



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANA BİLİM DALI**

**NEONATAL SEPTİSEMİLİ BUZAĞI KÖKENLİ
ESCHERİCHİA COLİ İZOLATLARINDA
ENTEROTOKSİJENİK VİRÜLENS GENLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

Serhan AKGÖZ

Danışman
Prof. Dr. Timur GÜLHAN

SAMSUN

2023

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANA BİLİM DALI



NEONATAL SEPTİSEMİLİ BUZAĞI KÖKENLİ
ESCHERİCHİA COLİ İZOLATLARINDA
ENTEROTOKSİJENİK VİRÜLENS GENLERİNİN
BELİRLENMESİ

Doktora Tezi

Serhan AKGÖZ

Danışman

Prof. Dr. Timur GÜLHAN

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.21.031 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN

2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Serhan AKGÖZ tarafından, Prof. Dr. Timur GÜLHAN danışmanlığında hazırlanan “NEONATAL SEPTİSEMİLİ BUZAĞI KÖKENLİ *ESCHERİCHİA COLİ* İZOLATLARINDA ENTEROTOKSİJENİK VİRÜLENS GENLERİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 7.8.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı	
	Üniversitesi	
	Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Timur GÜLHAN	
	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	☒ Kabul
	Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı	☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ	
	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	☒ Kabul
	Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı	☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Mehmet TÜTÜNCÜ	
	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	☒ Kabul
	Veterinerlik İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı	☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Ziya İLHAN	
	Balıkesir Üniversitesi	☒ Kabul
	Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı	☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Hasan SOLMAZ	
	Karabük Üniversitesi	☒ Kabul
	Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı	☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

01/06/2023
Serhan AKGÖZ

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : NEONATAL SEPTİSEMİLİ BUZAĞI KÖKENLİ
ESCHERİCHİA COLİ İZOLATLARINDA ENTEROTOKSİJENİK VİRÜLENS
GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 01/06/2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 8

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

01/06/2023
Prof. Dr. Timur GÜLHAN

ÖZET

NEONATAL SEPTİSEMİLİ BUZAĞI KÖKENLİ *ESCHERİCHIA COLI* İZOLATLARINDA ENTEROTOKSİJENİK VİRÜLENS GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Serhan AKGÖZ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı

Doktora, Ağustos/2023

Danışman: Prof. Dr. Timur GÜLHAN

Neonatal buzağı ishallerine neden olan önemli bakteriyel etkenlerden birisi Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)'dir. ETEC enfeksiyonlarının patogeneğinde en önemli virülens faktörleri fimbrial adhezinler ve enterotoksinlerdir. Bu çalışma neonatal septisemili buzağılardan *E. coli* izolasyonu, fenotipik ve genotipik karakterizasyonu, izolatlardaki antibiyotik direnç patternlerinin tespiti, sık görülen serotip ve virülens faktörlerinin tespiti amacıyla yapıldı. Bu amaçla neonatal septisemili buzağılardan izole edilen ve fenotipik olarak *Escherichia coli* oldukları bilinen izolatların genotipik doğrulanması PCR ile araştırıldı. Doğrulan izolatlarda septisemili buzağılarda O101, O9, O26, O145, O111 serotip genleri, F17, F5, F41, Stabil Toksin, Labil Toksin, EAST1 virülens genleri ve 8 farklı antibiyotiğe ait direnç genleri PCR ile incelendi. İzolatların 8 farklı antibiyotiğe dirençlilik/duyarlılık durumları Kirby-Bauer standart disk difüzyon testi kullanılarak belirlendi. Çalışma sonucunda incelenen 200 dışkı örneğinden 95 (%47,5) *E. coli* izole ve identifiye edildi. Fenotipik antibiyotik direnç analizine göre izolatlar %94,7 streptomisine, %93,7 tetrasikline, %89,5 ampisiline, %87,4 trimetoprim-sulfametoksazole, %87,4 kloromfenikole, %74,7 enrofloksasine, %62,1 gentamisine ve %24,2 sefalotine karşı dirençli bulundu. Öte yandan izolatların %88,4'ünde *tet(B)*, %74,7'sinde *sul3*, %67,4'ünde *sul1*, %61'inde *cmlA*, %56,8'inde *qnr(B)*, %54,7'sinde *tet(A)*, %53,7'sinde *sul2*, %38,9'unda *CITM*, %36,8'inde *aadA1*, %28,4'ünde *cat1*, %26,3'ünde *qnr(S)*, %12,6'sında *aac[3]-IV*, %5,3'ünde *tet(C)* ve %1,05'inde *qnr(A)* genleri belirlendi. İzolatların hiçbirinde *blaSHV* geni tespit edilemedi. Serogenotiplendirme sonucunda izolatlar O101, O26 ve O145 serotip geni varlığına göre sırasıyla %33,7, %6,3 ve %2,1 oranında pozitif bulundu. Hiçbir izolatta O111 ve O9 serotipi saptanamadı. Virülens genlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan PCR çalışmaları sonucunda; %23,2 izolatın *East1*, %22,1 izolatın *F5*, %20 izolatın *STa*, 17 izolatın %17,9 *F41* ve %3,2 izolatında *LT* genine sahip olduğu tespit edildi. Böylece örnekleme yapıldığı bölgede neonatal septisemili buzağılarda ETEC varlığı, yaygınlığı, izolatların patotip/virotip dağılımı belirlenerek bu virülens faktörlerinin hastalıkla ilişkisi ortaya konuldu ve hastalığın tedavisinde kullanılabilecek en uygun antibiyotik seçeneği belirlendi. Çalışma kapsamında elde edilen verilerin daha sonra yerli ve milli aşı çalışmalarına katkı sağlayabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Sözcükler: Antibiyotik direnci, Buzağı, *E. coli*, Serotip, Virülens

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF ENTEROTOXIGENIC VIRULENCE GENES IN CALF ORIGINATED *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES WITH NEONATAL SEPTICEMIA

Serhan AKGÖZ

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Veterinary Microbiology

Ph.D., August/2023

Supervisor: Prof. Dr. Timur GÜLHAN

One of the important bacterial agents causing neonatal calf diarrhea is Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). The most important virulence factors in the pathogenesis of ETEC infections are fimbrial adhesins and enterotoxins. This study was conducted for the isolation of *E. coli* from calves with neonatal septicemia, its phenotypic and genotypic characterization, the determination of antibiotic resistance patterns, the determination of common serotypes and virulence factors in isolates. For this purpose, genotypic confirmation of isolates isolated from calves with neonatal septicemia and known phenotypically to be *E. coli* was investigated by PCR. O101, O9, O26, O145, O111 serotype genes, F17, F5, F41, ST, LT, EAST1 virulence genes and resistance genes of 8 different antibiotics in calves with septicemia in confirmed isolates analyzed by PCR. The resistance/sensitivity status to 8 different antibiotics formed were determined using the Kirby-Bauer standard disc diffusion test. As a result of the study, 95 (47.5%) *E. coli* were isolated and identified from 200 stool samples. According to the phenotypic antibiotic resistance analysis, the isolates were 94.7% streptomycin, 93.7% tetracycline, 89.5% ampicillin, 87.4% trimethoprim-sulfamethoxazole, 87.4% chloramphenicol, 74.7% enrofloxacin, 62.1% gentamicin and 24.2% was found to be resistant to cephalothin. 88.4% of the isolates were tet(B), 74.7% sul3, 67.4% sul1, 61% cmlA, 56.8% qnr(B), 54.7% tet(A), 53.7% sul2, 38.9% CITM, 36.8% aadA1, 28.4% cat1, 26.3% qnr(S), 12.6% aac[3]-IV, 5.3% tet(C) and qnr(A) genes were detected in 1.05%. No blaSHV gene could be detected in any of the isolates. According to the presence of O101, O26 and O145 serotype genes, the isolates were found to be 33.7%, 6.3% and 2.1%, respectively, as a result of serogenotyping. O111 and O9 serotypes were not detected in any of the isolates. As a result of PCR studies carried out to determine virulence genes; It was determined that 23.2% isolates had East1, 22.1% isolates F5, 20% isolates STa, 17 isolates 17.9% F41 and 3.2% isolates LT. Thus, the presence, prevalence of ETEC in calves with neonatal septicemia in the sampling region, the pathotype/viotype distribution of the isolates were determined, and the relationship between these virulence factors and the disease was determined, and the most appropriate antibiotic option that could be used in the treatment of the disease was determined. It was concluded that the data obtained within the scope of the study could contribute to domestic and national vaccine studies later on.

Keywords: Antibiotic resistance, Calf, *E. coli*, Serotype, Virulence

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, kıymetli bilgi ve deneyimlerinden faydalanarak bugünlere gelmemi sağlayan değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Timur GÜLHAN'a şükranlarımı sunuyorum.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle her zaman bana yol gösteren ve destek olan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ, Prof. Dr. Arzu Fındık, Prof. Dr. Oktay GENÇ'e teşekkür ederim.

Çalışmalarındaki yardımları için Araş. Gör. Merve Gizem SEZENER, Veteriner Hekim Volkan Enes ERGÜDEN, Veteriner Hekim Şeyda YAMAN, Veteriner Hekim Kübra KİREZ, Araş. Gör. Evrim GENÇ, Araş. Gör. Cumali KAYA, Ziraat Mühendisi Zeki ÇAĞLAYAN, Veteriner Hekim Serhat ÇAKMAK, Veteriner Hekim İbrahim ŞAHİN, Veteriner Hekim Tanju GÜLEN ve Veteriner Hekim Ali Haydar ADIGÜZEL'e teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi desteklerini hayatım boyunca hissettiğim, verdiğim her kararda arkamda duran ve bu hayattaki en büyük şansım olan annem Demet ALAOĞLU ve babam Erhan AKGÖZ'e her zaman yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Aşı tematik alanında YÖK 100/2000 Doktora Projesi kapsamında mezun olmamı sağlayan Yükseköğretim Kurulu'na çok teşekkür ederim.

Bu çalışma PYO.VET.1904.21.031 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Serhan AKGÖZ

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. <i>E. coli</i> Patotipleri	12
2.1.1. İntestinal <i>E. coli</i> Patotipleri	12
2.1.1.1. Enteropatojenik <i>E. coli</i>	12
2.1.1.2. Enterohemorajik <i>E. coli</i>	15
2.1.1.3. Enterotoksijenik <i>E. coli</i>	19
2.1.1.4. Nekrotoksijenik <i>E. coli</i>	31
2.1.1.5. Enteroinvaziv <i>E. coli</i>	32
2.1.1.6. Enteroagregatif <i>E. coli</i>	32
2.1.1.7. Diffüz Adherent <i>E. coli</i>	33
2.1.1.8. Adherent İnvaziv <i>E. coli</i>	34
2.1.2. Ekstraintestinal <i>E. coli</i> Patotipleri	35
2.1.2.1. Uropatojenik <i>E. coli</i>	35
2.1.2.2. Avian Patojenik <i>E. coli</i>	35
2.1.2.3. Neonatal Meningitise Neden Olan <i>E. coli</i>	37
2.2. Antibiyotikler	37
2.2.1. Antibiyotiklerin Tarihçesi	37
2.2.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizması	40
2.2.2.1. Hücre Duvarı Sentezinin İnhibisyonu	41
2.2.2.2. Protein Sentezinin İnhibisyonu	41
2.2.2.3. Nükleik Asit Sentezinin İnhibisyonu	42
2.2.2.4. Sitoplazmik Membran Fonksiyonunun İnhibisyonu	42
2.2.2.5. Metabolik Yolların İnhibisyonu	43
2.2.3. Antibiyotiklerin Direnci ve Direnç Mekanizmaları	43
2.2.3.1. Antibiyotiğin Enzimatik İnaktivasyonu Nedeniyle Gelişen Direnç	44
2.2.3.2. Antibiyotik Hedef Bölgelerinin Değişikliği Nedeniyle Gelişen Direnç	45
2.2.3.3. Aktif Pompa Sistemi Nedeniyle Gelişen Direnç	45
2.2.3.4. Permeabilitenin Azalması Nedeniyle Gelişen Direnç	46
2.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	46
2.3. Aşı	48
2.3.1. Sığır <i>E. coli</i> Aşları	49
2.3.1.1. Enterohemorajik/Shigatoksijenik <i>E. coli</i> Aşı Çalışmaları	49
2.3.1.1. Mastitis Kaynaklı <i>E. coli</i> Aşı Çalışmaları	56
2.3.1.1. Enterotoksijenik <i>E. coli</i> Aşı Çalışmaları	61
2.3.1.1. <i>E. coli</i> Ticari Aşları	67
3. MATERYAL VE METOT	71
3.1. Örnek Toplama ve Fenotipik İdentifikasyon	71
3.2. DNA Ekstraksiyonu	71
3.3. <i>E. coli</i> 'nin Genotipik Olarak Doğrulanması	71
3.4. Antibiyotik Dirençlilik Tespiti	72
3.4.1. Disk Difüzyon Metodu	72

3.4.2. Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi	73
3.5. Serotip Dağılımının Belirlenmesi	77
3.6. Virülens Genlerinin Belirlenmesi	78
4. BULGULAR.....	81
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	81
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	81
4.3. <i>Antibiyotik</i> Direnç Genlerinin Belirlenmesi.....	85
4.4. Serotip Genlerinin Belirlenmesi.....	89
4.5. Virülens Genlerinin Tespiti.....	92
5. TARTIŞMA.....	98
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	110
KAYNAKÇA.....	112
ÖZGEÇMİŞ.....	145



SİMGELER VE KISALTMALAR

AIEC	: Adherent İnvaziv <i>E. coli</i>
APEC	: Avian Patojenik <i>E. coli</i>
BVDV	: Bovine Viral Diarrhea Virus
CFA	: Kolonizan Faktör Antijenleri
CNF	: Sitotoksik Nekrotizan Faktör
DAEC	: Diffuz Adherent <i>E.coli</i>
EAEC	: Enteroagregatif <i>E. coli</i>
EAF	: EPEC Adezyon faktörü
EAST1	: Enteroagregatif Stabil Toksin-1
EHEC	: Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EIEC	: Enteroinvaziv <i>E. coli</i>
EPEC	: Enteropatojenik <i>E. coli</i>
Esp	: <i>E. coli</i> Salgı Proteini
ETEC	: Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
ExPEC	: Ekstraintestinal <i>E. coli</i>
HC	: Hemorajik Kolit
HUS	: Hemolitik Üremi Sendromu
İnt	: İntimin
LT	: Labil Toksin
MİC	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MPEC	: Meme Patojenik <i>E. coli</i>
NMEC	: Neonatal Meningitise Neden Olan <i>E. coli</i>
NTEC	: Nekrotoksijenik <i>E. coli</i>
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SePEC	: Septisemik Patojenik <i>E. coli</i>
ST	: Stabil Toksin
STEC	: Shiga Toksijenik <i>E.coli</i>
Stx	: Shiga Toksin
T3SS	: Tip 3 Sekresyon Sistemi
Tir	: Transloke intimin reseptörü
UPEC	: Üropatojenik <i>E.coli</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>E. coli</i> referans koleksiyonunun (ECOR) filogenetik soyları	8
Şekil 2.2. Patojenik <i>E. coli</i> 'nin evrimine mobil genetik elementlerin katkısı	10
Şekil 2.3. EPEC ve EHEC'in neden olduğu bağlanma ve yok etme (attaching/effacing) lezyonlarının histopatolojisi	13
Şekil 2.4. EPEC patogenezi	15
Şekil 2.5. EHEC bulaşma yolları	16
Şekil 2.6. Shiga toksin (Stx) şematik diyagramı	18
Şekil 2.7. ETEC enterotoksinlerin reseptörleri ve etki mekanizması	29
Şekil 2.8. Antibiyotiklerin etki mekanizması	40
Şekil 2.9. Fenotipik antibiyotik duyarlılık testleri	47
Şekil 4.1. Fenotipik ve genotipik olarak izole ve identifiye edilen <i>E. coli</i> sayısı	81
Şekil 4.2. <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotik dirençlilik oranları	82
Şekil 4.3. Sülfonamid direncine neden olan <i>sul1</i> (433 bp), <i>sul2</i> (721 bp) ve <i>sul3</i> (244 bp) genlerinin mPCR ile belirlenmesi	85
Şekil 4.4. Tetrasiklin direncine neden olan <i>tet(A)</i> (502 bp), <i>tet(B)</i> (173 bp) ve <i>tet(C)</i> (888 bp) genlerinin mPCR ile belirlenmesi	86
Şekil 4.5. Florokinolon direncine neden olan <i>qnr(A)</i> (580 bp), <i>qnr(B)</i> (264 bp) ve <i>qnr(S)</i> (428 bp) genlerinin mPCR ile belirlenmesi	86
Şekil 4.6. Gentamisin direncine neden olan <i>aac[3]-IV</i> (111 bp), streptomisin direncine neden olan <i>aadA1</i> (447 bp), kloramfenikol direncine neden olan <i>cmlA</i> (698) ve <i>cat1</i> (547 bp) genlerinin mPCR ile belirlenmesi	87
Şekil 4.7. Ampisilin direncine neden olan <i>CITM</i> (462 bp) geninin PCR ile belirlenmesi	87
Şekil 4.8. <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotik direnç geni varlığı	88
Şekil 4.9. <i>O101</i> (507 bp) geninin PCR ile belirlenmesi	89
Şekil 4.10. <i>O26</i> (423 bp) geninin PCR ile belirlenmesi	90
Şekil 4.11. <i>East1</i> (111 bp) geninin PCR ile belirlenmesi	92
Şekil 4.12. <i>F5</i> (314 bp) geninin PCR ile belirlenmesi	93
Şekil 4.13. <i>STa</i> (190 bp) ve <i>F41</i> (380 bp) genlerinin mPCR ile belirlenmesi	93

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. <i>Escherichia</i> cinsi içerisindeki türlerin bazı biyokimyasal özellikleri	3
Tablo 2.1. Patogenik <i>E. coli</i> tiplerinin klinik semptomları ve başlıca virülens faktörleri	11
Tablo 2.2. ETEC fimbriaların çapları ve konak hayvan türleri.....	20
Tablo 2.3. Hayvanlarda ETEC'e bağlı hastalıklarda rol oynayan toksinler ve fimbrialar	22
Tablo 2.4. Klinikte kullanıma sunulan antibiyotik sınıflarının keşif yılı ve kaynakları	39
Tablo 2.5. Antibiyotiklerin etki mekanizmasına göre hedef bölge, antibiyotik sınıfı ve etken maddeleri	40
Tablo 2.6. Protein sentezi inhibisyonuna neden olan antibiyotiklerin etki mekanizması	42
Tablo 2.7. MPEC'e karşı kullanılan ticari aşılar.....	68
Tablo 2.8. ETEC'e karşı kullanılan ticari aşılar.....	69
Tablo 2.9. Türkiye'de ruhsatlı olmayan ticari aşılar	70
Tablo 3.1. Antibiyotik direnç genlerinin tespitinde kullanılan PCR bileşenlerinin konsantrasyonu	75
Tablo 3.2. Antibiyotik direnç genlerinin tespitinde kullanılan primerler ve PCR koşulları .	76
Tablo 3.3. Serotip genlerinin tespitinde kullanılan PCR bileşenlerinin konsantrasyonu	77
Tablo 3.4. Serotip genlerinin tespitinde kullanılan primerler ve PCR koşulları	78
Tablo 3.5. Virülens genlerinin tespitinde kullanılan PCR bileşenlerinin konsantrasyonu....	80
Tablo 3.6. Virülens genlerinin tespitinde kullanılan primerler ve PCR koşulları.....	80
Tablo 4.1. <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotik dirençlilik/duyarlılık oranları	81
Tablo 4.2. <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotik direnç profilleri	82
Tablo 4.3. <i>E. coli</i> izolatlarının çoklu antibiyotik dirençlilik sonuçları	84
Tablo 4.4. <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotik direnç geni oranları	88
Tablo 4.5. İzolatların antibiyotik direncinin fenotipik ve genotipik olarak birlikte incelenmesi	89
Tablo 4.6. <i>E. coli</i> izolatlarının serotiplendirme (genotipik) sonuçları	90
Tablo 4.7. <i>E. coli</i> izolatlarının virülens gen sonuçları	93
Tablo 4.8. <i>E. coli</i> izolatlarının tekli ve çoklu virülens gen profilleri (virotip).....	95
Tablo 4.9. İzolatların virotipine göre antibiyotik dirençlik sonuçları	96
Tablo 4.10. İzolatların virülens gen profillerine göre antibiyotik dirençlik sonuçları	96

1. GİRİŞ

Sığır yetiştiriciliğinde temel amaç her inekten yılda bir kez yavru alınmasıdır. Bakım, besleme masrafları ve doğum için beklenen süre nedeniyle doğan yavrunun sağlıklı olması, hayvancılık işletmeleri açısından büyük önem taşımaktadır. Sağlıklı bir yavru elde etmek gebe sığırın doğru bakım ve beslenmesi ile başlar, buzağının sağlıklı bir ortamda doğumuyla ve yeterli düzeyde ağız sütü (kolostrum) alımıyla devam eder. Diğer memelilerde olduğu gibi buzağılar da doğduklarında yeterli düzeyde bağışıklığa sahip değildir. Bu nedenle yeni doğan buzağının kuru madde, vitamin, mineral ve antikor oranı yüksek bir salgı olan kolostrumu alması, altlığın ve çevrenin kontamine olmaması, ısı ve nem oranının optimum koşullarda olması ve gebe sığırın çeşitli hastalıklara karşı aşılması yavrunun sağlığı açısından oldukça önemlidir (Al Mawly et al., 2015).

Buzağılarda görülen önemli sağlık sorunlarının başında gastrointestinal ve respiratorik sistem hastalıkları gelmektedir (Bartels et al., 2010). Gastrointestinal sistem hastalıkları yavruarda büyümenin yavaşlamasına ve canlı ağırlık artışının azalmasına yol açmaktadır. Hastalığın tedavisi amacıyla sık ve bilinçsiz şekilde antimikrobiyal ilaç kullanımı, antibiyotığe dirençli bakteri riskini arttırmaktadır. Ayrıca buzağılarda gastrointestinal sistem enfeksiyonları nedeniyle ölümlerin görülmesi hayvancılık işletmelerini olumsuz yönde etkilemektedir (de Graaf et al., 1999). Neonatal buzağı ishalleri immünolojik faktörlere, bakım, besleme koşullarına ve çeşitli çevresel etmenlere bağlı gelişebileceği gibi, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Cryptosporidium parvum*, sığır rotavirus (BRV) ve sığır coronavirus (BCV) gibi sık görülen enfeksiyöz ajanlar sebebiyle de ortaya çıkabilmektedir (Izzo et al., 2011).

Neonatal sepsisemi buzağılarda yüksek morbidite ve mortalite oranına sahip olduğundan ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Sepsisemi etiyolojisinde *E. coli*, en yaygın bakteriyel neden olmakla birlikte, diğer bazı gram negatif ve gram pozitif bakteriler de neonatal sepsisemiye neden olabilmektedir (Çitil ve Gökçe, 2013; Akyüz vd., 2017). Çevresel faktörler ve yetersiz beslenmenin neden olduğu stres, bağırsak direncinin olumsuz etkilenmesine ve organizmaların kan yoluyla yayılarak sepsisemi oluşturmaya neden olur (Çitil ve Gökçe, 2013). Sepsisemi olgularında, kandan mikroorganizma izolasyonu genellikle olumlu sonuçlanmamaktadır (Akyüz vd., 2017). Sepsiseminin klinik bulguları arasında ishal, yüksek ateş, depresyon, dehidrasyon, taşikardi, solunum hızının artması, kapiller geri dolum zamanında

uzama, anoreksi, kas zayıflığı ve yerde yatma sayılabilmektedir (Çitil ve Gökçe, 2013; Akyüz vd., 2017).

