2017). Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary Health*, 1:316–327. doi:10.1016/S2542-5196(17)30141-9
- Temmerman, R., Garmyn, A., Antonissen, G., Vanantwerpen, G., Vanrobaeys, M., Haesebrouck, F., Devreese, M. (2020). Evaluation of fluoroquinolone resistance in clinical avian pathogenic *Escherichia coli* isolates from Flanders (Belgium). *Antibiotics (Basel)*. 9(11):800. doi:10.3390/antibiotics9110800

- Thomrongsuwannakij, T., Blackall, P.J., Djordjevic, S.P., Cummins, M.L., Chansiripornchai, N. (2020). A comparison of virulence genes, antimicrobial resistance profiles and genetic diversity of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolates from broilers and broiler breeders in Thailand and Australia. *Avian Pathology*, 49:457–466. doi:10.1080/03079457.2020.1764493
- Tu, J., Huang, B., Zhang, Y., Zhang, Y., Xue, T., Li, S., Qi, K. (2016). Modulation of virulence genes by the two-component system Pho P-Pho Q in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19:31–40. doi:10.1515/pjvs-2016-0005
- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D., White, M.R.H. (2004). Çeviren Konuk, M., *Moleküler biyoloji: önemli notlar*. Ankara: Nobel Yayınları.
- Wang, S., Xu, X., Liu, X., Wang, D., Liang, H., Wu, X., ... Yu, S. (2017). *Escherichia coli* type III secretion system 2 regulator EtrA promotes virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 163:1515–1524. doi:10.1099/mic.0.000525
- Xu, H., Ling, J., Gao, Q., He, H., Mu, X., Yan, Z., ..., Liu, X. (2013). Role of the lpxM lipid A biosynthesis pathway gene in pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* strain E058 in a chicken infection model. *Veterinary Microbiology*, 166: 516–526. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.05.030
- Xu, D., Zuo, J., Chen, Z., Lv, X., Hu, J., Wu, X., ... Han, X. (2017). Different activated methyl cycle pathways affect hepatic pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 211:160–168. doi:10.1016/j.vetmic.2017.10.017
- Xu, X., Sun, Q., Zhao, L. (2019). Virulence factors and antibiotic resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* in Eastern China. *Journal of Veterinary Research*, 63:317–320. doi:10.2478/jvetres-2019-0056
- Yin, L., Li, Q., Xue, M., Wang, Z., Tu, J., Song, X., ... Qi, K. (2019). The role of the phoP transcriptional regulator on biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Pathology*, 48:362–370. doi:10.1080/03079457.2019.1605147
- Yu, L., Wang, H., Han, X., Li, W., Xue, M., Qi, K., ... Xue, T. (2020). The two-component system, BasSR, is involved in the regulation of biofilm and virulence in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Pathology*, 49:532–546. doi:10.1080/03079457.2020.1781791

- Yu, L., Li, W., Qi, K., Wang, S., Chen, X., Ni, J., ... Xue, T. (2019). Mcb Risin volved in biofilm formation and H₂O₂ stress response in avian pathogenic *Escherichia coli* X40. *Poultry Science*, 98:4094–4103. doi:10.3382/ps/pez205
- Zhao, S., Wang, C.L., Chang, S.K., Tsai, Y.L., Chou, C.H. (2019). Characterization of *Escherichia coli* isolated from day old chicken fluff in Taiwanese hatcheries. *Avian Diseases*, 63:9–16. doi:10.1637/11935-072318-Reg.1
- Zhuge, X., Sun, Y., Jiang, M., Wang J., Tang, F., Xue, F., ... Dai, J. (2019). Acetate metabolic requirement of avian pathogenic *Escherichia coli* promotes its intracellular proliferation with in macrophage. *Veterinary Research*, 50:31. doi:10.1186/s13567-019-0650-2
- Zhuge, X., Zhou, Z., Jiang, M., Wang, Z., Sun, Y., Tang, F., ... Dai, J. (2021). Chicken source *Escherichia coli* with in phylogroup F shares virulence genotypes and is closely related to extraintestinal pathogenic *E. coli* causing human infections. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68:880–895. doi:10.1111/tbed.13755
- Zoetis: Poulvac *E. coli*. (2024). *Escherichia coli modified-live vaccine*. <https://www.zoetisus.com/products/poultry/poulvac-e-coli>, adresinden erişildi.
- Zuo, J., Tu, C., Wang, Y., Qi, K., Hu, J., Wang, Z., ... Han, X. (2019). The role of the *wzy* gene in lipopolysaccharide biosynthesis and pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 127:296–303. doi:10.1016/j.micpath.2018.12.021