İmmun sistemi baskılanmış insanlarda ve hayvanlarda sık görülen bir protozoon olan *C. parvum* (Mosier and Oberst, 2000) genellikle su kaynaklarından bulaşmaktadır (MacKenzie et al., 1995). Yaklaşık 24 farklı *Cryptosporidium* türü vardır (Fayer, 2010). Sığırlarda yaygın olarak *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* ve *C. andersoni* görülmektedir. *C. parvum* ile enfekte buzağılarda şiddetli ishal ve dehidrasyon görülebildiği gibi, asemptomatik vakalara da rastlanmaktadır (Fayer et al., 2009). *C. parvum* enterositlere invaze olup mikrovillus ve silindirik hücre kaybına neden olarak, enfekte olmuş hayvanlarda şiddetli villoz atrofiye yol açmaktadır (Heine et al., 1984). Etkenin yayılmasında rol oynayan ookistler hastalığın 3. gününde saçılmaya başlamakta ve genellikle 2 haftada pik düzeye ulaşmaktadır. Klinik bulgular genellikle bulaşmadan sonraki 3-5 gün içerisinde dikkati çekmektedir (Foster and Smith, 2009). Enfekte olan hayvanlarda yetersiz beslenme, büyümede gerilik ve hatta ölümler görülebilmekte ve bu durum, ekonomik kayıplara neden olabilmektedir.

BRV, *Reoviridae* ailesinde bulunan 11 çift sarmallı RNA segmentinde (16-21 kb) genomik materyal taşıyan zarfsız bir viriondur. Toplam 7 rotavirus serogrubu bulunmakla birlikte (A-G), A grubu evcil hayvanlarda rotaviral enfeksiyonun başlıca nedenidir (Steele et al., 2004). BRV'un viremi dönemi yaklaşık 12-24 saat arasında olup genellikle 1 ila 2 haftalık buzağılarda perakut ishale neden olmaktadır. Virusun 12-24 saat kuluçka süresi vardır ve enfekte hayvanlarda perakut ishale neden olmaktadır. Hasta hayvanlar 5-7 gün boyunca dışkı yoluyla virusu çevreye yayarak, kontaminasyona neden olmaktadır. Rotavirus ile enfekte buzağılarda iştahsızlık, halsizlik, hazımsızlık, canlı ağırlık kaybında azalma ve şiddetli ishal görülebilmektedir (Cho and Yoon, 2014).

BCV, *Betacoronavirus* ailesine ait tek sarmal RNA taşıyan bir virustur. Buzağılarda neonatal diyare ve solunum sistemi hastalığına, büyük hayvanlarda ise kış dizanterisine neden olmaktadır (Liu et al., 2006). Virusun spike (S) proteini hastalığın patogenezinde oldukça önemli bir role sahiptir (Lin et al., 2000). Enfeksiyonun başlıca bulaşma yolu fekal-oral bulaşma olmakla birlikte, hava yoluyla bulaşma da görülebilmektedir (Lotfollahzadeh et al., 2020). Virus 1-2 haftalık buzağılarda sulu ishallerine neden olmaktadır.

Salmonellozis, enterik hastalıklarda sık görülen bakteriyel bir enfeksiyondur. Buzağı salmonellozisine daha çok *S. typhimurum* ve *S. dublin* neden olmaktadır (Sojka et al., 1977; El-Seedy et al., 2016). Etken buzağılarda ishal, pnemoni, septik artrit, meningitis, ekstremitelerde gangrenli nekroz, ateş, anoreksi, dehidrasyon, endotoksemi ve ölümlere neden olmaktadır (Razzaque et al., 2009). Genellikle 3 haftalıktan küçük buzağılarda enfeksiyona neden olan etkenler, gıdalarla ve direkt temasla insanlara da bulaşabilmektedir (Mead et al., 1999). Salmonellozis buzağılarda daha çok kanlı, sulu ve mukoid ishale dikkati çekmektedir (Fossler et al., 2005).

E. coli'nin 20. Yüzyılda en sık görülen neonatal sepsis etkeni olduğu ifade edilmektedir (Gomez and Weese, 2017). *E. coli* izolasyonu ve karakterizasyonu ilk olarak Theodor Escherich tarafından 1885 yılında *Bacterium coli commune* ismiyle yapılmıştır (Escherich and Bettelheim, 1988). 1954'e kadar birden fazla eş anlamlı isimle kullanılsa da 1954 yılında, Theodor Escherich'e ithafen *E. coli* olarak tanımlanmıştır (Cowan, 1954). *Escherichia* cinsi içerisinde *E. coli*'den başka, *E. hermannii*, *E. fergusonii*, *E. blattae* ve *E. vulneris* olmak üzere 4 tür daha bulunmaktadır (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. *Escherichia* cinsi içerisindeki türlerin bazı biyokimyasal özellikleri (Winn et al., 2006'dan uyarlanmıştır)

Biyokimyasal Testler	<i>E. coli</i>	<i>E. hermannii</i>	<i>E. fergusonii</i>	<i>E. blattae</i>	<i>E. vulneris</i>
İndol	+	+	+	-	-
Metil Red	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-	-	-
Sitrat	-	-	d	d	-
Lizin dekarboksilaz	+	-	+	+	D
Arjinin dehidrolaz	d	-	-	-	D
Ornitin dekarboksilaz	d	+	d	+	-
ONPG	+	+	-	-	+
Laktoz	+	d	-	-	D
Sorbitol	+ ^t	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	-	+
Adenitol	-	-	+	-	-
Sellobioz	-	+	+	-	+
Sarı pigment	-	+	-	-	D

+: % 90 ve daha fazla suş pozitif, -: % 90 ve daha fazla suş negatif, d: % 11-89 suş pozitif, t: O157:H7 serotipi sorbitol negatif

E. coli Enterobacteriaceae familyasına ait, fakültatif anaerobik, Gram negatif, çomak şekilli, ortalama 1.1-1.5 µm x 2.0-6.0 µm boyutlarında bir mikroorganizmadır. Uygun üreme ısısı 37-44°C'dir. Genellikle hareketli olmakla birlikte, hareketsiz olan izolatlar da bulunmaktadır. Hareketli olanlar peritrik flagellaya sahiptir. Sporsuz olan etken, genel besiyerlerinde kolayca üremektedir. Kemoorganotrofik ve oksidaz negatiftir. Glukoz, maltoz, mannitol, ksiloz, ramnoz, arabinoz, sorbitol, trehaloz ve gliserolü önce piruvata, sonra da fermentasyonla laktik asit ve formik aside indirgemektedir. Sükroz, salisin, dulsitol ve rafinoz üzerine etkisi değişken olup adenitol, inositol ve sellobiyozu nadiren fermente etmektedir. Nişastadan gaz oluşturmayan *E. coli* indol, nitrat redüksiyonu (NR) ve metil red (MR) pozitif; Voges-Proskauer (VP), sitrat, hidrojen sülfür (H₂S) ve üreaz aktivitesi bakımından negatiftir. *E. coli*, gastrointestinal sistemde normal flora bakterisi olmasına rağmen, patojenik varyantları (patovarlar veya patotipler) geniş bir hastalık spektrumundan sorumlu olduğu için, en yaygın insan ve hayvan patojenlerinden biri olarak ifade edilmektedir. Çeşitli virülens faktörleri vasıtasıyla intestinal ve ekstraintestinal hastalıklara, dolayısıyla dünya çapında çok fazla bulaşma ve ölüme neden olmaktadır. Bu hastalıklara sepsisemi, enteritis, ishal, idrar yolu enfeksiyonları, mastitis, menenjitis gibi klinik enfeksiyonlar örnek olarak verilebilir (Winn et al., 2006).

E. coli'nin virülens faktörleri arasında enterotoksinler, nörotoksinler, endotoksinler ve verotoksinler; 2-7 nm çaplı, protein yapıda, iplik benzeri, konakçı epitele yapışma ve kolonizasyon sağlayan K99, K88, CFA, F41 fimbrialar; sitotoksik nekrozan faktörleri ve kolisin gibi demir bağlama sistemlerinin yanı sıra kapsül ve mikrokapsül önemli yer tutmaktadır (Croxen et al., 2013).

Etken sahip olduğu virülens faktörleri, kolonizasyon durumu ve yaptığı hastalıklara göre patotiplere ayrılmıştır. İnsan ve hayvanlarda hastalık yapan intestinal patojenik *E. coli* (IPEC) için 8, ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) için ise 4 önemli patotip tanımlanmıştır. İntestinal patojenik *E. coli* patotipleri; enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Shiga toksijenik *E.coli*/enterohemorajik *E. coli* (STEC/EHEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), nekrotoksijenik *E. coli* (NTEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), diffuz adherent *E.coli* (DAEC), adherent invaziv *E. coli* (AIEC)'dir. Ekstraintestinal patojenik *E. coli* patotipleri arasında ise üropatojenik *E.coli* (UPEC), meningitise neden olan *E. coli* (MNEC), sepsisemi ile ilişkili *E. coli* (SePEC) ve kanatlılarda hastalığa neden olan avian patojenik *E. coli*

(APEC) bulunmaktadır (Kaper et al., 2004; Crossman et al., 2010). Neonatal septisemiye neden olan en önemli patotipin ETEC olduğu rapor edilmiştir (Croxen and Finlay, 2010).



2. GENEL BİLGİLER

1884'te çocuk doktorluğu yapan Alman mikrobiyolog Theodor Escherich, bebek bağırsak mikropları, bu mikropların sindirim sistemi üzerindeki etkileri ve hastalıktaki rolleri üzerine bir çalışma başlattı. Escherich bu çalışma sırasında, *Bacterium coli commune* adını verdiği, günümüzde *Escherichia coli* olarak bilinen ve hızla gelişen bir bakteri türü keşfetti (Shulman et al., 2007). *E. coli*, taksonomik olarak *Proteobacteria* filumunun gama alt bölümü içinde yer alan *Enterobacteriaceae* familyasının bir üyesidir. Etken Gram negatif ve fakültatif anaerobiktir. Çomak şekilli olan bu bakteri ortalama 1.1-1.5 µm x 2.0-6.0 µm boyutlarındadır. Hareketli olan izolatlar peritrik flagellaya sahiptir. İnsanlarda ve birçok hayvanda intestinal veya ekstraintestinal hastalıklara neden olma kabiliyetine sahip; zararsız, kommensal veya farklı patojenik varyantları içeren çok yönlü bir bakteri türüdür. Bilinen habitatları arasında toprak, su ve yiyecekler bulunur. Omurgalı bağırsağında baskın aerobik tür olan *E. coli*'nin (Lukjancenko et al., 2010) konakçısıyla simbiyotik bir ilişkisi vardır (Tenaillon et al., 2010). Doğal *E. coli* mikrobiyotası, bakteriyosinlerin üretimi ve diğer mekanizmalar aracılığıyla zararlı patojenlerin bağırsakta kolonizasyonunu önleyerek, konakçısına çeşitli faydalar sağlamaktadır (Schamberger et al., 2004). *E. coli*'nin laboratuvarında izolasyon ve identifikasyonu kolay olduğundan, onlarca yıldır popülasyon genetiği çalışmalarında kullanılmıştır. *E. coli*, en iyi karakterize edilmiş model mikroorganizmalardan biridir. Referans suş *E. coli* K-12 ve türevleri, genetik, moleküler biyoloji, fizyoloji ve biyokimyanın ilerlemesinde kilit rol oynamıştır (Whitman et al., 1998).

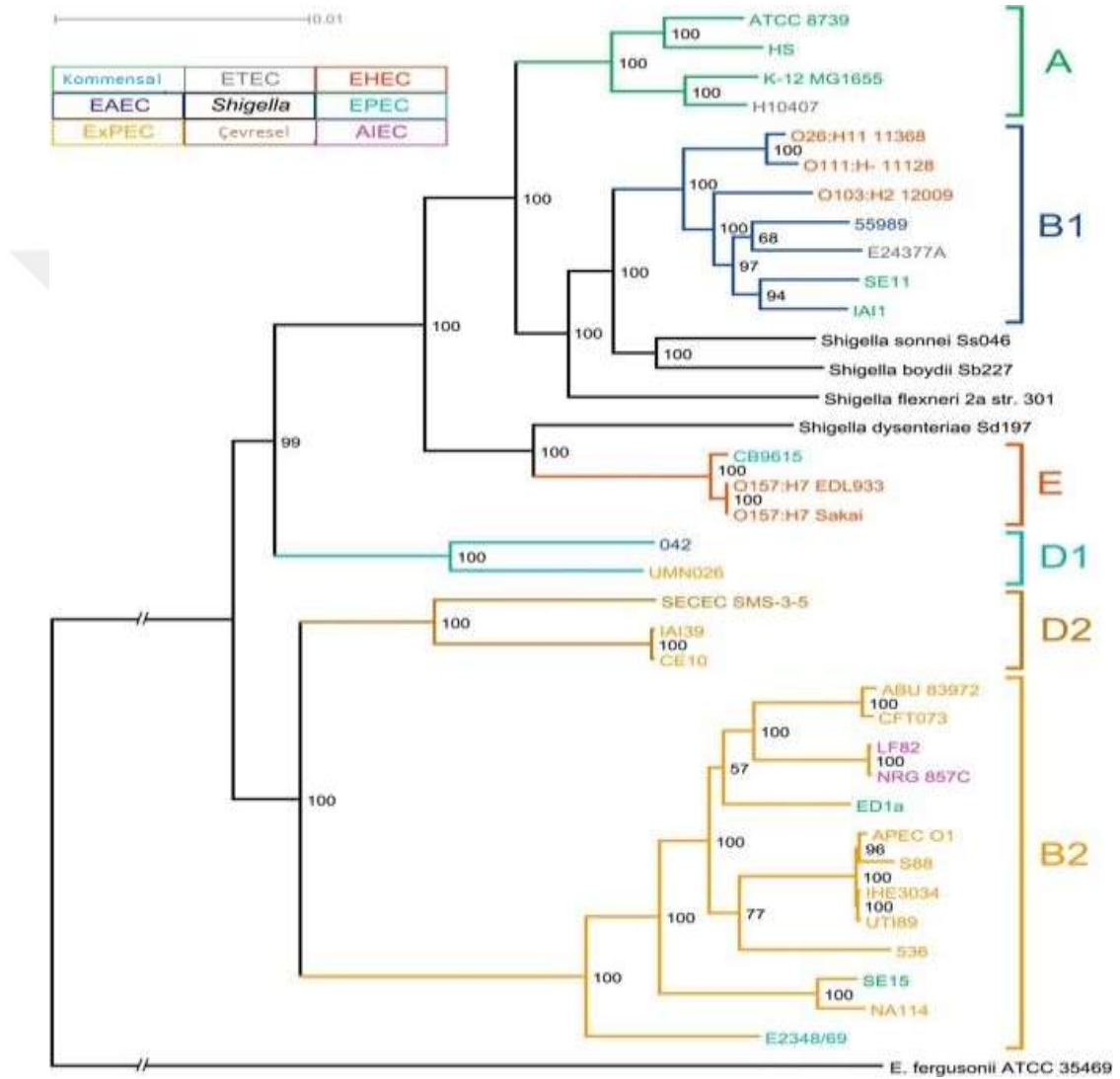
Patojenik *E. coli*'nin çeşitli varyantları intestinal ve ekstraintestinal hastalıklar nedeniyle yılda 2 milyondan fazla insanın ölümüne neden olabilmektedir (Russo and Johnson, 2003, Jang et al., 2017). Kommensal *E. coli* suşları ise kalın bağırsakta, özellikle sekum ve kolonda bulunur. Kanal boyunca epitel hücrelerini kaplayan mukus tabakasında bulunarak degrede mukusla birlikte bağırsak lümenine yayılır ve dışkıyla atılırlar (Poulsen et al., 1994).

E. coli, neonatal dönemde bağırsakta kolonize olan ilk bakteri türleri arasındadır ve diğer anaerob bakterilerin gelişmesinden önce oldukça yüksek yoğunluğa (dışkı gramı başına 10⁹ cfu'dan daha yüksek) ulaşır (Syed et al., 1970). Neonatal dönemden sonra bağırsakta bulunan *E. coli* yoğunluğu zamanla kademeli olarak azalarak,

yaklaşık 10^8 cfu/gram dışkı miktarında sabitlenir (Mitsuoka and Hayakawa, 1973). Araştırmacılar tarafından 1984 yılında *E. coli* referans koleksiyonunun (ECOR) oluşturulması (Ochman and Selander, 1984), araştırmacılara *E. coli*'nin popülasyon yapısını ortaya koymak için değerli bir araç sağlamıştır. ECOR suş koleksiyonu, çok lokuslu enzim elektroforezi (MLEE) sonuçlarına dayalı olarak Ochman ve Selander (1984) tarafından oluşturulmuştur. Bu koleksiyon, insandan ve diğer 16 memeli konakçıdan elde edilen 72 izolat içerir ve bu izolatlar *E. coli* türünün genetik çeşitliliğini temsil etmesi amacıyla seçilmiştir. Koleksiyon, A, B1, B2, D ve E olmak üzere beş ana filogenetik soy olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 2.1). Çoğunlukla kommensal *E. coli*'yi içeren A Grubu ve B1, ortak taksonlardır ve *E. coli* filogenisindeki en genç soylardır. Filogrup B1, O157 hariç diğer EHEC serotipleri dahil olmak üzere farklı patotipler ve kommensallerden oluşan bir ürün yelpazesinden oluşur. B2 filogrubu ExPEC suşlarının çoğunu içerir ve gen içeriği ile nükleotid seviyesinde en yüksek çeşitliliği gösterir. D Grubu ise polifiletiktir ve filogenetik ağacın kökü tarafından iki gruba ayrılır. UPEC ve EAEC izolatlarından oluşan grup D1, A, B1 ve E'ye yakın kümelenirken, ExPEC ve çevresel suşları içeren grup D2, filogrup B2 ile kümelenir. Crohn Hastalığı hastalarının ileal lezyonlarında yaygın olarak bulunan AIEC, ExPEC suşları ile yakın bir ilişki içinde olan filogrup B2'de de kümelenirken, O157:H7 EHEC ve O55:H7 EPEC suşlarının ayrı bir sınıfını oluşturan E grubu, bu *E. coli* gruplarının arasında yer alır. Bir diğer bakteri türü olan *Shigella* ise filogenetik olarak A, B1 ve E gruplarına yakındır (Leimbach et al., 2013).

E. coli'nin metabolik ve fenotipik çeşitliliğinin altında çok dinamik bir genom yapısı yatmaktadır. Bir türün genomu iki kategoride sınıflandırılabilir. Bir bakteri türünün tüm suşlarında bulunan genlere çekirdek genom adı verilir. Genellikle replikasyon, transkripsiyon ve translasyonda yer alan bu genom, bir bakteri türünün genomik omurgasını oluşturur ve temel metabolik işlevlerden sorumludur. Öte yandan değişken genom, yalnızca birkaç suшта bulunan veya tek izolata özgü olan genleri içerir. Bu değişken genler, bir popülasyon veya türdeki çeşitli fenotiplerden ve belirli çevresel koşullara adaptasyonlardan sorumludur (Medini et al., 2005). Değişken genomlar genellikle yüksek oranlarda nükleotit dizisi değişkenliği gösterir. Değişken gen havuzuna örnek olarak plazmitler, fajlar ve mobilom olarak adlandırılan genomik adalar (GEI'ler) gibi hareketli elementler verilebilir. Patojenite bağlamında, değişken gen havuzu patojene konağı kolonize etme ve virülens faktörlerini kodlamayı

sağlamaktadır (Leimbach et al., 2013). Çekirdek ve esnek genomun kombinasyonu pangenomu, yani bir türün toplam gen havuzunu oluşturur. Son hesaplamalara göre *E. coli* pangenomunda 18.000'den fazla gen bulunabilirken, tipik bir *E. coli* genomunda yaklaşık 5.000 gen bulunur (Chaudhuri and Henderson, 2012). Kommensal *E. coli* suşları çoğunlukla patojenik suşlardan daha küçük genom boyutlarına sahiptir (Sims and Kim, 2011).



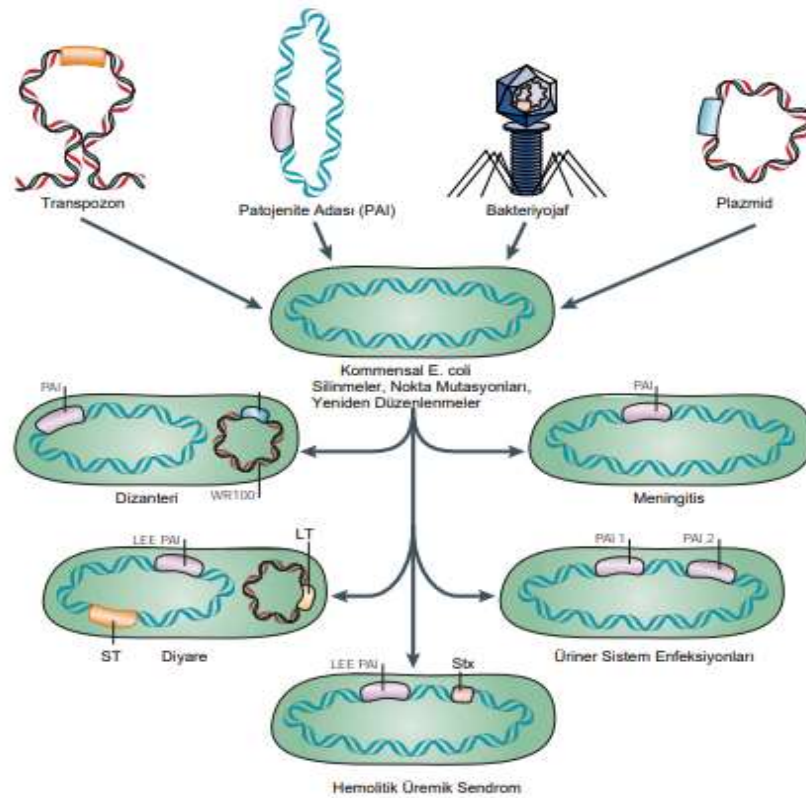
Şekil 2.1. *E. coli* referans koleksiyonunun (ECOR) filogenetik soyları (Leimbach et al., 2013)

Modifiye Kauffman şemasına göre *E. coli*, O (somatik), H (flagellar) ve K (kapsüller) yüzey antijen profilleri temelinde serotiplendirilmektedir (Kaper et al., 2004). Son yapılan çalışmalarda 185 adet O antijeni (Liu et al., 2020), 100'den fazla K antijeni ve 60 adet H antijeni saptanmıştır (Parma et al., 2000). O antijeni yüzey antijenidir ve lipopolisakkarit özelliğindedir. K antijenleri kapsül antijenler olup, polisakkarit yapıdadır ve bakterinin O antiserumları ile aglütine olmasını

önlemektedir. H antijeni ise flagellar antijendir ve protein yapısındadır (Beutin et al., 2009).

E. coli'nin zararsız olan bazı suşları mutasyon geçirmiş ve birçok canlıda hastalığa neden olan patojenik bir yaşam tarzına uyum sağlamıştır (Crossman et al., 2010). Yalnızca en başarılı virulens faktörlerinin kombinasyonları, sağlıklı bireylerde hastalığa neden olabilen *E. coli* patotiplerine (Şekil 2.2) dönüşmüştür (Kaper et al., 2004). Patojenik *E. coli* suşları, enfeksiyon bölgesine bağlı olarak intestinal patojenik *E. coli* (IPEC) ve ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) olarak iki gruba ayrılmaktadır. Her iki grup da belirli patojenik özelliklere sahip tek bir türün suşları olarak tanımlanan farklı patotiplere göre alt kategorilere ayrılmıştır (Tablo 2.1). Patotip sınıflandırması, hastalığın klinik görünümüne, sahip olduğu virulens faktörlerine ve filogenetik arka plana dayanmaktadır. İntestinal patojenik *E. coli* patotipleri arasında enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Shiga toksijenik *E. coli*/enterohemorajik *E. coli* (STEC/EHEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), nekrotoksijenik *E. coli* (NTEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), diffuz adherent *E. coli* (DAEC), adherent invaziv *E. coli* (AIEC), ekstraintestinal patojenik *E. coli* patotipleri arasında ise üropatojenik *E. coli* (UPEC), meningitise neden olan *E. coli* (MNEC), sepsis ile ilişkili *E. coli* (SePEC) ve kanatlılarda hastalığa neden olan avian patojenik *E. coli* (APEC) bulunmaktadır (Kaper et al., 2004; Crossman et al., 2010). IPEC ve ExPEC suşları, filogenetik geçmişlerinin yanı sıra genetik yapılarında da farklılık göstermektedir. Çeşitli IPEC patotipleri, farklı genetik türlere sahip olmakla birlikte ilgili nişlere adaptasyon altında gelişen ortak serotiplerle karakterize edilen klonlar olarak kabul edilmektedir (Leimbach et al., 2013). Virulens faktörlerin yeni kombinasyonları, bakterinin yeni şartlara uyum sağlama kapasitesini artırır ve bu durum *E. coli* klonlarının geniş bir hastalık spektrumuna neden olmasına izin verir. *E. coli*'nin neden olduğu bu hastalıklardan biri olup tüm Dünya'da görülen ve Shiga benzeri toksin üreten EHEC O157:H7'dir. Bu toksin küçük kan damarlarında dejenerasyon oluşturup, şiddetli karın ağrısıyla seyreden kanlı ishallere neden olur. Ayrıca kılcal damarlarda sıklıkla kan pıhtılarına neden olarak hemolitik anemi, trombositopeni ve böbrek yetmezliğinin eşlik ettiği öldürücü bir hastalık olan hemolitik üremik sendroma (HÜS) neden olur (Scallan et al., 2011). Antibiyotiklerin HÜS riskini artırması nedeniyle tedavisi oldukça zor bir hastalıktır. O157:H7 sığırlarda ve diğer çiftlik hayvanlarında

asemptomatik olarak bulunabilmekte ve kesim, paketlenme gibi işlemler sırasında etin kontaminasyonu yoluyla insanlara bulaşabilmektedir (Ferens and Hovde, 2011). Ayrıca su, gübre ve kuşlar da sebze ve meyvelerin kontaminasyonuna neden olabilen diğer faktörlerdir (Callaway et al., 2014). Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir araştırmada O157:H7'nin yılda 63.000 kişiye bulaşarak etkilenen hastaların tedavisi için 405 milyon dolar harcandığı ve yaklaşık 20 kişinin ölümüne neden olduğu ortaya konulmuştur (Scallan et al., 2011). *E. coli* kökenli önemli bir diğer hastalık ise enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)'dir. ETEC; insanlarda turist ishaline (Al-Abri et al., 2005), yeni doğan çiftlik hayvanlarında ise önemli dehidrasyon ve elektrolit dengesizliği sonucu ölümle sonuçlanabilen sulu ishallere (Picco et al., 2015) neden olmaktadır. Genom plastisitesi nedeniyle yeni virulens gen kombinasyonlarının ortaya çıkması sonucu *E. coli* patotiplerinin farklı varyasyonları görülebilmektedir. Mayıs ve Haziran 2011'de Orta Avrupa'da EHEC ve EAEC patotiplerinin kombinasyonu sonucu ortaya çıkan *E. coli* O104:H4 suşunun neden olduğu büyük bir Enteroagregatif hemorajik *E. coli* (EAHEC) salgını, virulens genlerinin yeni kombinasyonlarının oldukça tehlikeli patojenik varyantlara yol açabileceğini göstermektedir (Brzuszkiewicz et al., 2011).



Şekil 2.2. Patojenik *E. coli*'nin evrimine mobil genetik elementlerin katkısı (Kaper et al., 2004).

Tablo 2.1. Patojenik *E. coli* tiplerinin klinik semptomları ve başlıca virülens faktörleri (Allocati et al., 2013)

Patotip	Klinik Semptomlar	Başlıca Virülens Faktörleri
<i>İntestinal E. coli</i>		
EPEC	Sulu ishal ve kusma	LEE, EAF
EHEC/STEC	Kanlı ishal, HUS, hemorajik kolit	Shiga toksin, LEE
ETEC	İnsanlarda gezgin ishali Yeni doğan çiftlik hayvanlarında sulu ishal	Enterotoksinler ve adhezinler
NTEC	İnsanlarda ve yeni doğan hayvanlarda ishal ve üriner sistem enfeksiyonları	CNF1, CNF2, CDT
EIEC	İnsanlarda yangısal kolit ve dizanteri	Shiga toksin, hemolizin, hücrel invazyon
EAEC	İnsanlarda mukuslu ishal ve kusma	Sitotoksinler
DAEC	Özellikle çocuklarda ishal ve üriner sistem enfeksiyonları	Daa, AIDA
AIEC	İnsanlarda yangısal bağırsak hastalığı ve Crohn hastalığı	Tip-1 fimbria, hücrel invazyon
<i>Ekstraintestinal E. coli</i>		
UPEC	Pyelonefritis, sistitis	Tip-1 ve P fimbria, hemolizin
NMEC	Yeni doğanlarda akut meningitis ve sepsis	S fimbria
APEC	Kanatlılarda aerosakkulit, poliserozit, sepsisemi	P ve F1 fimbria, hemaglutinin, aerobactin

2.1. *E. coli* Patotipleri

2.1.1. İntestinal *E. coli* Patotipleri

2.1.1.1. Enteropatojenik *E. coli*

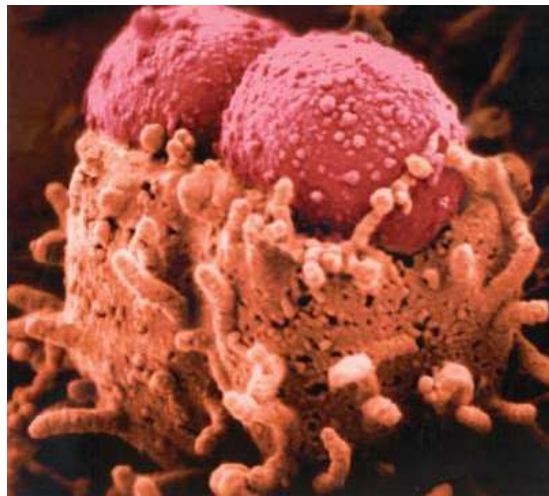
Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), gelişmekte olan ülkelerde insan ve hayvanlarda görülen yeni doğan ishallerinden izola edilen önemli patotiplerden biridir (Ochoa and Contreras, 2011). Etken günümüzde insan ve hayvan sağlığı için tehdit olmaya devam etmektedir. Bulaşmada öncelikle kontamine su, az pişmiş et ürünleri ve çiğ süt gibi gıdaların tüketimi önemlidir (Gansheroff and O'Brien, 2000; Gülhan, 2003). Ayrıca hayvan dışkısı ile kontamine olan marul gibi tarımsal ürünlerin tüketimi ve enfekte hayvanlarla doğrudan temasın da EPEC enfeksiyonunun bulaşmasında rol aldığı ortaya konmuştur (Jeamsripong et al., 2019; Gökmen vd., 2022).

EPEC insan, sığır, tavşan, domuz, koyun, keçi, kedi ve köpeklerde hastalığa neden olarak hayvancılık endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Bardiau et al., 2010; Pienaar et al., 2019). Etken neonatal buzağılarda özellikle 1-8 haftalık yaşlarda ishale neden olmaktadır (Doughty et al., 2002). Hastalığın mortalitesi düşüktür ancak ishal durumu hayvanlarda kronik hale gelerek canlı ağırlık kazanımının azalmasına yol açmaktadır. Belçika'da 2008-2015 yılları arasında 42 adet yerli çiftlikte ishali buzağılardan toplam 104 EPEC suşu izole edilmiştir (Thiry et al., 2017). Köpek, kedi, koyun, keçi ve domuz yavrularında EPEC suşlarının kolonizasyonu sonucu akut gastroenteritis, kusma, ishal, dehidrasyon gibi semptomlar görülebilmektedir (Kjaergaard et al., 2016; Watson et al., 2017).

EPEC insanlarda da önemli hastalıklara neden olabilmektedir. 1940 ve 1950'lerde ABD ve İngiltere'de sık görülen çocuk ishali salgınlarında izole edilen etken EPEC olarak identifiye edilmiştir (Robins-Browne, 1987). Brezilya, Şili, Peru ve İran gibi gelişmekte olan ülkelerdeki infantil ishalin % 5-10'undan EPEC'nin sorumlu olduğu tespit edilmiştir (Ochoa et al., 2008). Ayrıca yapılan son araştırmalar EPEC'in Kuzey Avrupa, Okyanusya ve Doğu Asya gibi gelişmiş ülkelerde yeniden ortaya çıktığını göstermektedir. Norveç'te EPEC, ishal nedeniyle hastanede yatan hastaların dışkılarında bulunan en yaygın patojenlerden biridir. 2013-2015 yılları arasında Norveç üniversite hastanesinde toplanan ishali dışkılardan toplam 122 örnekte EPEC patotipi izole edilmiştir (Berdal et al., 2019). Finlandiya'da EPEC, 2016 yılında kontamine sebze tüketimi sonucu 237 hastada ishal salgınına neden olmuştur (Kinnula et al., 2018). Avustralya'da 2008 ile 2011 yılları arasında yapılan

çalışmalarda toplam 61 adet EPEC izolatı analiz edilmiştir (Staples et al., 2013). Yeni Zelanda'da 2014 yılında, bir devlet hastanesinde dört ay boyunca ishalli dışkı örnekleri toplanmış ve 21 örnek EPEC olarak rapor edilmiştir (Thomas et al., 2017). Doğu Asya'da da ishalli hastalarda yüksek EPEC prevalansı bildirilmiştir. Güney Kore'de EPEC, 2009-2010 yılları arasında 1.791 insanı etkileyen toplam 26 ishal salgınına neden olmuştur (Lee et al., 2012). Japonya'da da diyareli hastalarda yüksek bir EPEC insidansı bildirilmiştir (Wang et al., 2017). 1980 ve 1990'ların başında yapılan EPEC ile ilgili araştırmalarda, EPEC'in patofizyolojisine odaklanılarak kayda değer ilerlemeler kaydedilmiştir (Chen and Frankel, 2005). 2000'li yılların başlarında uygun terapötik müdahaleler geliştirilmekle beraber sağlık koşulları iyileştirilerek EPEC salgını vakalarının sayısı azaltılmış olsa da (Trabulsi et al., 2002), gıda kaynaklı salgınlara ilişkin son süveyans verileri, insanlarda EPEC enfeksiyonlarının yeniden ortaya çıkmaya olasıliğının yüksek olduğuna işaret etmektedir (Kinnula et al., 2018; Lim et al., 2020). Bütün bu epidemiyolojik raporlar, EPEC enfeksiyonlarının yerel, ulusal ve küresel olarak kontrol etmek ve önlemek için büyük bir halk sağlığı endişesinin gerekli olduğunu güçlü bir şekilde göstermektedir.

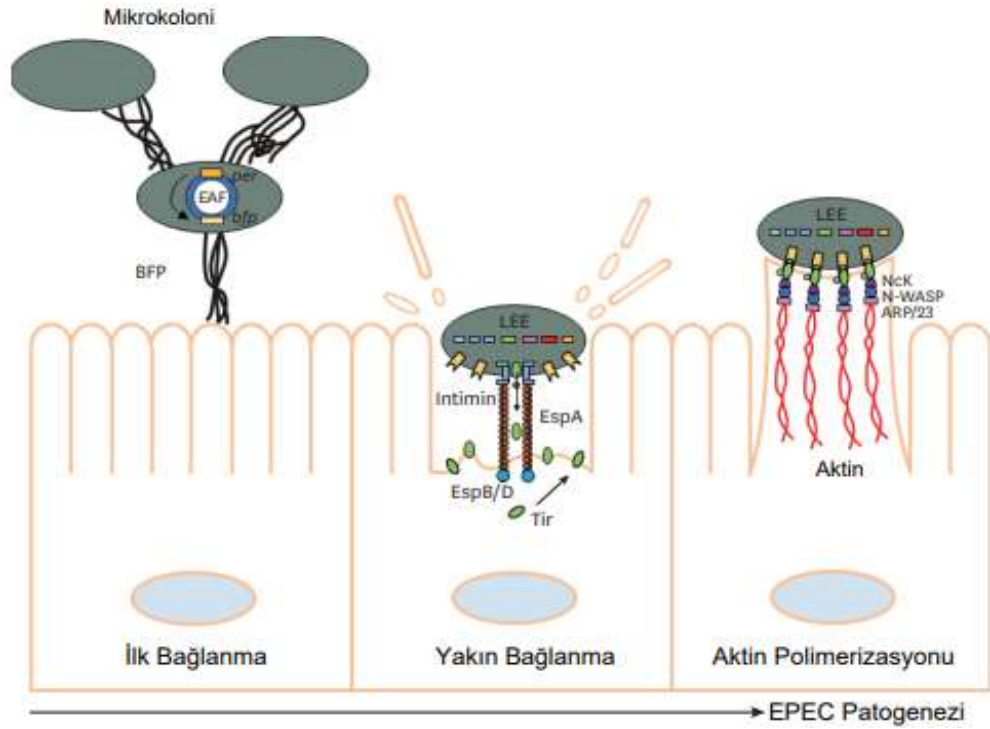
İnvazyon yeteneğine sahip olmayan ve enterotoksin üretmeyen EPEC, konakçının intestinal epitel hücrelerinde bağlanarak, nekrozuna (attaching/effacing, A/E) neden olmaktadır (şekil 2.3). EPEC virulens faktörleri arasında demet oluşturan pilus (BFP), EPEC adezyon faktörü (EAF) ve enterosit yok etme odağı (locus of enterocyte effacement, LEE) yer almaktadır (Lee et al., 2022).



şekil 2.3. EPEC ve EHEC'in neden olduğu bağlanma ve yok etme (attaching/effacing) lezyonlarının histopatolojisi (Girón et al., 1991)

Tip IV BFP, bakteri yüzeyine uzanabilen ve geri çekilebilen dinamik ve fibriler organeldir (Ramboarina et al., 2005). BFP, EPEC'in bağırsak epitel hücrelerine bağlandıktan sonra (Girón et al., 1991), bireysel EPEC hücrelerini kümeler halinde toplar ve bu da konakçı hücresi üzerinde mikrokoloni oluşumuna neden olur. EPEC'in bu tür bağıllık modeline lokalize bağıllık (LA) fenotipi denir (Scaletsky et al., 1984). BFP'nin biyogenezine neden olan 14 adet gen, EPEC adezyon faktörü (EAF) üreten 80 kb'lık bir plazmitte (pEAF) kodlanmaktadır (Stone et al., 1996). Plazmit kodlu regülatör A'nın (PerA), öncü demet (pre-bundlin) olarak adlandırılan, ana pilus alt birimi olan BfpA'nın ekspresyonunu aktive ettiği bilinmektedir (Bieber et al., 1998). Öncü demetin olgun forma dönüşmesine prepilin peptidaz ve BfpP aracılık eder (Zhang et al., 1994). Ek olarak, BfpD ve BfpF nükleotid bağlayıcı proteinleri, sırasıyla pilusun uzamasını ve geri çekilmesini sağlar. BfpD, EPEC'in hücre üzerinde toplanmasını sağlarken BfpF, enfeksiyöz sürecin bir sonraki adımı için EPEC hücrelerini agregatlardan ayırır (Anantha et al., 2000). Agregatların BfpF aracılığıyla ayrılması, EPEC hücrelerinin konakçı zarına bağlanmasına (attaching) sağlayarak tip III salgılama sistemi (T3SS) yoluyla bakteriyel efektör proteinlerin translokasyonuna izin verir (Zahavi et al., 2011). Bakteriyel agregatların ayrılmasından sonra, EPEC bağlanma için LEE'yi eksprese eder. LEE; EPEC, EHEC, *Escherichia albertii* ve *Citrobacter rodentium* dahil olmak üzere bazı bakteri genomlarında görülen bir patojenite adasıdır (Croxen and Finlay, 2010). EPEC'de, 35.624 bp'lık bir LEE patojenite adası (LPI), 41 genden oluşan beş ana polisistronik operondan (LEE1-LEE5) oluşur (Deng et al., 2004). LEE1, LEE2 ve LEE3, bakteriyel efektör proteinleri konakçı hücrelere aktaran T3SS'in sentezi için gerekli genleri kodlar (Costa et al., 2015). LEE kodlu T3SS yapısı dış zardaki iğne kompleksi (EscC, EscD, EscF, EscI ve EscJ), iç zardaki dışa aktarma aparatı (EscRST, EscU, ve EscV) ve sitoplazmik sıralama platformu (EscA, EscK, EscL, EscN ve EscQ) olmak üzere üç ana bileşenden oluşur (Gaytán et al., 2016). LEE4, T3SS (EspA, EspB ve EspD) tarafından salgılanan hücre dışı proteinler için genleri kodlar ve translokasyon aparatı oluşturur (Sekiya et al., 2001). Altı adet LEE kodlu efektör (Tir, Map, EspF, EspG, EspZ ve EspH), EspABD translokon aparatı yoluyla konakçı hücrelere transloke olur. Bu efektörler, konak hücrelerde tight junction bozulması ve mitokondriyal disfonksiyon oluşumunu indüklemektedir (Croxen et al., 2013). Ayrıca T3SS'in bir efektörü olan EspB mikrovillusların yok edilmesine (effacement) katkıda bulunur (Iizumi et al., 2007). LEE5, EPEC'in yakın bağlanmasına aracılık eden bir adhezin olan intimin ve bunun

yer değiştirmiş reseptörü olan Tir için gereken genleri kodlar. İntimin, EPEC'in 94 kDa'lık dış zar proteinidir. Tir ise T3SS yoluyla konakçı hücre zarına transloke edilen bir efektör proteindir (Kenny et al., 1997). İntiminin Tir'e bağlanması, EPEC'in hücre zarına bağlanmasını sağlar (Bhatt et al., 2011). Bağlanmadan sonra, Tir'in sitoplazmik alanındaki tirozin kalıntıları, konak hücre kinazları tarafından fosforile edilir (Kenny, 1999). Fosforile Tir, aktin çekirdek düzenleyici faktörü (N-WASP) toplamak için gereken proteinleri bağlar (Gruenheid et al., 2001). N-WASP, aktini EPEC'in altında bir araya getiren ARP 2/3 kompleksini aktive eder (Kalman et al., 1999). Bu sinyalleşme olayları, yangısal yanıt ve diyarenin eşlik ettiği hastalıklara neden olur (Martins et al., 2020). EPEC'in çok sayıda virulens geni asidik pH, fagositoz, yangısal yanıt ve besin sınırlaması gibi çevresel stres yanıtlarının kontrolü altındadır. Stres tepkileri ile virulans faktörlerinin kompleks regülasyonu, EPEC'in başarılı bir enfeksiyon oluşturmaya izin verir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. EPEC patogenezi (Lee et al., 2022)

2.1.1.2. Enterohemorajik *E. coli*

EHEC, insanlarda hemolitik üremi sendromu (HUS), hemorajik kolit (HC) ve trombotik trombositopenik purpura gibi hastalıklara neden olan; dünya çapında yüksek morbiditeye sahip, genellikle çiftlik hayvanlarının normal florasında ve dışkısında

bulunan önemli bir patojendir (Potter et al., 2004; Puligundla and Lim, 2022). Bugüne kadar sığırlardan yaklaşık 500 EHEC serotipi izole edilmiştir. EHEC'in dışkı ile atılması gıda ve çevre kontaminasyonuna neden olmaktadır. Etkenin insan ve diğer hayvanlara bulaştırılmasında farklı çiftlik hayvanları, yabani ve evcil kanatlılar önemli rezervuar olarak kabul edilmekle beraber, sindirim sistemlerinde normal olarak etkeni taşıdıkları halde herhangi bir klinik belirti göstermeyen ruminantlar, bu bakterinin en önemli rezervuarı olarak kabul edilmektedir (Lim et al., 2010). Mevsim, sıcaklık, bağıl nem, yaş, cins, stres faktörleri, sürü büyüklüğü, sürüye kontrolsüz eklenen yeni hayvanlar, optimum koşullarda olmayan barınak koşulları, kontamine su gibi çeşitli faktörler kolonizasyonu ve etkenin yayılmasını kolaylaştırmaktadır (Espinosa et al., 2018). İnsanlar, kontamine gıdaların tüketilmesiyle indirekt olarak enfekte olabilmektedir (Şekil 2.5). EHEC suşlarının büyük çoğunluğu *Shigella dysenteriae* tip 1 toksinine benzer bir toksin (stx) ürettikleri için, Shiga toksijenik *E. coli* (STEC) olarak da bilinmektedir (Bilinski et al., 2012).



Şekil 2.5. EHEC bulaşma yolları

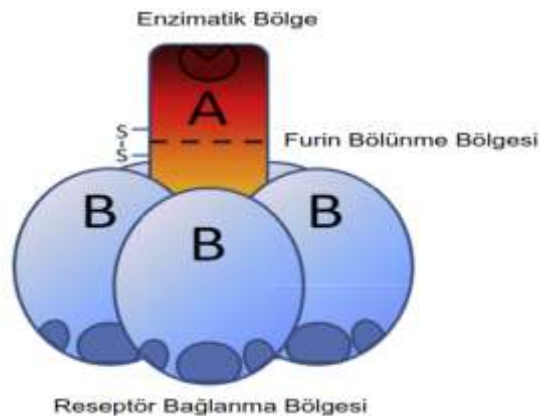
STEC suşları içerisinde en sık görülen serotip O157:H7'dir (Nuhay ve Gülhan, 2017). Bu serotip ilk olarak 1982 yılında Amerika'da kanlı ishal vakaları sırasında tanımlanmıştır (Riley et al., 1983). Etken günümüze deyin en çok görülen gıda kaynaklı patojenlerden biri olmaya devam etmektedir. Etken az pişirilmiş etlerde, içme

sularında, pastörize edilmemiş sütlerde, salam ve sosis gibi işlenmiş gıdalarda, sebze ve meyvelerin kabuğunda bulunup, insanlarda hemolitik üremi sendromu (HUS) ve hemorajik kolite neden olduğu için oldukça önemlidir. HUS, akut böbrek yetmezliği, trombositopeni, mikroanjiyopatik hemolitik anemi ile karakterize, çocuklarda ve yaşlılarda daha sık görülen önemli bir hastalıktır (Gould et al., 2009). O157:H7'ye bağlı hastalık oluşumunda çok düşük enfektif dozlar yeterli olabildiği için etken oldukça tehlikelidir (Lange et al., 2022). Yapılan çalışmalar STEC O157:H7'nin ham gübrede 730 gün, gübrelenmiş toprakta ise 365 gün canlı kalabildiğini göstermiştir (LeJeune et al., 2001). Ayrıca etkenin suda düşük sıcaklıklarda uzun süre dayanabildiği ve inek dışkısı ile kontamine olmuş materyallerde 8 aydan fazla bir süre boyunca canlı kalarak etkeni bulaştırabildiği raporlanmıştır (Ewers et al., 2007). Öte yandan O157:H7'nin farklı çevresel koşullara, sıcaklık, pH ve ozmotik değişikliklere karşı dayanıklı olması, asit ve ısı direnci gibi özellikleri bu etkenin çiftliklerde sıklıkla görülmesi ve yayılmasını kolaylaştırmaktadır (Maule, 2000). İnsanlardaki pek çok EHEC O157:H7 enfeksiyonuna, ruminant dışkılarıyla direkt/indirekt olarak kontamine olmuş gıda ya da sular neden olmaktadır. Bu nedenle insanları EHEC O157:H7 enfeksiyonundan korumanın temeli, etkenin ruminant sindirim sistemine kolonizasyonunun önlenmesi ve kontrolü ile mümkündür. Bu amaçla sığırların aşılama önemli bir önlemdir. Bugüne kadar EHEC O157:H7'nin çevresel yayılımını azaltmak için farklı aşı kompozisyonları test edilmiştir. Bu aşılama farklı immunojenler, adjuvantlar, aşılama yolları, dozların sayısı, gelişim ve değerlendirme seviyelerinde farklılık göstermektedir.

Etkenin hastalığa neden olan birçok virülens faktörü vardır. Önemli virülens faktörleri arasında shiga toksin (stx), LEE ve O157 plazmidi (pO157) yer almaktadır. Stx, enzimatik olarak aktif bir A alt biriminden (A1) ve beş özdeş reseptör bağlayıcı B alt birimlerinden (B5) oluşan bir yapıya sahiptir. Stx1 ve Stx2 olmak üzere iki tipe ayrılmaktadır. Stx1, *S. dysenteriae* tip 1 toksine benzer bir toksin olmakla birlikte, bu toksinden yalnızca bir aminoasidi farklıdır. Stx2'nin Stx1'e göre daha toksik olması nedeniyle HUS ve HC'ye neden olma riski daha fazladır (Lim et al., 2010). Shiga toksinler AB5 toksin ailesindendir. Enzimatik bölgeyle ilgili 32 kDa A komponenti ve Shiga toksin reseptörüne bağlanmak için 8 kDa B komponentinin 5 adet kopyasından oluşurlar (Fraser et al., 2004) (Şekil 2.6). Boğmaca toksini, kolera toksini ve ETEC'in sahip olduğu labil toksin de stx gibi AB5 toksin ailesindendir (Beddoe et al., 2010).

EHEC O157:H7'nin bağırsak mukozasında kolonizasyonu, EPEC'de de etkili olan ve A/E lezyonları olarak adlandırılan karakteristik bir histopatolojik lezyonu indüklemektedir. A/E lezyonu, mikrovillusların yok edilmesi ve epitel hücre zarına bakteri yapışması ile karakterizedir. Genetik çalışmalar, A/E lezyonlarından sorumlu genlerin, LEE olarak bilinen bölgede olduğunu göstermiştir (Lim et al., 2010). LEE, üç ana bölgeye ayrılmış en az 41 farklı genden oluşmaktadır. Bu ana bölgelere; efektör molekülleri dışa aktaran tip III sekresyon sistemi (T3SS), A/E lezyonlarının oluşumu sırasında konak hücre sinyal iletiminin değiştirilmesinde önemli rol alan *E. coli* salgı proteinleri (EspA, EspB, EspD, EspE, EspF, EspG, EspH ve EspP), A/E lezyonlarının oluşumunda görev alan ve intimin (int, eae) adı verilen yapışma faktörü ile T3SS tarafından konak hücre membranına yerleştirilmiş transloke intimin reseptörü (tir) sayılabilir (Perna et al., 1998; Delahay et al., 2001).

EHEC O157:H7'nin, pO157 olarak adlandırılan major plazmidi bulunmaktadır. pO157 dinamik bir yapı gösterir ve transpozonlar, profajlar, ekleme dizileri (IS) ve diğer plazmidlerin parçaları gibi farklı mobil genetik elemanlar içerir (Lim et al., 2010). EHEC O157:H7 enfeksiyonlarının patogeneğinde bu plazmidle ilgili proteinlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu proteinlere hemolizin (ehxA) (Schmidt et al., 1994), katalaz peroksidaz (Brunner et al., 1996), tip II sekresyon sistemi (T2SS) (Schmidt et al., 1997), serin proteaz (espP) (Brunner et al., 1997), yapışma faktörü (putative adhezin, toxB), çinko metalloproteaz (stcE) (Lathem et al., 2002) ve intimin pozitif koruyucu gen fragmenti (ecf) (Yoon et al., 2005) örnek olarak verilebilir.



Şekil 2.6. Shiga toksin (Stx) şematik diyagramı. A bölgesi: katalitik ve aktif bölge, B: Çoklu bağlanma bölgesi (Bryan et al., 2015)

EHEC O157'nin teşhisi amacıyla faj tiplendirmesi, biyotiplendirme ve

antimikrobiyal duyarlılık testleri gibi fenotipik metotlar; plazmid profillendirme tekniği, restriction fragment length polymorphism (RFLP) ile analiz, ribotiplendirme, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), floresan polarizasyon tekniği (FPT) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'a dayalı moleküler analiz gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. EHEC O157:H7 serotipinin patojenitesi esas olarak sentezlediği toksinlerden kaynaklanmaktadır. Stx1 ve Stx2' nin sentezi ELISA, RPLA kitleri, Vero veya HeLa doku kültürü hücrelerinde sitotoksik testlerle belirlenebilmektedir. Ayrıca Stx1 ve Stx2 için geliştirilmiş gen problemleri ve farklı PCR testleri bulunmaktadır (Momtaz et al., 2012).

E. coli O157:H7 ile ilgili geçmişten günümüze birçok aşı çalışması yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir. Hayvanlarda koruyucu düzeyde bir bağışıklık oluşturmada temel faktör, doğru immunojen kullanımından geçmektedir. Aşı çalışmalarında kullanılan immunojenler arasında tip III salgı sistemi (T3SS) bileşenleri, siderofor reseptörleri, porin proteinleri, hücre duvarı, flagellin, Shiga toksin toksoidi, bakterinler, atenué *Salmonella* gibi antijenik yapılar bulunmaktadır.

2.1.1.3. Enterotoksijenik *E. coli*

Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), insanlarda turist ishaline (Al-Abri et al., 2005), yeni doğan çiftlik hayvanlarında ise önemli dehidrasyon ve elektrolit dengesizliği sonucu ölümle sonuçlanabilen sulu ishallere (Picco et al., 2015) neden olmaktadır. ETEC, insanlarda ve çiftlik hayvanlarında koliform kökenli ishallerde en sık görülen etkindir (Nagy and Fekete, 2005). Dünya'da her yıl yaklaşık 650 milyon insan ETEC ile enfekte olmakta ve bunların 800.000'i hayatını kaybetmektedir (Turner et al., 2006). Yeni doğan köpek ve koyun gibi birçok hayvan türünde görülebilen etken, genellikle domuz yavruları ve buzağılardaki ishallerle ilişkilidir (Foster and Smith, 2009; Liu et al., 2014). ETEC enfeksiyonlarının patogeneğinde en önemli virülens faktörleri fimbrial adhezinler ve enterotoksinlerdir (Dubreuil et al., 2016).

Fimbriaların saç benzeri görünümü en iyi elektron mikroskobu ile gözlemlenmektedir. 2 µm uzunluğa ulaşabilen fimbrialar, tipik olarak 2 ila 7 nm arasında değişen çaplarına göre sınıflandırılmaktadır. Bir fimbrial iplik, spiral düzende bulunan yüzlerce protein alt biriminden oluşmakta ve alt birimler eksen boyunca ne kadar az sıkıştırılırsa, fimbria daha ince ve daha esnek görünmektedir (Zhou et al., 2012). Hayvanlardan izole edilen ilk *E. coli* fimbrial adhezin, domuzlarda belirlenen F4 (K88) antijenidir (Nataro and Kaper, 1998). ETEC'de en sık tespit edilen

fimbrialar, hayvan türlerine göre farklılık gösteren F4 (K88), F5(K99), F6 (987P), F17 (FY), F18, F41 gibi fimbrial adhezinlerdir (Tablo 2.2). Adhezinlerin birincil görevi bağırsak epiteline yapışmayı sağlamaktır (Kaper et al., 2004).

Tablo 2.2. ETEC fimbriaların çapları ve konak hayvan türleri (Dubreuil et al., 2016'dan uyarlanmıştır)

Fimbria	Fimbriaların Çapları	Hayvan Türü
F4	2-4 nm	Yeni doğmuş veya sütten kesilmiş domuz yavruları
F41	3,2 nm	Buzağı, kuzu, oğlak
F5	3 nm	Buzağı, kuzu, oğlak
F6	7 nm	Yeni doğmuş domuz ve buzağı
F18	6,7 nm	Sütten yeni kesilen domuz yavruları
F17	3-4 nm	Buzağı

ETEC, ince bağırsağa yerleştikten sonra, ishale neden olan enterotoksinler üretmektedir. ETEC suşları labil toksin (LTI-LTII), stabil toksin (STa, STb) ve enteroagregatif stabil toksin 1 (EAST1) sentezlemektedir (Dubreuil et al., 2016). Bir ETEC suşu, bu tip toksinlerin birini veya her ikisini üretebilmektedir (Zhang et al., 2006). LT yüksek molekül ağırlıklı güçlü bir toksin olup, yüksek molekül ağırlıklı bir toksindir ve 60°C'de 15 dk'da inaktive olmaktadır. LTI ve LTII olmak üzere iki grup altında incelenmektedir. ST ise düşük molekül ağırlıklı bir toksin olup, 100 °C'de 15 dk'da inaktive olmaktadır ve immunojenitesi daha zayıftır. STa ve STb olmak üzere iki alt grubu bulunmaktadır. Enterotoksinlerin birincil görevi bağırsaklardan su ve elektrolit kaybına neden olmaktır (Croxen et al., 2013).

ETEC oral yolla vücuda girdikten sonra, ince bağırsaktaki spesifik reseptörleri tanıyarak, fimbrial veya fimbrial olmayan adhezinler (kolonizasyon faktör (CF) antijenleri) yoluyla bağırsak epiteline bağlanıp, burayı kolonize edebilmektedir (Kopic and Geibel, 2010). Kolonizasyon sonrası ETEC hızla çoğalıp, enterotoksin salgılamaya başlayarak elektrolit dengesizliğine ve dehidrasyona neden olarak sulu ishale yol açabilmektedir (Duan et al., 2019).

ETEC domuzlarda doğum sonrası veya sütten kesimi takiben 3-10 gün sonra oluşan sulu ishale (Post weaning diarrhea, PWD) neden olabilmektedir (Rhouma et al., 2017). Bu hastalık domuz yavrularında ishal, dehidrasyon, büyüme geriliği ve ani

ölümlerle karakterize edilmektedir ve bu nedenle yüksek oranda ekonomik kayıplarla sonuçlanmaktadır. PWD oluşumunda genellikle F4, F18, diffuz yapışma ile ilişkili adhesin (AIDA), STb, EAST1 gibi virülens faktörleri etkili olmaktadır (Mainil et al., 2002; Zhang et al., 2018).

Buzağılardan ve kuzulardan izole edilen ETEC’de, tipik olarak F5 (K99), F41 adhezinleri ve STa üretimi görülmektedir (Nagy and Fekete, 2005). F5'in reseptöre bağlanması yaşa bağlıdır ve reseptöre bağlanma 12 saatte en yüksek düzeydeyken, iki hafta içerisinde yavaşça düşmektedir. Buzağılar için ilk dört gün ETEC enfeksiyonlarında en kritik dönem olup, zaman ilerledikçe risk azalmaktadır (Foster and Smith, 2009). Domuz, buzağı ve kuzuların dışında ishallerde de ETEC görülebilmekte, hastalığa çoğunlukla STa, nadiren de STb neden olabilmektedir (Hammermueller et al., 1995).

Bakteriyel patojenlerin fimbria aracılı kolonizasyonu ilk olarak domuzlarda tespit edilmiştir. Hayvanlardan izole edilen ilk *E. coli* fimbria domuzlarda görülen F4 antijenidir (Orskov et al., 1961). F4 fimbria, başlangıçta kapsüler (K) antijen olduğu düşünüldüğü için K88 olarak adlandırılmış, protein yapısında olduğu ve plazmidle olan ilgisi daha sonra anlaşılmıştır. Bununla birlikte, *E. coli*'nin bağırsak mukozasına yapışması ve kolonizasyonunun fimbrialar sayesinde olduğu (Smith and Halls, 1968) ve bu fimbriaların virülens faktörü olduğu ilk olarak F4 fimbria ile gösterilmiştir (Smith and Linggood, 1971). Ayrıca ilk olarak F4 gen dizisinin, *E. coli* K-12 suşuna klonlandığında eksprese olduğu gösterilmiş (Mooi et al., 1979), F4ac (Kehoe et al., 1981) ve F4ab (Mooi et al., 1981) ile yapılan diğer çalışmalar sayesinde de Tip 1 ve P fimbria gibi diğer fimbriaların klonlanması ve genetik çalışmaları yapılmıştır (Hull et al., 1981).

Her ne kadar F4, F5, F6, F17, F18, F41, CS1541, CS31A, F165 gibi fimbrialar ETEC fimbriaları arasında değerlendirilse de, bunlar arasında hasta hayvanlarda sık tespit edilen temel virülens faktörleri F4, F5 ve F6'dır (Dubreuil et al., 2016). F4 ve F18 domuzlarda (Zhang et al., 2018), F5 buzağılarda (Nagy and Fekete, 2005), F6 ise her iki hayvan türünde de (Dubreuil et al., 2016) hastalığa neden olabilmektedir. Bunların dışında F17 fimbriaları hasta hayvanların dışında sağlıklı hayvanlarda ve ekstraintestinal *E. coli* patotiplerinde de tespit edilebilmektedir (Bihannic et al., 2014). CS1541, CS31A, F165, Afa-7 ve Afa-8 gibi bazı fimbriaların patogenezdaki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. CS1541 fimbriaları domuzlarda *in vivo* olarak eksprese

edilebilse de, *in vitro* olarak domuz enterositlerine bağlanamamaktadır (Broes et al., 1989). F165 ve CS31A gibi fimbriaların hayvan ETEC suşları ile ilişkili olduğu, ancak bu fimbriaların domuz ve sığır kökenli ETEC olmayan suşlarda da görülebildiği tespit edilmiştir (Valat et al., 2014; Umpierrez et al., 2016). ETEC fimbrialarının üretimi, 40-100 kb boyutlarındaki plazmidlerde bulunan bir veya daha fazla gen dizilerini gerektirmektedir (Fekete et al., 2002). Bu plazmidler genellikle enterotoksin genlerinin kodlanmasından sorumlu olmakla birlikte, bazı durumlarda fimbrial genler enterotoksin genine bitişik olabilmekte ve ishale neden olabilen patojenite adanmış oluşturmaktadır (Dubreuil et al., 2016).

Enterotoksinlerin birincil görevi bağırsaklardan su ve elektrolit kaybına neden olmaktır (Croxen et al., 2013). Bu toksinler ve bunlarla ilişkili fimbrialar, çeşitli hayvanlarda farklı kombinasyonlarda bulunabilmektedir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Hayvanlarda ETEC'e bağlı hastalıklarda rol oynayan toksinler ve fimbrialar (Gyles ve Fairbrother, 2010'dan uyarlanmıştır)

Hayvan Türü	Toksin ve Fimbria
Domuz (Doğum sonrası)	STa:F41
	STa:F6
	STa:F5:F41
	LT: STb:EAST1:F4
	LT: STb: STa:EAST1:F4
	STb:EAST1:AIDA
Domuz (Sütten yeni kesilmiş)	LT:STb:EAST1:F4
	LT:STb:STa:EAST1:F4
	STa:STb
	STa:STb:F18
	STa:F18
Buzağı, Kuzu, Oğlak	STa:F5:F41
	STa:F41
Köpek	STa:X
	STb

X: Bilinmeyen fimbria

Enterotoksinler başlıca stabil toksin (ST) ve labil toksin (LT) olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir (Duan et al., 2019). Bir ETEC suşu, bu tip toksinlerin birini veya her ikisini sentezlemektedir. Her iki toksin tipi de plazmid tarafından kodlanmaktadır (Zhang et al., 2006). LT güçlü bir immunojen olup, yüksek molekül

ağırlıklı bir toksindir ve 60°C'de 15 dk'da inaktive olmaktadır. LTI ve LTII olmak üzere iki grup altında incelenmektedir. ST ise düşük molekül ağırlıklı bir toksindir, 100 °C'de 15 dk'da inaktive olmaktadır ve immunojenitesi LT'ye göre daha zayıftır. STa ve STb olmak üzere iki alt grubu bulunmaktadır. Ayrıca EAST1 toksin de ST grubuna dahil edilmektedir.

1950'lerde bazı *E. coli* suşlarının kolera benzeri diyare hastalığına neden olabileceği gözlenmiştir (De et al., 1956). Bu duruma neden olan toksinlerden biri olan LT güçlü bir immunojen olup, yüksek molekül ağırlıklı bir toksindir ve 60°C'de 15 dk'da inaktive olmaktadır. Çoğu *E. coli* suşu, toksin üretimi için gerekli genlerden yoksun olmasına rağmen, bazı suşlar, *V. cholerae* tarafından üretilen ve CT homologue olan ısıya dayanıksız bir enterotoksin (LT) salgılayabilmektedir. Bu toksinler, CT ile nükleotit seviyesinde yaklaşık % 78 özdeşliğe sahiptir ve yapıları çok benzerdir. LT'yi kodlayan genler, pEnt adı verilen büyük bir plazmid üzerinde bulunmaktadır (Ochi et al., 2009). Bu plazmid patojenik olmayan *E. coli* varyantlarına aktarılarak toksijenik hale getirilebilmektedir (Scotland et al., 1983). İnsanlarda LT, sulu ishal ve mide kramplarına neden olarak kolera benzeri hastalığa yol açabilmektedir (Huang et al., 2018). LT domuzlarda da *E. coli* nedenli ishallerden sorumlu olan toksindir (Rausch et al., 2017). LT, önemli bir toksin grubu olan AB5 toksin ailesinin bir parçasıdır. A enzimatik olarak aktif alt ünite, B ise reseptör bağlayıcı alt ünite (Becker et al., 2010). LT; B alt ünite farklılığından dolayı LT-I ve LT-II olmak üzere iki grupta incelenmektedir (Casey et al., 2012). İnsan ve domuzlarda görülebilen LT-I, aralarındaki küçük farklar nedeniyle insanlarda LT-Ih domuzlarda ise LT-Ip olarak sınıflandırılmaktadır (Mirhoseini et al., 2018). LT-II ise, B alt ünitelerindeki farklılık nedeniyle LT-IIa, LT-IIb ve LT-IIc olmak üzere üç antijenik varyanttan oluşmaktadır (Nawar et al., 2010; Casey et al., 2012). ETEC, toksin ekspresyonunun gerçekleşmesi için konak hücre ile yakın temas halinde olmalıdır (Dorsey et al., 2006). LT eksprese eden suşlar, bağırsaklardan su ve elektrolit kaybına neden olmaktadır. LT ayrıca enterositlere bağlanma ve kolonizasyonda da önemli rol oynamaktadır (Berberov et al., 2004). ETEC suşları birbirinden farklı miktarlarda LT üretebilmektedir (Lasaro et al., 2006). Uzun süre donmuş şekilde saklanan suşların LT üretiminde az da olsa değişiklik görülebilmektedir (Rodighiero et al., 1999). LT üretimi 26° C üstünde artmakta ve 37°C'de maksimum seviyeye ulaşmaktadır (Hegde et al., 2009). Ayrıca mikroaerofilik koşullar, 0.2 M tuz konsantrasyonu, 8.6 pH değeri ve 2.5 g/L glikoz

konsantrasyonu LT üretimi için optimum koşulları sağlamaktadır (Hegde et al., 2009; Gonzales et al., 2013). Kolonda üretilen kısa zincirli yağ asitleri ise LT üretimini bozmaktadır (Merritt et al., 1994). LT-II antijenik varyantları reseptör olarak GD1a, GD1b, GM1 gibi çeşitli gangliosidlere bağlanabilirken, LT-I öncelikle GM1 adlı ganglioside bağlanmaktadır. LT'nin her bir B alt ünitesi konak hücresindeki lipit yığınlarında bulunan GM1, GD1 gibi gangliosidlere bağlanarak toksin ekspresyonunu sağlamaktadır (Huang et al., 2018). B alt ünitenin GM1, GD1 gibi spesifik hücre reseptörlerine bağlanmasından sonra, LT'nin hücre içine penetrasyonuna reseptör aracılı endositoz aracılık etmekte, endositoz sonrası sırasıyla trans-golgi ağına ve endoplazmik retikuluma taşınmaktadır (Iglesias-Bartolome et al., 2009). LT'nin A (240 aminoasit) ve B (103 aminoasit) alt üniteleri, bir ortak promotörün kontrolü altında sitoplazmada N-terminal sinyal sekansı ile sentezlenmektedir. A ve B alt ünitelerini kodlayan operon (eltAB) yüksek oranda korunmuş bölgelerden oluşan değişken sekanslarla çevrilidir (Schlör et al., 2000). Sekans analizi, LT'yi kodlayan genlerin yaklaşık 130 milyon yıl önce *V. cholerae*'den yatay transferle elde edildiğini göstermektedir (Yamamoto et al., 1987). Disülfid bağ A oksidoredüktaz (DsbA) ile disülfür bağı oluşumu ve peptidil cis-trans izomeraz ile de cis-prolin oluşumu, sitoplazmada sentezlenen alt ünitelerin daha kararlı bir yapı oluşturmaya yardımcı olmaktadır (Wulfig and Rappuoli, 1997; Chung et al., 2006). A alt ünitesi, aktif enzimatik bölgeyi içeren 22 kDa'lık A1 fragmentinden ve A1'i B alt ünitesine bağlayan 5.5 kDa'lık bir A2 fragmentinden oluşmaktadır (Schlör et al., 2000). B alt ünitenin GM1, GD1 gibi spesifik hücre reseptörlerine bağlanmasından sonra, LT'nin hücre içine penetrasyonuna reseptör aracılı endositoz aracılık etmekte, endositoz sonrası sırasıyla trans-golgi ağına ve endoplazmik retikuluma taşınmaktadır (Bartolome et al., 2009). Endoplazmik retikuluma, A alt üniteye proteolitik bölünme ve disülfid bağının indirgenmesi, hücre sitozolündeki A1 fragmentinin salınmasına neden olmaktadır (Majoul et al., 1997). Daha sonra bazolateral membranda bulunan adenilat siklaz, siklik adenosin monofosfat (cAMP) üretilmesine ve bunun sonucunda anyon kanalının açılmasına, böylece klor ve bikarbonat iyonlarının bağırsak lümenine salgılanmasına neden olmaktadır (Hug et al., 2003). Ayrıca cAMP seviyesinin artması sonucu bağırsaktan sodyumun geri emilimi engellenmekte, hipertonic ortam oluşması ve artan ozmotik basınç sonucunda da bağırsak hücrelerinde su kaybı oluşmaktadır (Nataro and Kaper, 1998). LT aktivitesinin bir sonucu olarak, iki komşu hücrenin oluşturduğu sıvı ve iyon bariyerleri olan tight junction bariyerinin gevşemesi de sıvı

kaybını arttırabilmektedir (Berkes et al., 2003). Duodenumda yüksek miktarda glikoz bulunmaktadır. Yüksek glikoz konsantrasyonu olduğu durumlarda, LT genleri kopyalanmakta ve C-reaktif proteinin (CRP) inaktivasyonu sonucunda toksin üretilmektedir. CRP düşük cAMP seviyelerine neden olmakta ancak yüksek konsantrasyonunda glikoz varlığında inaktive olmaktadır. Düşük glikoz konsantrasyonunda, LT aktivitesine yanıt olarak konakçı hücreler tarafından önemli miktarlarda cAMP üretilmekte ve buna bağlı olarak CRP'nin *eltAB*'yi baskılamasına neden olmaktadır (Dubreuil et al., 2016). Diğer yandan kolon gibi organlarda bulunan kısa zincirli yağ asitleri ise LT sentezini olumsuz yönde etkilemekte ve bu mekanizmanın bozulmasına neden olmaktadır (Takashi et al., 1989). Özetle, LT'nin toksik etkisini göstermesi için konakçı hücrenin sitosolüne girmesi ve konak hücredeki mekanizmaları kullanması gerekmektedir. Bunun sonucunda da LT, bağırsaktan sıvı ve iyon kaybına neden olmaktadır.

Stabil toksin ilk olarak 1970'li yıllarda, *E. coli* nedenli hastaların dışkılarından yapılan kültürlerin ısı ile inaktivasyonu yapılmasına rağmen, enterotoksijenik aktivitenin ortadan kaldırılamaması sonucu dikkat çekmeye başlamıştır (Smith and Gyles, 1970). ST düşük molekül ağırlıklı, 100 °C'de 15 dk'da inaktive olan zayıf immunojenik özellikte bir toksindir. Küçük boyutları ve 3 boyutlu yapıları, stabil toksinlerin ısıya dayanıklı olmalarından sorumludur. Dizilerine ve biyokimyasal özelliklerine göre; STa (STI), STb (STII) ve EAST1 olmak üzere 3 grupta incelenebilmektedir (Wang et al., 2019). STa, yaklaşık 2.000 Da'lık (Dreyfus et al., 1983), 50'den daha az sayıda amino asitten oluşan, genellikle yeni doğan hayvanlarda hastalığa neden olan zayıf immunojenik özellikte bir toksindir. Homolog ve heterolog antiserum ile nötralize olabilmekte, metanol ile çözünebilmekte ve bazik pH değerinde inaktive olabilmektedir ancak asidik pH'a dirençlidir (Takeda et al., 1983). Ayrıca disülfür bağları tam aktivite için gereklidir ve bu bağın yıkılması durumunda toksin inaktive olmaktadır (Okamoto et al., 1987). STa, hızlı etkili ancak kısa süreli etki eden bir toksindir (Hitotsubashi et al., 1992). STa; StaH ve StaP olmak üzere iki grupta incelenmektedir. STaH 19 aminoasitten oluşmakta ve yalnızca insanlarda görülebilmektedir. STaP ise 18 aminoasitten oluşmakta ve insan, domuz, buzağı, kuzu, tavuk ve atlarda tespit edilebilmektedir (Nair and Takeda, 1998). Buzağılarda ETEC kökenli ishallerde görülen tek toksin tipi STa'dır (Nagy ve Fekete, 2005). STa'yı kodlayan genler (*estA*), % 70' lik A-T içeriğine sahiptir ve çeşitli moleküler ağırlıktaki

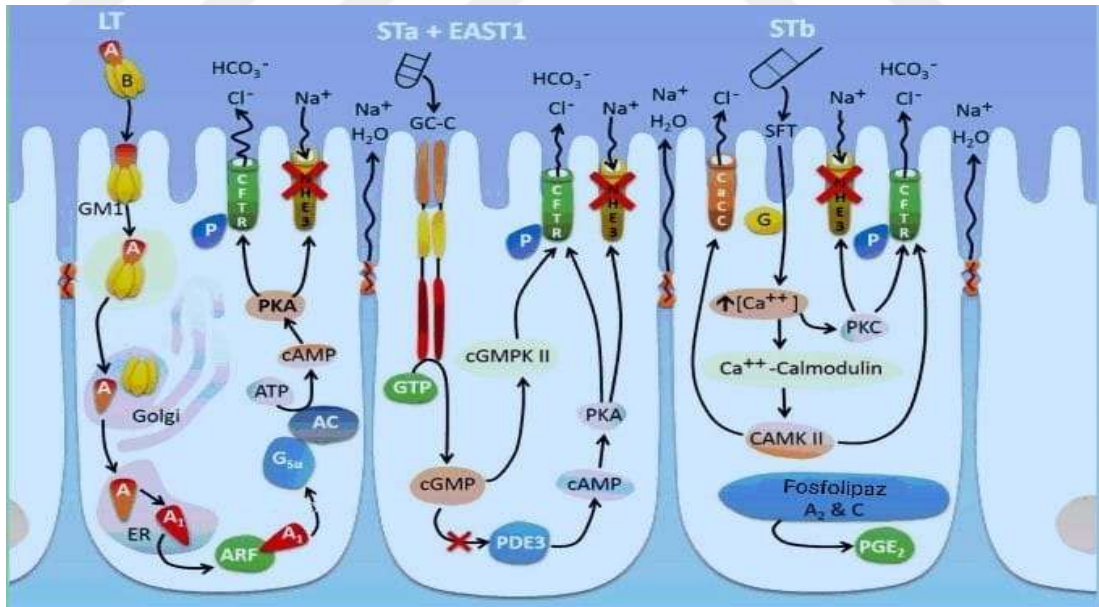
plazmidler üzerinde taşınan transpozonlarla ilişkilendirilmektedir (Sekizaki et al., 1985). Aynı plazmid üzerinde ilaç direnç genleri, kolonizasyon faktör genleri, kolisin genlerine de rastlanılabilmektedir (Harnett and Gyles, 1985). Hayvan ve insanlardan elde edilen STa genlerinin aynı transpozonun bir parçası olduğu düşünülmektedir (Sekizaki et al., 1985). STa geninin sekanslanması sonucu, bu genin domuz kökenli 52 ETEC suşunda özdeş olduğu ve glikoz içermeyen ortamlarda optimum verimde üretildiği ortaya konmuştur (Zhang et al., 2009). STa ilk olarak, pre-pro-STa olarak adlandırılan 72 amino asitten oluşan öncü molekül olarak üretilmektedir (Okamoto and Takahara, 1990). Bu polipeptit, 19 amino asit sinyal peptidi (pre-STa), 35 amino asit pro sekansı ve 18 veya 19 amino asit olgunlaşmış STa'dan oluşmaktadır (Rasheed et al., 1990). Pro-Sta, secA'ya bağlı olarak sitoplazmik zar boyunca yer değiştirir ve periplazmik boşluğa ulaşır (Yamanaka et al., 1993). Periplazmada, DsbA proteini tarafından üç disülfür bağı oluşur (Okamoto et al., 1995). STaH'da bulunan disülfür bağları, sistein 6 ve 11, 7 ve 15 ve 10 ve 18'e; STaP'da bulunan disülfür bağları ise sistein 5 ve 10, 6 ve 14 ve 9 ve 17'yi bağlamakta ve yapıyı kararlı hale getirmektedir (Yamasaki et al., 1988). Yapılan çalışmalar sonucu ikinci disülfür bağının toksisite için önemli ve gerekli olduğu, birinci veya üçüncü disülfür bağının ise yalnızca toksisiteyi arttırdığı tespit edilmiştir (Hidaka et al., 1991). STa, toksin ekspresyonunu bağırsak epitel hücrelerindeki siklik Guanozin Monofosfat (cGMP) oranının artması ile gerçekleştirmektedir (Arshad and Visweswariah, 2012). STa reseptörleri ince bağırsak ve kolonda bulunmaktadır (Cohen et al., 1992). Gerçekleştirilen bir dizi araştırma sonucu STa reseptörünün, atriyal natriüretik peptit reseptör ailesine ait olan guanilat siklaz C (GC-C) olduğu tespit edilmiştir. GC-C bağırsak epitel hücrelerinin fırça kenarlarında bulunan ve epitel hücrelerinden eksprese edilen bir glikoproteindir. GC-C için endojen agonistin, guanilin adı verilen 15 amino asitten oluşan ve bağırsaktaki sıvı ve elektrolit dengesinde rol oynayan bir hormon olduğu bulunmuştur (Weiglmeier et al., 2010). STa, guanilin hormonunu taklit edip bağırsaktaki GC-C aktivasyonunu bozarak sıvı-elektrolit dengesini olumsuz etkileyebilmektedir (Krause et al., 1994). GC-C aktivasyonunun bozulması sonucu hücre içi cGMP seviyeleri artmakta, bunun sonucunda kistik fibrozis transmembran regülatör kanalı (CFTR) aktive olmaktadır (Arshad and Visweswariah, 2012). CFTR aktivasyonu sonucu bağırsaktan klor ve bikarbonat iyonları salınmakta, sonrasında ozmotik basıncın artması nedeniyle de su salınımı gerçekleşmektedir (Hug et al., 2003). Yüksek cGMP seviyeleri fosfodiesteraz 3'ü (PDE3) inhibe ederek protein kinaz A (PKA) enzim

seviyesinin artmasına neden olmakta ve bu da sodyumun bağırsaktan geri emilimini engellemektedir (Weiglmeier et al., 2010). Ayrıca iki komşu hücrenin oluşturduğu sıvı ve iyon bariyerleri olan tight junction bariyerinin gevşemesi de sıvı kaybını arttırabilmektedir (Berkes et al., 2003). Tüm bu olaylar sonucunda hastalarda sulu ishal şekillenebilmektedir. STb özellikle yeni doğan ya da sütten yeni kesilen domuzlarda ETEC kökenli ishallerde sıklıkla tespit edilen güçlü bir toksindir (Spitzer et al., 2014). Domuzlar dışında köpek, kedi, gelincik ve insanlarda nadiren de olsa hastalığa neden olabilmektedir (Dubreuil, 1997). STb'nin siklik bir nükleotidten bağımsız sekresyonu, bu toksini STa'dan farklı özelliklere ve etki mekanizmasına sahip bir toksin yapmaktadır (Argenzio et al., 1984). STb yaklaşık 5200 Da'lık tek bir peptid zincirinden oluşan, STa ve EAST1 toksinleri ile homoloji göstermeyen, zayıf immunojenik özellikte bir toksindir (Lee et al., 1983). STb, izoelektrik noktası 9.6 olan oldukça bazik bir proteindir (Handl et al., 1993). Suda ve bazı organik çözücülerde çözünmemekte, ancak metanolde çözünmemektedir. β -merkaptotanol veya tripsinle muamele edildiğinde biyolojik aktivitesini kaybetmektedir (Fujii et al., 1991). 2-12 pH aralığından etkilenmez ancak proteaz degradasyonuna oldukça duyarlıdır (Whipp, 1991). STb'yi kodlayan genler (estB), genellikle diğer enterotoksinler, kolonizasyon faktörleri, ilaç direnci, kolisin üretimi ve transfer fonksiyonları dâhil olmak üzere diğer özellikleri kodlayan heterojen plazmidlerde bulunmaktadır (Harnett and Gyles, 1985). EstB; Tn4521 olarak adlandırılan yaklaşık 9 kb'lik transpozonun parçasıdır ve bir plazmidten diğerine geçebilmektedir (Hu et al., 1987). STb sentezinin kültür ortamının bileşimine göre değişmekle beraber, glikoz içeren ortamlarda baskılandığı bildirilmiştir (Busque et al., 1995). Çeşitli hayvan türlerinden izole edilen STb, aynı nükleotid ve amino asit sekanslarına sahiptir (Taillon et al., 2012). STb peptidi, 23 amino asitli bir sinyal sekansı içeren, 71 amino asitten oluşan öncü molekül olarak üretilmektedir (Picken et al., 1983). Olgun toksinin NH₂ terminalindeki ilk yedi amino asit yapıya veya toksisiteye dâhil değildir (Sukumar et al., 1995). 48 aminoasitten oluşan 8,1 kDa'lık pre-STb'nin olgun STb'ye dönüştürülmesi ve sekresyonu için secA, tolC, macAB ve dsbA genleri gerekmektedir (Foreman et al., 1995). SecA pre-STb'nin olgun STb'ye dönüşümünde, dsbA disülfür bağlarının oluşmasında, tolC ve macAB ise STb'nin translokasyonunda görev almakta ve bu genlerden birinin olmaması durumunda STb sekresyonu gerçekleşmemektedir (Arriaga et al., 1995; Kobayashi et al., 2003; Bavro et al., 2008). Glikosfingolipidler, amino alkol sfingozini içeren glikolipitlerin bir alt tipidir. Glikosfingolipidler bir grup

lipittir ve hücre zarının bir parçasıdır. Bir hidrofobik seramid kısmı ve glikosidik olarak bağlı bir karbonhidrat kısmından oluşmaktadırlar (Russo et al., 2018). Yapılan çalışmalar glikosfingolipidlerin STb reseptörü olduğunu göstermiştir (Chao and Dreyfus, 1997; Rousset et al., 1998). Sülfatid (SO₄-galactosyl-ceramide), bağırsak epitelinde yaygın olarak bulunan, STb'nin yüksek afinite gösterdiği ve bu afiniteden dolayı STb için önemli bir reseptör olan asidik bir glikosfingolipiddir (Goncalves et al., 2008). STb sülfatide bağlandıktan sonra Guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı regülatör proteini uyararak kalsiyum seviyesinin artmasına, bu artış da protein kinaz C (PKC) aktivasyonu sonucu sodyumun geri emiliminin engellenmesine neden olmaktadır (Dreyfus et al., 1993). Artan kalsiyum miktarı membran fosfolipidlerinden araşidonik asit seviyelerinin artmasına, bunun sonucunda da intraluminal sıvıdaki prostaglandin E₂ (PGE₂) ve nörotransmitter serotoninin biyosentezinde metabolik bir ara madde olan 5-Hidroksitriptofan (5-HT) seviyesinin artmasına yol açmaktadır (Fujii et al., 1995). PGE₂ ve 5-HT seviyelerinin artması bağırsaklardan su ve elektrolit salınımına neden olmaktadır (Harville and Dreyfus, 1995). Bu etki mekanizması CT'nin etki mekanizmasına benzemektedir (Dubreuil, 2012). Ayrıca STb direkt olarak kas hücrelerini etkileyerek bağırsak kaslarının spontan motilitesinin artması sonucu kas kasılmalarına neden olabilmektedir (Hitotsubashi et al., 1992). Kasların gevşemesine yardımcı olan Papaverin'in STb'yi inhibe etmesi bu görüşü desteklemektedir (Labrie et al., 2002).

EAST1, ilk kez Şili'de ishali bir çocuğun dışkılarından izole edilen enteroagregatif *E. coli* (EAEC) suşunda belirlenen peptidik bir toksindir (Savarino et al., 1991). Bu toksini kodlayan gen (*astA*), ETEC dahil olmak üzere ishale neden olan diğer *E. coli* patotiplerinde ve *Salmonella* gibi diğer enterik patojenlerde de bulunabilmektedir (Menard and Dubreuil, 2002). Bu toksin, bazı serogruplarda daha yaygın olmasına rağmen, belirli bir *E. coli* serotipi ile ilişkili değildir (Yamamoto and Taneike, 2000). EAST1 bazı fiziksel ve biyolojik benzerlikleri paylaştığı için STa ile karıştırılsa da, anti-STa antikorları ile reaksiyona girmemektedir (Savarino et al., 1991). EAST1 hayvan türlerinden özellikle domuz ve sığırlardan (Bertin et al., 1998; Choi et al., 2001) sıklıkla tespit edilebilmekle birlikte, genellikle insanlarda hastalığa neden olmakta ve tek başına hastalığa neden olmayıp, LT ile birlikte ishale yol açmaktadır (Berberov et al., 2004). EAST1 4100 Da'lık peptid zincirinden oluşan ve 38 amino asit içeren ısıya dayanıklı bir toksindir (Menard et al., 2004). STa ve STb'de

NH2 terminalinde klasik olarak bir sinyal peptidi bulunurken, EAST1 sekanslarında bu sinyal peptidi bulunmamaktadır (Savarino et al., 1993). 117 bp uzunluğunda bir DNA dizisi olan *astA* geni, EAST1'i kodlamaktadır. STa'yı kodlayan *estA* ile EAST1'i kodlayan *astA* arasında homoloji bulunmamaktadır. *AstA*'nın G+C içeriği % 53'ken, *estA*'nın G+C içeriği % 30'dur (Savarino et al., 1993). Yapılan çalışmalar *astA* geninin 60 MDa'lık bir plazmid ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Savarino et al., 1996). İnsanlarda sıklıkla tespit edilebilen EAST1 toksini, hayvanlarda en sık domuzlarda görülmekle beraber, özellikle F4 fimbriya sahip ETEC suşlarındaki plazmidlerde bulunmaktadır (Choi et al., 2001). Hayvanlarda ve insanlarda bulunan EAST1 geni arasında % 98 homoloji tespit edilmiştir (Berberov et al., 2004). EAST1'in yapısal olarak guaniline benzemesi, dört sistein içermesi, cGMP üretimini artırması ve reseptör olarak GC-C'ye bağlanması nedeniyle, etki mekanizmasının STa ile aynı olduğu düşünülmektedir (Dubreuil et al., 2016) (Şekil 2.7). İnsan ve hayvanlarda yapılan araştırmalar sonucu, EAST1 toksinin ishalleri hayvanlarda ve insanlarda daha sık tespit edildiği ancak tek başına ishale neden olmadığı ve bağırsakta kolonizasyon olsa dahi mukozada harabiyet yaratmadığı kanaatine varılmıştır (Nataro et al., 1995; Fujihara et al., 2009; Zajacova et al., 2013).



Şekil 2.7. ETEC enterotoksinlerinin reseptörleri ve etki mekanizması. CFTR: Kistik fibrozis transmembran regülatör kanalı, AC: Adenilat siklaz, ARF: ADP ribosilasyon faktörü, PKA: Protein Kinaz A, PKC: Protein Kinaz C, GC-C: Guanilat siklaz C, SFT: Sültatid, ER: Endoplazmik retikulum, PDE3: Fosfodiesteraz 3, cGMPKII: cGMP bağımlı protein kinaz II, cAMPKII: kalsiyumla aktive olan protein kinaz II, CaCC: Kalsiyumla aktive olan klorür kanalı, P: Fosforilasyon (Dubreuil et al., 2016)

ETEC için önemli ve karakteristik virülens faktörleri olan fimbria ve enterotoksinlerin dışında TibA, Tia, ClyA, EatA, AIDA gibi diğer bazı virülens faktörleri de ETEC patogeneğinde rol oynamaktadır (Wu et al., 2007). Bu virülens faktörleri gibi çeşitli diğer faktörler, insanlarda ETEC'in neden olduğu gezgin ishalinden korunmak için yapılan aşı geliştirme çalışmalarında kullanılmakla birlikte, hayvanlarda henüz yeteri kadar araştırma yapılmamıştır (Dubreuil et al., 2016).

İki ayrı invazyon lokusundan (Tia, Tib) biri olan Tib, hücrelere yapışmakla görevli kromozom olarak kodlanan bir virülens faktörü olarak tanımlanmaktadır. Ototransporter ailesinin bir üyesi olan TibA, bazı ETEC suşlarında bulunan 104 kDA'lık dış zar proteinidir (Elsinghorst and Kopecko, 1992). Ototransporterler translokasyona aracılık eden N-terminal sinyal peptidi ve C-terminal translokasyon ünitesinden oluşmaktadır (Henderson et al., 2004). TibA'nın dışında TibB, TibC ve TibD'de bulunmaktadır ancak görevleri henüz net olarak bilinmemektedir (Turner et al., 2006). TibA ilgili reseptöre bağlanarak kolonizasyona ve biyofilm oluşumuna yardım etmektedir (Sherlock et al., 2005).

TibA'ya ek olarak, Elsinghorst ve Kopecko (1992) Tia adı verilen kromozom olarak kodlanmış ikinci bir adhezyon tanımlamıştır. Tia 46 kb'lık bir patojenite adasında kodlanmaktadır (Fleckenstein et al., 2000). Tia'nın antiserum ile engellenmesi sonucu Tia eksprese eden bir *E. coli* suşunun, Tia antiserumu ile engellenmesi sonucu invazyon görülmediği için Tia'nın invazyonda görev aldığı düşünülmektedir (Mammarappallil and Elsinghorst, 2000). Ayrıca yapılan çalışmalar Tia'nın hücre yüzeyinde bulunan glikozaminoglikanlar olan heparin-sülfat proteoglikanına bağlandığını ortaya koymuştur (Fleckenstein et al., 2002).

E. coli ototransporter protein A (EatA), Enterobacteriaceae serin proteaz ototransportörleri olarak adlandırılan daha geniş bir ototransportör grubuyla homolojiye sahip olan ve toksinler gibi davranan virülans faktörleri olarak tanımlanmaktadır (Henderson et al., 2004). EatA'nın katepsin G adı verilen serin proteazlar için substrat olduğu ve epitel hücrelere zarar vererek virülenste rol oynadığı düşünülmektedir (Patel et al., 2004). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucu enfeksiyon oluşumunda EatA'nın gerekli olmadığı ancak bulunduğu takdirde enfeksiyon oluşumunun hızlandığı sonucuna varılmıştır (Turner et al., 2006).

HlyE ve SheA olarak da adlandırılan sitolizin A (ClyA), ilk olarak *E. coli* K-12'de tanımlanmış, daha sonra farklı *E. coli* suşlarında da tespit edilmiştir (Ludwig et

al., 1999). Ökaryotik hücre zarındaki kolestrolün ClyA reseptörü olduğu düşünülmektedir (Oscarsson et al., 1999). İn vitro çalışmalar saflaştırılmış ClyA'nın eritrositlerde hemolize ve makrofajlarda sitotoksositeye neden olabileceğini göstermiştir (Wai et al., 2003).

Ototransporter bir protein olan diffuz yapışma ile ilişkili adhesin (AIDA), özellikle domuzlarda görülen ödem hastalığı ve PWD'de rol oynayan afimbrial bir adhezindir (Ngeleka et al., 2003). AIDA insanlarda 1980'li yıllarda (Benz and Schmidt, 1989), domuzlarda ise 2001 yılında tespit edilmiş ve araştırılmıştır (Niewerth et al., 2001). AIDA patogeneze genellikle STb ile birlikte rol oynamaktadır ve bu toksinle yakından ilişki halindedir (Fekete et al., 2002).

ETEC ile ilgili birçok araştırma yapılmasına ve etkili aşılar üretilmesine rağmen sütten kesme yaşı, beslenme ve mevsim gibi çevresel faktörler ya da aşı suşu dışındaki diğer serotiplerin hastalık yapmaya başlaması nedeniyle günümüzde hala yeni doğan ishallerinden sıklıkla izole edilmekte ve önemli yer tutmaktadır (Dubreuil et al., 2016). ETEC hakkında araştırmaların yapılabilmesi ve etkili aşı üretilmesi için virülens faktörlerinin bilinmesi önem teşkil etmektedir.

2.1.1.4. Nekrotoksijenik *E. coli*

Nekrotoksijenik *E. coli* (NTEC) insan ve yeni doğan hayvanlarda septisemi, ishal ve üriner sistem enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Borriello et al., 2012). NTEC suşları ilk kez 1983 yılında neonatal enteritis olgusunda bildirilmiştir (Caprioli et al., 1983). Ürettikleri toksine göre iki farklı NTEC türü rapor edilmiştir (De Rycke et al., 1999). NTEC1 tarafından sitotoksik nekrotize edici faktör 1 (CNF1), NTEC2 tarafından ise sitotoksik nekrotize edici faktör 2 (CNF2) sentezlenir. CNF1 kromozomal olarak kodlanırken CNF2 ise vir plazmidi üzerinde yer alan genler tarafından kodlanır (Blanco et al., 1992). CNF'ler, doku patolojisi ve konak hastalığına neden olan güçlü toksinlerdir. CNF toksinlerinin hem insan hem de hayvanlarda görülen şiddetli dizanterideki rolleri, birkaç klinik raporla kanıtlanmıştır (Paciorek, 2002; Tavechio et al., 2004). NTEC, CNF1 ve CNF2 dışında sitoletal distansiyon toksini (CDT), hemolizin (hly), P fimbriae (pap), afimbrial adezinler (afa), S fimbriae (sfa) gibi toksinler de üretebilmektedir (Boquet, 2001).

2.1.1.5. Enteroinvaziv *E. coli*

Kiyoshi Shiga, basiller dizanteri adını verdiği hastalığa neden olan bakterilerin ilk karakterizasyonunu 1898'de yapmıştır. Bu suşun *E. coli* ile benzerliklerini fark ederek bu bakteriyi *E. coli*'den ayırt etmek için ona *Bacillus dysenterie* adını vermiştir (Buetow et al., 1956). Sonraki yıllarda, araştırmacılar tarafından daha fazla suş izole edilerek 1940'lı yıllarda *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* ve *S. sonnei* olmak üzere dört türden oluşan *Shigella* genusu ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, 1944'te, *E. coli*'nin mukozaya nüfuz etmeyen diğer patojenik suşlarının aksine, *Shigella*'ya benzer şekilde kolon mukozasını istila edebilen, ilk önce *Paracolon bacillus* olarak adlandırılan *E. coli* suşları tanımlanmıştır. Daha sonra bu bakteri enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) olarak isimlendirilmiştir (Ud-Din and Wahid, 2014). EIEC, bakteriyel nedenli diyarenin etiyolojik ajanlarından olmasına rağmen, global düzeyde yeterli sayıda epidemiyolojik çalışma yapılmamıştır. Diğer ishale neden olan enteropatojenlere göre, ishalin nadir etiyolojik ajanı olduğu düşünüldüğünden dolayı EIEC'nin epidemiyolojisine yeterli dikkat gösterilmemiştir (Vieira et al., 2007; Moreno et al., 2009).

2.1.1.6. Enteroagregatif *E. coli*

İlk olarak 1987'de tanımlanan enteroagregatif *E. coli* (EAEC), gelişmekte olan ülkelerdeki çocuklarda görülen, 14 günden fazla sürebilen ve ölüme neden olabilen kalıcı ishal sendromuna sebep olmaktadır (Nataro et al., 1998). Bulaşmada kontamine yiyecek ve sular büyük önem taşımaktadır. Hastalık agregatif adherens fimbria I (AAF/I) ile ileuma adheze olma aşamasıyla başlamaktadır (Nataro et al., 1992). Adhezyonu takiben bir biyofilm oluşumu, aşırı mukus üretimi ve bunların sonucunda bağırsakta besinlerin malabsorbsiyonu gerçekleşmektedir. Son aşamada ise enteroagregatif stabil toksin 1 (EAST1) adı verilen, başka patotiplerde de görülebilen, 38 aminoasitli, ısıya dayanıklı bir toksin olan EAST1, *Shigella* enterotoxin 1 (ShET1) ve pet toksin gibi toksinler salınarak, gelişen yangıyı takiben onarılamayan bağırsak hasarı ve kalıcı ishal görülmektedir (Knutton et al., 1992).

Karakteristik mukus biyofilmini oluşturmaya ek olarak birçok EAEC suşu, bağırsak mukozası üzerinde sitotoksik etkilere neden olur. Tavşan ve fare ileal loop testinde EAEC suşları ile enfeksiyon sonucu önemli lezyonlar rapor edilmiştir (Vial et al., 1988). EAEC, villusların kısılmasına, villus uçlarının hemorajik nekrozuna, submukozada ödeme ve mononükleer infiltrasyona neden olmaktadır. EAEC,

dünyanın dört bir yanındaki sanayileşmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki insanlarda, özellikle de çocuklarda ishalleri hastalıkların başlıca bakteriyel etkenlerinden biridir (Pabst et al., 2003; Sarantuya et al., 2004; Nataro et al., 2006; Al-Gallas et al., 2007; Alikhani et al., 2012). Yetersiz sanitasyon ve kalabalık yaşam koşulları, EAEC'nin yayılma eğilimini artırmaktadır (Pawlowski et al., 2009). Ayrıca, düşük sıcaklıklarda enfeksiyon oranları önemli ölçüde azalan ETEC, EPEC ve EIEC gibi diğer ishal yapan *E. coli* suşlarının aksine EAEC kaynaklı gezgin ishalleri prevalansı, kış ve yaz mevsimleri boyunca sabit kalmaktadır (Paredes-Paredes et al., 2011).

Tipik olarak hastalık hafif ateş ve az miktarda kusmanın eşlik ettiği, sulu, mukoid bazen de kanlı olabilen ishal ile kendini gösterir (Czczulin et al., 1997). EAEC'in neden olduğu ishallerin süresi, hastalığın en önemli özelliklerinden biridir. Kuzey Hindistan'daki Anapur-Palla'da yapılan bir çalışmada, 3 yaşın altındaki çocuklarda EAEC ile ilişkili ishal vakalarının ortalama süresinin 17 gün olduğu ve bu sürenin diğer patojenlere kıyasla daha uzun olduğu görülmüştür (Bhan et al., 1989).

EPEC ile ilgili hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar günümüzde yetersiz kalmaktadır. Buzağılar üzerinde yapılan üç ülkeden üç yayında test edilen 147 izolatın hiçbirinde EAEC ile ilgili olan AAF/I bulunamamıştır (Kolenda et al., 2015).

2.1.1.7. Diffuz adherent *E. coli* (DAEC)

DAEC insanlarda idrar yolu enfeksiyonlarına, kadınlarda intrauterin enfeksiyonlara ve yeni doğan çocuklarda kalıcı hale gelebilen sulu ishalleri neden olan yaygın bir patotiptir (Hart et al., 2001; Servin, 2005). DAEC suşları heterojen bir izolat grubudur ve hepsi HEp-2 veya HeLa hücrelerine diffuz adhezyon (DA) sergiler. DAEC izolatlarının DA paterni, afa/dra/daa ilişkili operon ailesi tarafından kodlanan adhezinlerin üretiminden kaynaklanmaktadır (Cravioto et al., 1991). Afa/dra/daa operonları patogeneze önemli olan hem afimbrial (AfaE-I ve AfaE-III gibi) hem de fimbrial (F1845 ve Dr gibi) adheziv yapıları kodlarlar (Pham et al., 1997). Bu fimbrial ve afimbrial yapılar sistit, pyelonefrit, metritis ve diyarenin patogenezinde rol oynar.

DAEC ile ilgili sığır ve buzağılarda yapılan 9 farklı çalışmadan elde edilen veriler, bu patotipin yaygınlığının ETEC yaygınlığına benzer olduğunu göstermektedir. DAEC virulens faktörlerinin varlığı, 10 ülkede yapılan dokuz yayında 1568 izolat üzerinde araştırılmış olup çalışmalar sonucunda Afa'nın sağlıklı hayvanlara kıyasla ishalleri hayvanlarda önemli ölçüde daha sık görüldüğü tespit

edilmiştir. F1845 sadece iki yayında araştırılmış ve 136 izolattan üçü (% 2,2) pozitif bulunmuştur (Kolenda et al., 2015). DAEC insanlarda hastalığa neden olan etiyolojik ajanlar olarak bilinirken, sığır ve buzağılardaki yaygınlıkları hakkında yetersiz bilgi vardır.

2.1.1.8. Adherent İnvaziv *E. coli* (AIEC)

Crohn hastalığı (CD) ve ülseratif kolit (UC) başta olmak üzere, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının (IBD) etiyolojisinde, bağırsak mikrobiyotasına karşı anormal mukozal bağışıklık tepkisine yol açan çevresel faktörler, enfeksiyöz ajanlar ve genetik yatkınlık önemli roller oynamaktadır (Carrière et al., 2014). Çevresel faktörlere stres, sigara ve alkol tüketimi, obezite ve yetersiz beslenme gibi bazı yaşam tarzları örnek verilebilirken (Shaler et al., 2019), genetik faktörlere ise Lynch sendromu, kalıtsal adenomatöz polipoz gibi genetik hastalıklar örnek verilebilir (Syngal et al., 2015). Hastalığa sıklıkla neden olan enfeksiyöz ajanlar arasında *Clostridium difficile*, *Mycoplasma* spp., *Mycobacterium* spp., *Salmonella* spp., *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, AIEC ve *Helicobacter pylori* bulunmaktadır (Mirsepasi-Lauridsen et al., 2019; Perna et al., 2020).

AIEC ilk kez 1999 yılında tanımlanmış, IBD ile ilişkili enfeksiyöz bir etkindir (Boudeau et al., 1999). AIEC'nin neden olduğu UC; kolonla sınırlı, alevlenmeler sırasında kanlı ishal ile karakterize, sık tekrarlayan, kronik inflamatuvar bir hastalıktır. CD ise ağızdan anüse kadar olan gastrointestinal sistem boyunca tüm bölümleri etkileyebilen kronik, segmental, lokalize granülomatöz bir hastalıktır. Klinik bulgular hastalığın lokalizasyonuna bağlı olmakla birlikte en sık görülen semptomlar diyare, karın ağrısı, ateş, barsak tıkanıklığı, kanlı ve mukuslu dışkıdır (Baumgart and Sandborn, 2007).

AIEC'nin patogenezinde protein sentezi, sinyal iletimi, hücre bölünmesi, iyon sekresyonu, transkripsiyon, hücre iskeleti fonksiyonu ve mitokondriyal fonksiyon gibi konakçı hücre ile ilgili olaylar önemlidir (Torres et al., 2005). AIEC ile ilgili çalışmalar, etkenin karsinoembriyonik antijen 6 ile ilişkili hücre adezyon moleküllerine (CEACAM6) bağlanarak bağırsak mukozasına yapışabildiğini, konakçı hücre aktin mikrofilyamentleri ve mikrotübülleri kullanarak bağırsak epitel hücrelerini istila edebildiğini, hücre içinde çoğalabildiğini, insan bağırsağı boyunca yer değiştirebildiğini göstermektedir (Barnich and Darfeuille-Michaud, 2007). Bununla birlikte, günümüzde AIEC'nin sahip olduğu spesifik virulens genleri hakkındaki bilgi

yetersizdir ve bununla ilgili çalışmalar devam etmektedir (Mirsepasi-Lauridsen et al., 2019).

2.1.2. Ekstraintestinal *E. coli* Patotipleri

2.1.2.1. Üropatojenik *E. coli*

İdrar yolu enfeksiyonları günümüzde görülen en yaygın patolojik durumlardan biridir. Her yıl dünya çapında yaklaşık 150 milyon insanı ve birçok hayvan türünü etkileyen, antibiyotik direnç gelişimine neden olan bu idrar yolu enfeksiyonlarına en sık üropatojenik *E. coli* (UPEC) neden olmaktadır (Terlizzi et al., 2017). UPEC dışında *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus bovis* ve *Candida albicans* gibi mikroorganizmalar da idrar yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Parish and Holliday, 2012; Hof, 2017). Semptomatik idrar yolu enfeksiyonları; ürosepsis sendromu, piyelonefrit ve sistit olarak sınıflandırılmaktadır (Smelov et al., 2016).

UPEC, komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonlarının yaklaşık % 80'inden, toplum kaynaklı enfeksiyonların % 95'inden ve hastane kaynaklı enfeksiyonların % 50'sinden sorumludur (Tabasi et al., 2016). Birçok çalışma, çiftlik hayvanlarının insanlarda idrar yolu enfeksiyonlarından sorumlu virülans genleri taşıyan *E. coli* suşlarının rezervuarları olabileceğini düşündürmektedir (Kot, 2019). UPEC hastalığa Genomik Patojenite Adaları (PAI), adezinler, toksinler, yüzey polisakkaritleri, Afa, Dr, F1C, S, Tip 9, Tip 3, Tip 1, P flagella ve demir bağlama sistemi gibi virülans faktörleriyle neden olmaktadır. UPEC üretral, periüretral ve vajinal alanların kolonizasyonuna, biyofilm oluşumuna, artan bakteriyemi ile birlikte böbreklerin kolonizasyonuna neden olmakta ve bunların sonucunda doku hasarı görülebilmektedir (Terlizzi et al., 2017).

2.1.2.2. Avian patojenik *E. coli*

Avian patojenik *E. coli* (APEC); tavuklar, hindiler, ördekler ve diğer birçok kanatlı türünde çeşitli lokal ve sistemik enfeksiyonlara neden olabilen bir etkindir (Dho-Moulin and Fairbrother, 1999). Kanatlılarda APEC'in neden olduğu en yaygın enfeksiyonlar perihepatit, hava kesesi yangısı, perikardit, yumurta peritoniti, salingit, koligranüloma, omfalit, selülit ve osteomyelit/arthritis. APEC ayrıca tavuklarda şiş kafa sendromuna ve hindilerde osteomyelit kompleksine neden olur. Bu hastalıklar genel olarak avian colibacillosis olarak adlandırılır (Dziva and Stevens, 2008).

Kolibasillozis sonucunda kümes hayvanlarının canlı ağırlık artışında, karkas ağırlığında, yemden yararlanma oranında ve yumurta üretiminde azalma görülmektedir (Guabiraba and Schouler, 2015). Ayrıca APEC, genç tavuklarda yüksek oranda mortaliteye neden olmaktadır (Mellata, 2013). Hastalığın neden olduğu semptomlar ve hastalığın tedavisi sırasında oluşan masraflar nedeniyle APEC, kanatlı endüstrisinde dünya çapında önemli derecede ekonomik kayba sebep olmaktadır (Ghunaim et al., 2014). 4-6 haftalık civcivler hastalığa daha yatkın olmakla birlikte, tüm yaş grupları hastalıktan etkilenebilir (Dho-Moulin and Fairbrother, 1999). Görülen vakalara genellikle O78, O2 ve O1 serotipleri sebep olmaktadır (Ghunaim et al., 2014).

Yapılan çalışmalar APEC'in tavukların gastrointestinal sistemi ve solunum yollarını hastalığa neden olmadan kolonize edebildiğini ve sadece fırsatçı bir patojen olarak stres faktörlerinin varlığında trachea ve bağırsak epitelinin kan dolaşımına karışarak bağırsak dışı bölgelere yer değiştirebildiğini göstermiştir (Collingwood et al., 2014). Bulaşmada kontamine yem ve su önemlidir. Tavuklar arasında feko-oral veya aerosol yolla bulaşmanın yanı sıra vertikal bulaşma da görülebilmektedir (Dziva and Stevens, 2008).

APEC kaynaklı hastalıklara başta adezinler, invazinler, koruyucular, demir bağlama kapasitesi ve toksinler olmak üzere farklı virulans faktörleri neden olmaktadır. Bu faktörler, etkenin yapışmasını, invazyonunu, konakçı immün yanıtlarından kaçmasını, kolonizasyonunu, çoğalmasını ve sistemik yayılmasını kolaylaştırarak tavuklarda enfeksiyon oluşumuna izin verir. Bu faktörlere ek olarak, salgı sistemleri (tip III ve VI), çekirdek algılama (QS) sistemleri, transkripsiyonel düzenleyiciler, iki bileşenli sistemler ve metabolizma ile ilişkili genler dahil olmak üzere diğer birçok virulans faktörü de APEC patogeneze katkıda bulunur (Kathayat et al., 2021).

Son araştırmalar insan ExPEC izolatlarında APEC'e özgü kolisinV (ColV) plazmidlerinin saptanması nedeniyle APEC'in gıda kaynaklı potansiyel bir zoonotik patojen olduğunu göstermektedir (Liu et al., 2018). Bu nedenle APEC, kümes hayvanları endüstrisi dışında halk sağlığı için de önem taşıyan bir patojendir. Tedavide antibiyotiklerin sık kullanılması direnç gelişimi açısından önem arz etmektedir. Tavukların hastalıktan korunması için aşılar kullanılmakla birlikte, saha salgınlarındaki kolibasilloz vakalarıyla ilişkili APEC serotiplerinin çeşitliliği

nedeniyle yeterince korunma sağlanamamaktadır. Bunların dışında probiyotikler, bakteriyofajlar doğal immün uyarıcılar, QS inhibitörleri ve antimikrobiyal peptidler gibi farklı yeni tedavi yöntemlerinin tavuklarda APEC enfeksiyonlarını azaltmada önemli olduğu düşünülmektedir (Kathayat et al., 2021).

2.1.2.3. Neonatal Meningitise Neden Olan *E. coli*

NMEC, yeni doğanlarda akut meningitis ve sepsise neden olan ekstraintestinal *E. coli* patotiplerinden biridir. Etken hastalığa S fimbria ve kapsülü ile neden olabilmektedir (Gaschignard et al., 2011).

2.2. Antibiyotikler

2.2.1. Antibiyotiklerin Tarihçesi

Bakteriyel hedeflerle spesifik etkileşimlere girerek bakterilerin üremesini engelleyen ya da öldüren organik moleküllere antibiyotik denilmektedir (Davies and Davies, 2010). Antibiyotikler doğal, yarı sentetik ya da sentetik moleküller olarak sınıflandırılmaktadır (Grenni et al., 2017). Günümüzde kliniklerde kullanılan antibiyotiklerin % 90'ı çeşitli mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Katz and Baltz, 2016). Bakterileri öldüren antibiyotiklere bakterisidal, bakterilerin üremesini inhibe eden antibiyotiklere ise bakteriyostatik adı verilmektedir. Antibiyotikler bu etkilerini bakterinin belirli hedef bölgelerini etkileyerek göstermekte olup, bakteriler ise bu etki mekanizmalarına karşı antibiyotiklere direnç geliştirmektedirler (Abushaheen et al., 2020).

Antibiyotikler, bakterilere karşı mücadelede insan toplumu için bir kurtarıcı olmuş ve geçmişten günümüze milyonlarca hayatı kurtarmıştır. Antibiyotik üreten mikroorganizmaların hastalıkları önlemek için kullanılması, 2000 yıldan daha uzun bir süre önceye dayanmaktadır. Eber'in MÖ 1550'den kalma papirüsü, korunmuş en eski tıbbi belgedir ve tedavi listesi arasında küflü ekmek ve şifalı toprak bulunmaktadır. Sırbistan, Çin, Yunanistan ve Mısır'da da açık yaraları tedavi etmek için geleneksel küflü ekmek kullanılmaktadır. (Haas, 1999).

Antibiyotiklerle ilgili yapılan çalışmalar sonucunda geçmişten günümüze birçok antibiyotik grubu keşfedilmiştir (Tablo 2.4). Keşfedilen ilk antibiyotik 1910'da Paul Ehrlich ve çalışma arkadaşları tarafından frengi hastalığının etkeni olan *Treponema pallidum*'a karşı kullanılan, arsenik türevi ilk sentetik antibiyotik olan Salvarsan (arsfenamin)'dır (Pallasch, 1986). Kısa bir süre sonra frengi tedavisinde Salvarsan'a

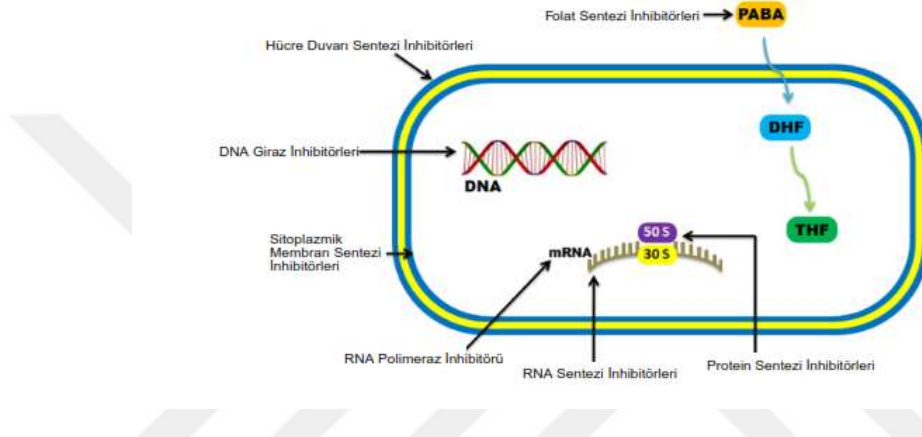
göre daha az tehlikeli ve daha etkili olan Neosalvarsan, 1913 yılında piyasaya sürülmüştür (DiGiandomenico and Sellman, 2015). Salvarsan ve Neosalvarsan, antimikrobiyal sınıfının ilk ilaçları sayılmakla birlikte yüksek arsenik içerikleri ve kısa bir süre sonra oluşan direnç nedeniyle bu ilaçların kullanımına son verilmiştir. İlk gerçek antibiyotik olan penisilin, 1928'de Alexander Fleming tarafından keşfedilmiştir. Fleming'in bir mantar olan *Penicillium notatum*'un agar besiyerinde stafilokok gelişimini engellediğini gözlemlemesi, penisilin olarak bilinen maddenin izolasyonunu ve tanımlanmasını sağlamıştır (Bennett and Chung, 2001). Penisilinin saflaştırılıp klinik olarak kullanımından önce, 1930 yılında Alman bakteriyolog Gerhard Domagk tarafından keşfedilen, geniş spektrumlu bir antibiyotik olan sülfonamid etken maddeli prontosil, yaralıların tedavisinde başarılı şekilde kullanılmış ve antibiyotiklerin tarihinde önemli dönüm noktalarından birisi olmuştur (Golkar et al., 2014). 1939'da Fransız mikrobiyolog René Dubos, toprak bakterisi olan *Bacillus brevis*'ten elde edilen tirotrisini saflaştırarak, klinik kullanıma sunmuştur. Ancak bu ilaç yüksek toksisite gösterdiği için kullanımı durdurulmuş ve yalnızca topikal uygulamalarda kullanılması uygun görülmüştür (Mohr, 2016). Fleming tarafından keşfedilen penisilinin saflaştırılıp klinik olarak kullanımı 1940 yılında gerçekleşmiştir. Bu antibiyotik yalnızca Gram-pozitif bakterilere karşı çalıştığı için birçok bulaşıcı hastalığa büyük ölçüde etkisiz kalmıştır (Spagnolo et al., 2021). Gram-negatif bakterilerin tedavisi, 1943'te Rutgers Üniversitesi'ndeki Selman Waksman'ın streptomisini keşfetmesiyle başlamıştır (Czaplewski et al., 2016). Waksman, *Streptomyces* spp. üzerinde yürüttüğü sistematik çalışmaları sayesinde aktinomisin, neomisin, streptomisin, klavasin ve fumigasin'i keşfederek antibiyotiklerin altın çağını başlatmıştır (Durand et al., 2019; Ribeiro da Cunha et al., 2019). 1950 ve 1960 yıllarda birçok bakteri türü ve mantar türünden 20'den fazla antibiyotik sınıfı keşfedilmiştir (Nicolaou and Rigol, 2018). Antibiyotiklerin altın çağında yapılan keşiflerden sonra yeni antibiyotik gruplarıyla ilgili çalışmalar oldukça azalmış ve yalnızca birkaç yeni antibiyotik grubu keşfedilmiştir (Hutchings et al., 2019). Artan antibiyotik direnci ve üretim maliyeti nedeniyle 1980'lerde antibiyotik çalışmaları yürüten 20 ilaç firmasından yalnızca 5'i yeni antibiyotik çalışmalarına devam etmektedir (Theuretzbacher et al., 2020).

Tablo 2.4. Klinikte kullanıma sunulan antibiyotik sınıflarının keşif yılı ve kaynakları (Hutchings et al., 2019)

Sınıf	Keşif Yılı	Klinik Kullanım Yılı	Örnek
Aminoglikozidler	1944	1946	Kanamisin A (<i>Streptomyces kanamyceticus</i>)
Tetrasiklinler	1948	1948	Tetrasiklin (<i>Streptomyces aureofaciens</i>)
Amfenikoller	1947	1949	Kloramfenikol (<i>Streptomyces venezuelae</i>)
Makrolidler	1952	1952	Eritromisin (<i>Saccharopolyspora erythraea</i>)
Tuberaktinomisinler	1951	1953	Viomycin (<i>Streptomyces puniceus</i>)
Glikopeptidler	1954	1958	Vancomycin (<i>Amycolatopsis orientalis</i>)
Linkozamidler	1962	1963	Klindamisin (<i>Streptomyces lincolnensis</i>)
Ansamisinler	1959	1963	Rifamisin (<i>Amycolatopsis rifamycinica</i>)
Sikloserinler	1955	1964	Seromisin (<i>Streptomyces orchidaceus</i>)
Streptograminler	1953	1965	Pristinamisin (<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>)
Fosfonatlar	1969	1971	Fosfomisin (<i>Streptomyces fradiae</i>)
Karbapenemler	1976	1985	Meropenem (<i>Streptomyces cattleya</i>)
Lipopeptidler	1987	2003	Daptomisin (<i>Streptomyces roseosporus</i>)
Lipiamisinler	1975	2011	Fidaksomisin (<i>Dactylosporangium aurantiacum subsp. hamdenensis</i>)
Polipeptidler	1939	1941	Gramisidin A (<i>Bacillus brevis</i>)
Basitrasin	1945	1948	Basitrasin A (<i>Bacillus subtilis</i>)
Polimiksinler	1950	1959	Kolistin (<i>Paenibacillus polymyxa</i>)
Mupirosin	1971	1985	Mupirosin (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
Monobaktamlar	1981	1986	Aztreonam (<i>Chromobacterium violaceum</i>)
Penisilinler	1929	1943	Amoksisilin (<i>Penicillium chrysogenum</i>)
Fusidik Asit	1958	1962	Fusidik Asit (<i>Fucidum coccineum</i>)
Enniatinler	1953	1963	Fusafungin (<i>Fusarium lateritium</i>)
Sefalosporinler	1948	1964	Sefasetril (<i>Acremonium chrysogenum</i>)
Pleuromutilinler	1951	2007	Retapamulin (<i>Pleurotus mutilus</i>)
Arsfenaminler	1907	1910	Salvarsan (Sentetik)
Sülfanomidler	1932	1936	Mafenid (Sentetik)
Salisilatlar	1902	1943	4-Aminosalisilik asit (Sentetik)
Sülfonlar	1908	1945	Dapson (Sentetik)
Piridinamidler	1952	1952	Isoniazid (Sentetik)
Nitrofuraneler	1945	1953	Nitrofurantoin (Sentetik)
Azoller	1959	1960	Metronidazol (Sentetik)
Florokinolonlar	1962	1962	Siprofloksasin (Sentetik)
Diaminopirimidinler	1950	1962	Trimetoprim (Sentetik)
Ethambutol	1962	1962	Ethambutol (Sentetik)
Thioamidler	1956	1965	Ethionamid (Sentetik)
Fenazinler	1954	1969	Klofazimin (Sentetik)
Oksazolidinonlar	1987	2000	Linezolid (Sentetik)
Diarilkinolonlar	2004	2012	Bedaquilin (Sentetik)

2.2.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

Antibiyotikler, bakteri üzerinde etkiledikleri hedef bölgelere göre beş farklı kategoriye ayrılmaktadır. Bakteri hücre duvarı sentezinin inhibisyonu, bakteriyel protein sentezinin inhibisyonu, bakteriyel nükleik asit sentezinin inhibisyonu, bakteriyel sitoplazmik membran fonksiyonunun inhibisyonu ve metabolik yolların inhibisyonu (Şekil 2.8) antibiyotiklerin etkilerini gösterdiği başlıca mekanizmalardır (Abushaheen et al., 2020). Antibiyotik ilaç grupları bu yollardan birini kullanarak bakterileri etkilemektedir (Tablo 2.5).



Şekil 2.8. Antibiyotiklerin etki mekanizması. DHF: Dihidrofolat THF: Tetrahidrofolat PABA: Paraaminobenzoik asit (Uddin et al., 2021)

Tablo 2.5. Antibiyotiklerin etki mekanizmasına göre hedef bölge, antibiyotik sınıfı ve etken maddeleri (Uddin et al., 2021)

Etki Mekanizması	Hedef	Antibiyotik Sınıfı	Etken Madde Örneği
Hücre Duvarı Sentezi İnhibitörleri	Penisilin Bağlayıcı Protein	β-Laktamlar	Penisilin-G, Amoksisilin, Sefalosporin-C
	Peptidoglikan Alt Birimi	Glikopeptidler	Vankomisin
Protein Sentezi İnhibitörleri	30S Alt Birimi	Aminoglikozitler, Tetrasiklinler	Streptomisin, Gentamisin, Neomisin, Tetrasiklin, Doksisisiklin
	50S Alt Birimi	Makrolidler, Kloramfenikoller, Oksazolidinonlar	Eritromisin, Azitromisin, Klora mfenikol, Linezolid
Nükleik Asit Sentezi İnhibitörleri	RNA	Ansamisin (Rifamisin)	Rifampin
	DNA	Florokinolonlar	Ciprofloksasin, Ofloksasin
Metabolik Yolların İnhibisyonu (Antimetabolik)	Folik Asit Sentez Enzimleri	Sülfanomidler ve trimetoprim	Sülfametaksazol, Dapson, Trimetoprim
Sitoplazmik Membran Fonksiyonu İnhibitörleri	Lipopolisakkarit	Polimiksinler	Polimiksin B ve Colistin

2.2.2.1. Hücre Duvarı Sentezinin İnhibisyonu

Peptidoglikan tabakadan oluşan hücre duvarının temel işlevi hücrenin şeklinin korunması ve dış etkilere karşı bakteriyi korumaktır (Green, 2002). Bakteriler kısa peptidler ile çapraz bağlanmış olan glikan ipliklerden oluşan peptidoglikan tabaka ile ozmolizden korunurlar (Vollmer et al., 2008). Bu yapı hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde bulunmakta, ancak kalınlıkları farklılık göstermektedir.

Hücre duvarını sentezinin inhibisyonuna neden olan antibiyotikler arasında monobaktam, β -laktam ve glikopeptid antibiyotik sınıflarına ait aztreonam, penisilin, ampisilin, amoksisilin, karbenisilin, methisilin, oksasilin, sefalosporin, basitrasin, vankomisin ve teikoplanin bulunmaktadır (Kapoor et al., 2017). Monobaktam ve β -laktam antibiyotikler penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) bağlanarak etkilerini göstermektedir. Glikopeptid antibiyotikler ise transpeptidaz üzerine etki ederek peptidoglikan tabakaları arasındaki bağların oluşumunu engellemektedir. Bu antibiyotikler bakteriyel hücre duvarı sentezindeki inhibisyon sonucunda bakterilerin ölümüne neden olurlar (Abushaheen et al., 2020).

2.2.2.2. Protein Sentezinin İnhibisyonu

Bakteriyel protein sentezi 30S ve 50S alt birimden oluşan 70S ribozomda gerçekleşmektedir. Ribozom, bakteri hücresindeki ana antibiyotik hedeflerinden biridir. Protein sentezi inhibisyonuna neden olan antibiyotikler 70S ribozomun alt birimlerinden birine ya da her ikisine birden etki ederek (Tablo 2.6) bakteriyel protein sentezinin başlama, uzama ve sonlanma aşamalarını engellemektedir (Abushaheen et al., 2020). 30S ribozomal alt birime etki eden antibiyotikler genellikle başlama sürecine, 50S ribozomal alt birime etki eden antibiyotikler ise çoğunlukla uzama süreçlerine etki etmektedir (Jaka and Liwa, 2015). Bakteri hücreleri ve ökaryot hücrelerin ribozomlarındaki yapısal farklılık antibiyotiklerin selektif toksisitesini sağlamaktadır (Yoneyama and Katsumata, 2006).

Bakteriyel protein sentezine etki eden antibiyotikler arasında blastisidin S, kloramfenikol, klindamisin, linkomisin, dalfopristin, doksisiklin, edein, eritromisin, evernimisin, avilamisin, fusidik asit, kasugamisin, kirromisin, linezolid, neomisin, puromisin, sparsomisin, spectinomisin, streptomisin, thermorubin, tiostrepton, tiamulin ve viomisin bulunmaktadır (Wilson, 2014).

Tablo 2.6. Protein sentezi inhibisyonuna neden olan antibiyotiklerin etki mekanizması (Wilson, 2014)

Antibiyotik	Hedef Alt Birim	İnhibisyon Mekanizması
Blastisidin S	50S	Peptidiltransferaz Aracılığıyla Peptid Bağı Oluşumunun Engellenmesi
Kloramfenikol	50S	Peptidiltransferaz Aracılığıyla Peptid Bağı Oluşumunun Engellenmesi
Klindamisin, Linkomisin	50S	Peptidiltransferaz Aracılığıyla Peptid Bağı Oluşumunun Engellenmesi
Dalfopristin	50S	Peptidiltransferaz Aracılığıyla Peptid Bağı Oluşumunun Engellenmesi
Doksisiklin	30S	tRNA'nın bağlanmasını engeller
Edein	30S	Başlama
Eritromisin	50S	Uzama
Evernimisin, Avilamisin	50S	Başlama
Fusidik Asit	Uzama Faktörü G (EF-G)	Uzama
Kasugamisin	30S	Başlama
Kirromisin	Uzama Faktörü Tu (EF-Tu)	Uzama
Linezolid	50S	Peptidiltransferaz Aracılığıyla Peptid Bağı Oluşumunun Engellenmesi
Neomisin	30S	Translokasyon
Puromisin	50S	Peptidiltransferaz Aracılığıyla Peptid Bağı Oluşumunun Engellenmesi
Sparsomisin	50S	Peptidiltransferaz Aracılığıyla Peptid Bağı Oluşumunun Engellenmesi
Spectinomisin	30S	Translokasyon
Streptomisin	30S	Translokasyon
Thermorubin	70S	Başlama
Tiostrepton	50S	Faktör Bağlayıcı
Tiamulin	50S	Peptidiltransferaz Aracılığıyla Peptid Bağı Oluşumunun Engellenmesi
Viomisin	70S	Translokasyon

2.2.2.3. Nükleik Asit Sentezinin İnhibisyonu

Antibiyotik etki mekanizmalarından biri de nükleik asit sentezinin inhibisyonudur. Bakteriyel DNA sentezi, çeşitli aşamalarda etki gösteren bir grup enzim tarafından gerçekleşmektedir. Nükleik asit sentezi inhibisyonuna neden olan antibiyotikler topoizomerez IV, DNA giraz ve RNA polimeraz gibi enzimlerin aktivitesini inhibe ederek antibakteriyel etkilerini göstermektedirler (Abushaheen et al., 2020). Nükleik asit sentezini inhibe eden antibiyotikler arasında florokinolonlar, nitrofuranlar, azollar (metronidazol) ve ansamisinler (rifamisin) bulunmaktadır (Hutchings et al., 2019).

2.2.2.4. Sitoplazmik Membran Fonksiyonunun İnhibisyonu

Bakteriyel dış membran yarı geçirgen bir bariyer olarak temel moleküllerin hücreye alınmasını ve toksik bileşenlerin hücreden uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Nikaido, 2003). Bakteriyel sitoplazmik membran fonksiyonunun inhibisyonuna

neden olan polimiksinlerin bakteriler üzerindeki etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, sitoplazmik membran üzerindeki anyon ve katyon dengesini bozarak, membran geçirgenliğini arttırdığı ve bu sayede bakterisidal etki gösterdiği düşünülmektedir (Moffatt et al., 2019).

2.2.2.5. Metabolik Yolların İnhibisyonu

Bakteriler, protozoonlar ve diğer mikrobiyal ajanlar hücre bölünmesi, nükleik asit sentezi gibi çeşitli işlevleri yerine getirmek için metabolik yolları kullanmaktadır. Bu metabolik yollardan biri de folik asit metabolizmasıdır. Folik asitler, enzimatik ko-faktörler olarak işlev gören, suda çözünebilen küçük moleküllerden oluşan B vitaminleri ailesine ait bir metabolittir (Zheng and Cantley, 2019). Folik asit metabolizması tüm canlı hücrelerin düzgün çalışması için gereklidir (Villa et al., 2018). Folat, proteinlerin ve nükleik asitlerin sentezinde birçok biyosentetik yolla ilgili çok sayıda reaksiyonda yer alır. Metiyonin, serin, glisin, histidin ve gulatamat gibi bazı aminoasitlerin senteziyle ilgili reaksiyonlarda görev alan folat, protein sentezi için gerekli olan RNA transferazın yapısına katılır. Ayrıca pürin ve pirimidin bazlarının sentezinde görev alarak gen ekspresyonunu düzenler (Fowler, 2001). Memeli hücreleri folik asiti sentezleyemezler, bu nedenle bu metabolitlerin dışardan alınması gerekmektedir. Memeli hücrelerinin aksine bakteri hücreleri folat reseptörlerinden yoksun olduğu için hücre duvarı ve membranı bu moleküllerin hücre içine alınmasına izin vermezler. Bu nedenle bakteriler folik asiti sentezlemek zorundadır (Villa et al., 2019). Folat biyosentezine katılan spesifik enzimlerin antifolatlar ile inhibe edilmesi, antibiyotiklerin etki mekanizmalarından birisidir. Folik asit sentezini inhibe eden antibiyotikler arasında sülfanomidler (mafenid), sülfonlar (dapson), salisilatlar (4-aminosalisilik asit), diaminopirimidinler (trimetoprim) bulunmaktadır (Hutchings et al., 2019). Bu antibiyotikler dihidropteroik asit sentaz, dihidrofolat redüktaz gibi folik asit sentez mekanizmasında görevli enzimleri inhibe ederek bakteriyostatik ya da bakterisid etki göstermektedir (Uddin et al., 2021).

2.2.3. Antibiyotik Direnci ve Direnç Mekanizmaları

Antibiyotikler, bakterilerle mücadelede eşsiz ilaçlar olarak bilinmektedir (Zaman et al., 2017). Bu ilaçların geliştirilerek klinik olarak kullanıma sunulması tıp tarihinde önemli bir gelişmedir (Watkins and Bonomo, 2016). Antibiyotikler onlarca yıldır sadece tıbbi kullanım için değil, aynı zamanda hayvancılık ve tarım da dahil olmak üzere çeşitli alanlarda koruyucu olarak kullanılmaktadır (Gajdács and

Albericio, 2019). Bakteriler, antibiyotiklerin öldürücü etkisini azaltmak ya da engellemek için genetik mutasyonlar geliştirerek direnç kazanırlar (Subramaniam and Girish, 2020). Antibiyotik direnci, bakterilerin daha önce duyarlı oldukları bir antibiyotiğin etkisine dayanma, bakterilerin hayatta kalması ve gelişmesine izin verme kapasitesi olarak tanımlanmaktadır (Zaman et al., 2017). Antibiyotiklere direnç ilk olarak stafilokok, streptokok ve gonokoklarda gözlenmiştir. İlk ticari antibiyotik olan penisilinin 1941’de piyasaya sürülmesinden 1 yıl sonra penisiline dirençli *S. aureus* suşları ortaya çıkmıştır (Dodds, 2017). Penisiline dirençli *S. aureus* ile mücadele edebilmek için 1960 yılında kullanımına başlanan yarı sentetik bir antibiyotik olan metisiline karşı aynı yıl metisilin direnci gelişmiştir (Durand et al., 2019). Antibiyotiğe dirençli bakterilerin dünya çapında gün geçtikçe artması, insan ve hayvan sağlığı için çok ciddi tehlike arz etmektedir (Fashae et al., 2021). Antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin bakteriler tarafından kısa sürede gerçekleşmesi, patojenik bakterilerin % 70’inin en az bir antibiyotiğe dirençli olması, yeni antibiyotiklere karşı direnç gelişim riski ve bu ilaçların maliyeti nedeniyle bakterilerle mücadele günümüzde oldukça zorlaşmıştır (Economou and Gousia, 2015). Artan antibiyotik direnci nedeniyle Dünya’da her yıl yaklaşık 700.000 kişi hayatını kaybetmektedir (Woolhouse et al., 2016).

Bakterilerin antibiyotiklere karşı direnci, doğal (intrinsik) direnç ve kazanılmış direnç olarak gruplandırılmaktadır. Bir türün tüm suşlarının bazı antibiyotik sınıflarından etkilenmemesi doğal direnç olarak adlandırılırken (Çiftci ve Aksoy, 2015), bakterinin translasyon, konjugasyon, transpozisyon veya mutasyonlar sonucu genetik materyal edinerek geliştirdiği dirence ise kazanılmış direnç denilmektedir (Culyba et al., 2015; Lerminiaux and Cameron, 2019). Doğal direnç bakterinin türüne has bir özellikken, kazanılmış direnç suşa özgüdür (Duijkeren et al., 2018). Bakteriye hücre duvarını etkileyen penisilin gibi antibiyotiklerin, hücre duvarı olmayan bakterilere etki etmemesi doğal dirence örnek olarak verilebilir. Antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu, hedef bölgelerin değişmesi, aktif pompa sistemleri ve permeabilitenin azalması gibi mekanizmalar yoluyla gelişen direnç ise kazanılmış dirence örnektir (Çiftci ve Aksoy, 2015; Reygaert, 2018).

2.2.3.1. Antibiyotiğin Enzimatik İnaktivasyonu Nedeniyle Gelişen Direnç

Antibiyotiklerin enzimatik inaktivasyonu hidrolitik enzimler, hidroliz ve grup transferi yoluyla gerçekleşmektedir (Blair et al., 2015). Bakteriler, antibiyotiklere karşı

enzimler üreterek antibiyotiğin bakteri hücresindeki hedefine bağlanmasını engeller ve bu sayede antibiyotiği inaktive ederler (Uddin et al., 2021). Bu direnç mekanizmasında en sık görülen biyokimyasal reaksiyonlar asetilasyon, fosforilasyon ve adenilasyondur (Munita and Arias, 2016). β -laktam antibiyotiklerin sahip olduğu β -laktam halkasının amid bağının β -laktamazlar nedeniyle inaktive edilmesi ve aminoglikozidlerin ribozoma bağlanma aktivitesinin aminoglikozid modifiye edici enzimler (AME) nedeniyle engellenmesi, antibiyotiklerin enzimatik inaktivasyonu sonucu oluşan direnç mekanizmasına örnek olarak verilebilmektedir (Romanowska et al., 2013; Bush, 2013).

2.2.3.2. Antibiyotik Hedef Bölgelerinin Değişikliği Nedeniyle Gelişen Direnç

Bakterilerde antibiyotik hedef bölgesinin modifikasyonu sonucu antibiyotiğin hedefine uygun şekilde bağlanamaması, bağlanma bölgesine ulaşamaması ya da afinitenin azalması nedeniyle antibiyotiklere karşı direnç görülebilmektedir (Lambert, 2005). Penisilin bağlayıcı proteinlerin penisilin bağlayan halkalarında görülen mutasyonlar sonucu affinitenin azalması, enterokoklarda hücre duvarındaki hedef molekülün değişimi sonucu vankomisine, ribozomların S12 proteinlerinde gelişen modifikasyon sonucu streptomisine, DNA-giraz enzimlerinde gerçekleşen mutasyonal değişiklik sonucu florokinolonlara, 16S rRNA'da oluşan mutasyonlar sonucu aminoglikozidlere karşı direnç oluşabilmektedir (Neu, 1992; Vlahovicek et al., 2008; Ciftci ve Aksoy, 2015; Blair et al., 2015).

2.2.3.3. Aktif Pompa Sistemi Nedeniyle Gelişen Direnç

Antibiyotiklerin hücre dışına atılmasını sağlayan membran proteinlerine aktif pompa sistemi (effluks pompası) adı verilmektedir. Birçok antibiyotik, Gram negatif bakterilerin intrinsik direncine önemli katkıda bulunan bakteriyel aktif pompa sistemleri tarafından aktif olarak hücre dışına taşınmaktadır. Bakterilerde çeşitli formlarda bulunabilen bu mekanizma ilk olarak 20 yıl önce tetrasiklin grubu antibiyotiklerde raporlanmıştır (Çiftci ve Aksoy, 2015; Reygaert, 2018). Bakterilerin çeşitli bileşiklerin zararlı etkilerinden korunabilmesi için geliştirdiği çeşitli mekanizmalar arasında en önemlisi aktif pompa sistemleridir. Aktif pompa sistemleri antibiyotiklerin spesifite ve mekanizmalarını değiştirerek birçok antibiyotiğin dışa atımını gerçekleştirmektedir (Webber and Piddock, 2003). Bu sistem bakterilerde yüksek derecede çoklu antibiyotik direncine neden olmaktadır. Aktif pompa sistemi tek ya da çoklu antibiyotiklere özgü olabilmektedir. İlaça özgü mekanizmalar

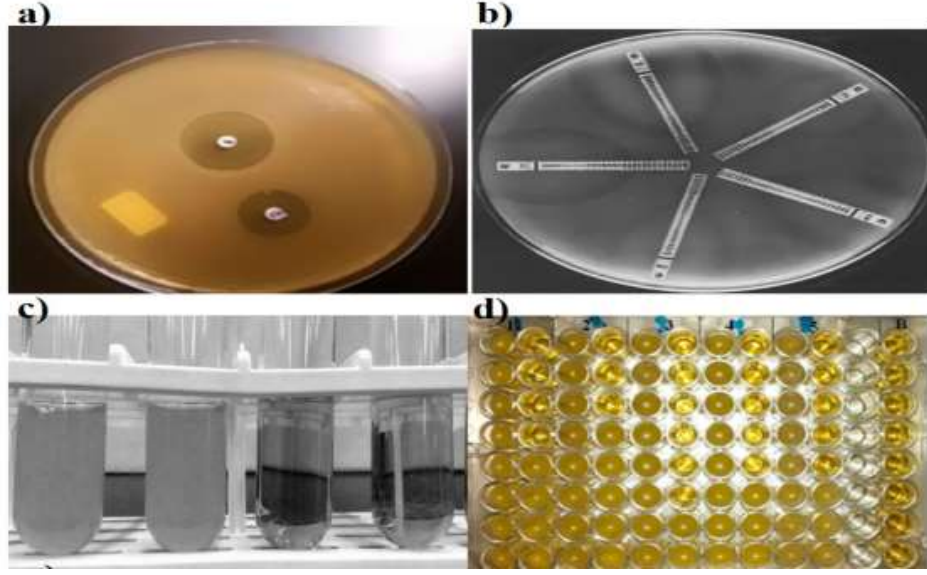
transpozon, integron ve plazmid gibi genetik elemanlar tarafından kodlanırken, çoklu mekanizmalar genellikle kromozom tarafından kodlanmaktadır (Butaye et al., 2003).

2.2.3.4. Permeabilitenin Azalması Nedeniyle Gelişen Direnç

Antibiyotiklerin bakterilere karşı etkilerini gösterebilmesi için ilk olarak sitoplazmik membrandan geçerek hedef bölgelere ulaşmaları gerekmektedir (Munita and Arias, 2016). Bakterilerde permeabilitenin azalmasıyla antibiyotiklerin hücre içine girmesi engellenir ve bunun sonucunda hedef bölgelere ulaşamazlar. Bu direnç mekanizması birçok antibiyotiğe karşı yarı geçirgen bir bariyer oluşturması nedeniyle Gram negatif bakterilerde yaygın olarak görülmektedir (Blair et al., 2015; Nikaido, 2000). Porin proteinleri besin maddelerinin hücre içine alınması, artık maddelerin hücre dışına atılmasını sağlayan kanal şeklindeki yapılardır. Antibiyotikler; molekülün şekli, büyüklüğü ve yükü gibi özelliklere bağlı olarak porinlerden geçmektedir (Nikaido, 2003). Porin ekspresyonunun azaltılması, porinlerin daha küçük kanal oluşturan porinlerle değiştirilmesi, porin genlerinin mutasyonu gibi olaylar sonucu permeabilitenin azalması nedeniyle direnç gelişebilmektedir (Munita and Arias, 2016; Peterson and Kaur, 2018).

2.2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testleri, bakteriyel izolatların antibiyotik direnç profillerini belirlemek, tedavide doğru antibiyotiğe karar vermek ve terapötik sonuçları tahmin etmek için yaygın olarak yapılan mikrobiyolojik bir tekniktir (Daniels, 2011). Antibiyotik duyarlılık testleri genotipik ve fenotipik yöntemlerle belirlenebilmektedir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak uygulanan çeşitli fenotipik antibiyotik duyarlılık testleri bulunmaktadır (Şekil 2.9). Bu fenotipik testler arasında disk difüzyon, agar dilüsyon, broth (sıvı) dilüsyon, mikrodilüsyon testleri ve epsilometri testi (E test) gibi yöntemler bulunmaktadır (Khan et al., 2019). Çeşitli antimikrobiyal duyarlılık testlerinin (AST) minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) çeşitli uluslararası kuruluşlar tarafından kategorilere ayrılmıştır. Bu MIC değerleri, bakterinin bir antibiyotiğe duyarlı olup olmadığını göstermektedir. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi'nin (EUCAST) hazırlamış oldukları kılavuzlar bir bakterinin antibiyotiğe karşı duyarlılığının belirlenmesinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Kassim et al., 2016).



Şekil 2.9. Fenotipik antibiyotik duyarlılık testleri (Khan et al., 2019)

İlk olarak 1966'da Bauer ve Kirby adlı araştırmacılar tarafından uygulanan disk difüzyon metodu (Kirby-Bauer metodu), bakterilerin antibiyotik duyarlılığını doğrulamak için altın standarttır (Bauer et al., 1966). Bu yöntem, maliyet ve kolaylık gibi nedenlerle antibiyotik duyarlılığının belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemdir (Jorgensen and Ferraro, 2009). Agar disk difüzyon yönteminde turbidite testi ile McFarland 0.5 standardı ile eşit olacak şekilde standardize edilen mikroorganizmanın inokülümleri, agar yüzeyinin her tarafına eşit olarak dağılacak şekilde yayılır (Aydemir et al., 2016). Bu işlemi takiben ticari olarak satılan, antibiyotik içeren disk, agar yüzeyine yerleştirilerek inkübe edilir (Watts et al., 2018). İnkubasyon sırasında inoküle edilen saf mikroorganizma agar yüzeyinde ürerken aynı zamanda antibiyotik disklerinden agar yüzeyine antibiyotik madde yayılır ve antibiyotik diskinin etrafında net bir inhibisyon zonu oluşur (Behera et al., 2019). Oluşan inhibisyon zonunun çapı ölçülür ve ölçülen değer CLSI ve EUCAST gibi uluslararası kuruluşların belirlediği değerlerle karşılaştırılıp yorumlanarak dirençli, duyarlı ya da orta derecede duyarlı olduğuna karar verilir (Kassim et al., 2016). Bu metot, test edilen antibiyotiğin minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesinde uygun olmamakla beraber yavaş üreyen bakterilerin antibiyotik duyarlılığını tespit etmek için de elverişli değildir (Khan et al., 2019; Behera et al., 2019). Agar dilüsyon, broth (sıvı) dilüsyon ve E test yöntemleri minimum inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan diğer fenotipik testlerdendir (Benkova et al., 2020).

Antibiyotik direnç durumunun belirlenmesinde PCR tabanlı genotipik yöntemler

de geliştirilmiştir. Bu yöntem bakteriye ait spesifik direnç genlerini ve genetik mutasyonları tanımlamak için oldukça sık kullanılmaktadır (Benkova et al., 2020). Genotipik yöntemler fenotipik yöntemlere göre daha hızlı sonuç vermektedir.

2.3. Aşı

Aşı tarihi Jenner'ın 1789 yılında sığır çiçek virusunu kullanarak, insanların çiçek hastalığına karşı bağışıklık kazanmasıyla başlamıştır (Riedel, 2005). Doktor Edward Jenner, süt sağımı sırasında sığır çiçeği virusu (cowpox virus) bulaşmış insanların, insan çiçek hastalığına (smallpox virus) karşı bağışık olduğunu fark etmiştir. Bahçıvanının oğluna, inek çiçeği virüsü bulaşmış bir hastanın püstülünden elde ettiği sıvıyı enjekte ederek, çiçek hastalığı virusu verdiği çocuğun hayatta kaldığını gözlemlemiştir (Jenson et al., 2016). Bundan yaklaşık 200 yıl sonra Dünya Sağlık Örgütü (WHO), çiçek hastalığına karşı aşılama programı ile hastalığı ortadan kaldırmayı başarmıştır (WHO, 2010). Bu başarı çeşitli hastalıklara karşı çok sayıda aşı geliştirme çalışmasına temel teşkil etmiştir.

Aşılamada temel amaç, aşıda kullanılan etkenin tanınması ve etkene karşı bağışıklık oluşturmaktır. Kovansiyonel aşılama türleri canlı ve ölü (inaktif) aşı olmak üzere iki ana başlık altında sınıflandırılmaktadır. Zayıflatılmış aşılar, yabancı virusun ya da bakterinin laboratuvar koşullarında, hastalık yapıcı etkilerinin zayıflatılması yoluyla üretilmektedir. Ölü aşılar, bir mikroorganizmanın tümünü öldürülmüş halde içeren tüm hücre aşısı veya mikroorganizmanın yalnızca belli kısımlarını içeren alt ünite aşıları şeklinde tanımlanmaktadır. Alt ünite aşılar ise subunit ve toksoid aşı olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Mikroorganizmanın seçilmiş immünojenik kısımlarını kullanarak elde edilen aşılara subunit aşı, toksin üreten mikroorganizmaların toksijenik özelliklerinin yok edilmesiyle elde edilen aşılara ise toksoid aşı denilmektedir (Vetter et al., 2018). Ayrıca son yıllarda biyoteknoloji alanındaki son gelişmeler ile birlikte yeni aşılar ortaya çıkmaya başlamıştır. Bunlar arasında rekombinant DNA aşısı ve sentetik RNA aşıları sayılabilir (Hasson et al., 2015; Kayser and Ramzan, 2021).

Veteriner Hekimlikte kullanılan aşılarda temel amacı, evcil hayvanların sağlığını ve refahını iyileştirmek, maliyeti düşürerek canlı hayvan üretimini etkin bir şekilde arttırmak ve zoonoz hastalıkların hem evcil hayvanlardan hem de yabani hayvanlardan insana geçişini önlemektir (Roth, 2011). Veteriner aşılarda kuvvetli ve uzun süreli bağışıklık sağlayabilen, güvenilir, biyolojik kararlılığa sahip, en az yan etkili, ucuz ve

kolay uygulanabilir özellikte olmaları tercih edilmektedir. Sürü yetiştiriciliğinde aşılanmanın temel amacı bireysel bağışıklıktan çok popülasyondaki bağışıklığı artırmaktır. Bu nedenle aşı etkinlikleri sürü bağışıklığı ile ölçülmektedir. Sürülerdeki bağışıklık oranının yüksekliği enfeksiyonun yayılma hızını azaltmaktadır (Pallvarnanathasamy et al., 2010).

Bir patojene ait çok sayıda antijen bulunmasına karşın bunların ancak bir kısmı koruyucu immün yanıt oluşturma özelliğine sahiptir. Aşı antijenlerinin seçiminde ilk ve en kritik basamak, enfeksiyon etkenlerinin yapısal ve biyolojik açıdan korunmuş özelliklere sahip antijenlerinin belirlenmesidir. Koruyucu antijen özelliklerinin belirlenmesinde, poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE), western blot, aminoasit ve gen dizi analizleri ile *in vivo* deneysel immünolojik çalışmalar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür immünolojik tekniklerle belirlenen potansiyel aşı antijenlerinin mümkün olan en yüksek saflıkta elde edilmeleri kritik bir aşamadır. Bu doğrultuda, doğal veya rekombinant antijenlerin saflaştırılmaları amacıyla farklı ekstraksiyon işlemleri (ısı, kimyasal, sonikasyon ve mekanik gibi) takiben jel filtrasyon, iyon değişim, affinite, immunoaffinite gibi kromatografik ayırıştırma teknikleri kullanılmaktadır. Söz konusu tekniklerle saflaştırılan antijenik moleküllerin saflık kontrolleri 1 ve 2 boyutlu elektroforez (1-2D PAGE) ve Western blot (İmmunoblot) gibi tekniklerle yapılmaktadır (Osman et al., 2013).

2.3.1. Sığır *E. coli* Aşıları

2.3.1.1. Enterohemorajik/Shiga toksijenik *E. coli* Aşı Çalışmaları

İnsan ve hayvan sağlığını önemli derecede etkileyen ve geçmişten günümüze aşı çalışması yapılan çeşitli *E. coli* patotipleri bulunmaktadır. Bunlar arasında EHEC O157:H7, ETEC ve mastitise neden olan ekstraintestinal *E. coli* patotipleri bulunmaktadır. EHEC O157:H7, insanlarda hemolitik üremi sendromu ve hemorajik kolite neden olduğu için oldukça önemli bir hastalık etkenidir. Bugüne kadar, EHEC O157:H7 enfeksiyonlarına karşı insan kullanımı için hiçbir aşı onaylanmamıştır. Aşı araştırma ve geliştirme çalışmaları, insan sağlığı için risk teşkil eden ve taşıyıcı olan sığırlara yöneliktir. İnsanlardaki pek çok EHEC O157:H7 enfeksiyonuna, ruminant dışkılarıyla direkt/indirekt olarak kontamine olmuş gıda ya da sular neden olmaktadır. Bu nedenle insanları EHEC O157:H7 enfeksiyonundan korumanın temeli, etkenin ruminant sindirim sistemine kolonizasyonunun önlenmesi ve kontrolü ile mümkündür. Bu amaçla sığırların aşılanması önemlidir. Bugüne kadar EHEC O157:H7'nin çevresel

yayılımını azaltmak için farklı aşı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu aşılar farklı antijenik kapasiteleri, adjuvantlar, aşılama yolu, doz ve diğer faktörlere göre değerlendirilmiştir. Hayvanlarda koruyucu düzeyde bir bağışıklık oluşturmada temel faktör, doğru immunojen kullanımından geçmektedir. O157:H7 aşı çalışmalarında kullanılan immunojenler arasında tip III salgı sistemi (T3SS) bileşenleri, siderefor reseptörleri, porin proteinleri, hücre duvarı, flagellin, Shiga toksin toksoidi, bakterinler, atenüe *Salmonella* gibi antijenik yapılar bulunmaktadır (Li et al., 2000; Potter et al., 2004; van Donkersgoed et al., 2005; Smith et al., 2009b, Thornton et al., 2009; McNeilly et al., 2010a; Vilte et al., 2011; Sharma et al., 2011, Schmidt et al., 2018).

T3SS'e ait proteinler O157:H7 aşı çalışması için kullanılan ilk immunojenlerdir. EHEC O157:H7 enfeksiyonlarının patogeneğinde intimin ve Tir'in önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Kenny et al., 1997). Tir, intimin veya her ikisinin bulunmaması, konakçı hücreye bakteriyel adhezyonda anlamlı bir azalma ile sonuçlanmaktadır (DeVinney et al., 1999).

EHEC O157:H7'nin daha önce Esp, Tir içerdiği belirlenip saflaştırılan K12 suşunun (Li et al., 2000) protein süpernatantından oluşan bir aşı, yağ-su emülsiyon adjuvantı (VSA3) kullanılarak, kontrol ve aşı grubu oluşturulmuş hayvanlarda test edilmiştir. Bütün hayvanlar çalışmadan önce serolojik yönden test edilerek, O157:H7 taşıyıcılığı olduğu düşünülen hayvanlar çalışma dışı bırakılmıştır. İki gruba ayrılan sığırlara, 0., 21. ve 35. günlerde toplamda 3 doz olmak üzere, 23 sığırdan oluşan birinci gruba 50 µg süpernatant, 25 sığırdan oluşan 2. gruba kontrol grubu olarak yalnızca adjuvant verilmiştir. Son aşılamaı takiben 2 hafta sonra hayvanlar oral yolla 10^8 cfu/ml *E. coli* O157:H7 ile epruve edilmiştir. Aşılama sonrası oluşan immun yanıt, her aşılama sırasında ve aşılamaıdan 10 gün sonra alınan serum örneklerinin ELISA ve western blot analiziyle test edilmiştir. Aşı ve kontrol grupları arasında antikor titreleri istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0,05$) bulunmuştur. Çalışma sonucunda T3SS proteinleri ve O157 lipopolisakkaritine karşı yüksek derece antikor saptanmıştır. Aşı grubunda ilk aşılamanın ardından T3SS proteinlerine spesifik antikor titresinde 13 kat, ikinci aşılamanın ardından ise 45 kat artış görölmüştür. Ayrıca aşı grubundaki hayvanların dışkılarında bakteri sayısında anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Klinik çalışma aşılaman sığırlarda EHEC O157:H7'nin prevalansının azaldığını göstermiştir (Potter et al., 2004).

Başka bir çalışmada, Potter vd. (2004)'nin kullandığına benzer bir aşıyla 9 farklı bölgede barınan toplam 54500 hayvan 14 ay süreyle bir aşı denemesinde test edilmiştir. Aşılamalar deney grubuna aşı, kontrol grubuna ise sadece adjuvant verilerek, 73-103 gün arayla 2 doz deri altı yolla uygulanmıştır. Çalışma sonucunda aşı grubuyla kontrol grubu arasındaki antikor titresinde anlamlı bir fark bulunamamıştır (Van Donkersgoed et al., 2005). Çalışma sonucunda aşı grubuyla kontrol grubu arasındaki antikor titresinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Araştırmada Potter vd. (2004)'nden farklı olarak, inaktivasyonda formalin, adjuvant olarak ise yağ-su emülsiyonu (Emulsigen) kullanılmıştır. İki çalışma arasındaki farklılık ise formalin kullanılması, adjuvant farklılığı ve doz aralığının daha uzun olmasıyla açıklanmıştır.

Smith vd. (2009a), van Donkersgoed vd. (2005)'nin kullandığı aşı hazırlama tekniğinden farklı olarak formalin kullanmadan, VSA3 adjuvantı ile bir aşı hazırlamıştır. Aşı denemesinde 20556 sığır, 21 gruba ayrılmış, 11 gruba 2 doz aşı, 10 gruba ise kontrol olarak 2 doz adjuvant verilmiştir. Aşı grubundan 382, kontrol grubundan ise 318 hayvandan alınan terminal rektal mukoza örneklerinden kültür yapılmış, kültür sonucu aşılansız gruptan 11, kontrol grubundan ise 57 sığır EHEC O157:H7 yönünden pozitif bulunmuştur. Bu sonuca göre EHEC O157:H7 kolonizasyon oranının, aşılansız sığırlarda kontrol grubuna kıyasla % 92 daha düşük olduğu belirlenmiştir. Etkenin terminal rektumda kolonizasyonu ve çevresel kontaminasyonu azaldığı için, aşının etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Aynı araştırmacıların yaptığı benzer bir çalışmada (Smith et al., 2009b) 504 sığır, 3 gruba ayrılmış, birinci gruba aşı, ikinci gruba yalnızca adjuvant, üçüncü grubun ise yarısına aşı yarısına adjuvant uygulanmıştır. Aşılamalar, önceki çalışmada (Smith et al., 2009a) kullanılan aynı aşı ile 2 doz deri altı olarak yapılmıştır. Aşılamadan sonraki 42, 63 ve 84. günlerde etkenin dışkı ile atılmasına, 85. günde ise terminal rektal mukozadaki kolonizasyonuna bakılmıştır. Değerlendirme sonucu etkenin dışkıyla atılımının, kontrol grubuna göre aşılansız grupta % 63, yarısı aşılansız grupta ise % 52 daha az olduğu ve aşılansız her iki grupta da kolonizasyonun azaldığı gözlenmiştir.

Farklı T3SS bileşenlerinin çeşitli kombinasyonlarda kullanılarak yapılan aşı çalışmaları bulunmaktadır. Van Diemen vd. (2007) intimin γ ve β 'nin C280 amino asidini (Int₂₈₀) tek veya EHEC yapışma faktörü (Efa-1) ile beraber, EHEC O157:H7 ve O26:H- serotiplerine karşı koruyuculuğunu araştırmışlardır. 100 mg protein/dozda

İnt₂₈₀ ve Efa-1 alt ünite aşı, formaldehit ile inaktive edilmiş O157:H7 bakterin tüm hücre aşısı olarak hazırlanan aşı, yağlı bir adjuvantla (Alu-Oil) kullanılmıştır. 12-14 günlük buzağılar toplamda 3 aşı denemesi yapılacak şekilde rastgele gruplara ayrılmıştır. Birinci denemede 0 ve 28. günlerde 4 buzağı İnt₂₈₀- γ , 4 buzağı ise Efa-1 ile, ikinci denemede 4 buzağı İnt₂₈₀- β , 4 buzağı ise Efa-1 ile kas içi yolla aşılanmış, iki gruptaki 4'er buzağıya kontrol grubu olarak sadece adjuvant verilmiştir. Birinci gruba 42. gün oral yolla $2,9 \times 10^{10}$ cfu O157:H7, ikinci gruba ise $2,9 \times 10^{10}$ cfu O26:H- verilerek epruvasyon yapılmıştır. Üçüncü denemede 4 buzağı Efa-1-İnt₂₈₀- γ karışımı, 4 buzağı ise EHEC O157:H7 bakterini ile 0 ve 28. günlerde kas içi, 28 ve 42. günlerde de burun içi yolla aşılanmış, 4 buzağı ise kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Sığırlar 56. günde oral yolla $1,9 \times 10^{10}$ cfu O157:H7 ile epruvasyon yapılmıştır. Birinci denemede aşılananlarda O157:H7'ye, ikinci denemede ise O26:H-'ye karşı IgG'de anlamlı bir artış olduğu, ancak aşı ve kontrol grubu arasında kolonizasyon oranının değişmediği görülmüştür. Üçüncü denemede hem bakterin hem de Efa-1-İnt₂₈₀- γ karışımıyla yapılan kas içi aşılanmanın IgG titresini arttırdığı, ancak burun içi aşılanmanın IgG seviyelerini etkilemediği belirlenmiştir. Tüm denemelerde kullanılan aşılardan kolonizasyonu engelleyemediği rapor edilmiştir.

Bakteri ve konak hücre arasında fiziksel bir köprü oluşturan ve kolonizasyonda önemli rol oynayan EspA kullanılarak yapılan bir aşı çalışmasında (Dziva et al., 2007), 14 günlük 4 buzağı; 0, 28 ve 49. günlerde, yağ-su emülsiyonunda hazırlanan 100 μ g protein/dozda rekombinant EspA (rEspA) aşısı ile kas içi yolla, 49. günde 300 μ g/doz rEspA aşısı ile burun içi yolla aşılanmıştır. Kontrol grubuna ise kas içi ve burun içi yolla yalnızca adjuvant verilmiştir. Aşı uygulandıktan 2 hafta sonra hayvanlara 10^{10} kob *E. coli* O157:H7 ile epruvasyon yapılmıştır. Buzağların rEspA ile kas içi ve burun içi yollarla aşılanmasının antijene spesifik IgG ve sIgA titrelerinde yükselmeye neden olduğu, ancak etkenin bağırsakta kolonize olmasını engelleyemediği görülmüştür.

McNeilly vd. (2010a), intimin C-terminal 531 amino asitleri, H7 flagellini, EspA ve Tir proteinlerini kullanarak 4 gruba ayırdıkları sığırlar üzerinde aşı çalışması yapmıştır. Toplam 7 sığırdan oluşan birinci grup kas içi yolla üç doz 60 μ g H7, EspA, intimin ve Tir ile, 8 sığırdan oluşan ikinci grup kas içi yolla üç doz 60 μ g EspA, intimin ve Tir ile, 8 sığırdan oluşan üçüncü grup ise iki doz kas içi, bir doz rektal submukozal yolla 60 μ g H7 flagellin, EspA, intimin ve Tir ile aşılanmıştır. 7 sığırdan oluşan dördüncü grup kontrol grubu olarak belirlenip yalnızca adjuvant verilmiştir. Aşı

hazırlanırken adjuvant olarak saponin (Quil-A) kullanılmıştır. Aşılama sonrasında serum anti-EspA, anti-intimin, anti-Tir IgG seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. H7 flagellin içeren aşı ile aşılanan sığırlarda anti H7 IgA ve IgG antikorları saptanmıştır. 10^{10} kob EHEC O157:H7 ile sığırlarda oluşturulan epruvasyondan sonra, kontrol grubundaki bütün hayvanlarda, aşı gruplarında ise sırasıyla % 29 (2/7), % 50 (4/8) ve % 37.5 (3/8) oranında O157:H7 kolonizasyonu gözlenmiştir. Sonuç olarak sığırları bu üç saflaştırılmış antijen ile aşılamının toplam bakteri atılım seviyelerini önemli ölçüde azaltabileceği, H7 flagellin katılmasının bu etkiyi daha da arttırdığı, kas içi ile rektal submukozal yolla aşılama arasında ise anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

McNeilly vd. (2015), önceki çalışmalarında (McNeilly et al., 2010a) kullandıkları saflaştırılmış proteinleri kullanarak öncekinden farklı bir aşı çalışması yapmıştır. Çalışmada H7 flagellin ve Tir'in aşı için önemini belirlemek amaçlanmıştır. Sığırları dört gruba ayırarak, 7 sığırdan oluşan birinci grubu 60 µg EspA, intimin ve Tir, 7 sığırdan oluşan ikinci grubu 60 µg EspA ve intimin, 8 sığırdan oluşan üçüncü grubu 60 µg EspA, intimin ve H7 flagellin ile kas içi yolla aşılamışlardır. Dördüncü gruba ise yalnızca adjuvant vermişlerdir. 10^{10} kob EHEC O157:H7 ile sığırlarda epruvasyon yapılmıştır. Çalışma sonucunda birinci ve üçüncü grup arasındaki antikor seviyelerinde çok fark olmadığı, yalnızca EspA ve intimin ile aşılanan grupta ise aşı etkinliğinin azaldığı görülmüştür. Çalışmada H7 flagellin ve Tir'in aşıya dahil edilmesinin faydası açıkça gösterilmiştir.

İntimin c280 aminoasiti ve EspB proteini kullanılarak gerçekleştirilen bir araştırmada (Vilte et al., 2011), 6-8 aylık 8 buzağı 2 gruba ayrılarak kullanılmıştır. Aşıda kullanılan proteinler 1 ml PBS'de seyreltilmiş ve 1 ml mineral yağ bazlı adjuvant kullanılarak uygulanmaya hazır hale getirilmiştir. Birinci grup, EspB (100 µg) ve intimin (100 µg) ile kas içi yolla 21 gün arayla aşılanmıştır. Kontrol grubuna ise yalnızca PBS ve adjuvant verilmiştir. Çalışma sonucunda EHEC O157:H7 ile yapılan epruvasyonun ardından aşılanmış buzağılarda serum IgG antikorlarının anlamlı derecede artış gösterdiği, bakterinin dışkıyla atılmasında önemli bir azalma olduğu gözlenmiştir.

Thornton vd. (2009), siderefor reseptörü ve porin proteinleri kullanılarak hazırlanan aşının etkinliğini değerlendiren bir aşı çalışması yapmıştır. 3-4 aylık 30 buzağı iki gruba ayrılarak, birinci grup yağ-su emülsiyonu adjuvantında hazırlanmış

siderefor ve porin proteini (SRP) ile deri altı yolla 21 gün arayla aşılanmış, ikinci gruba ise yalnızca adjuvant uygulanmıştır. Çalışmanın 36. gününde hayvanlara 10^9 kob O157:H7 ile epruvasyon yapılmıştır. Serum anti-SRP antikor titrelerini değerlendirmek için haftada bir kan alınmıştır. EHEC O157:H7'nin dışkıdaki yoğunluğunu belirlemek için ilk 5 gün boyunca her gün, geri kalan 3 hafta ise haftada 3 kere dışkı ve rektal svap örnekleri toplanmıştır. 35. günde nekropsi yapılarak EHEC O157:H7'nin varlığını ve yoğunluğunu belirlemek için bağırsak içerikleri ve doku örnekleri toplanmıştır. Kontrol grubunda 15 hayvandan 11'i (% 73.3), aşılanmış grupta ise 15 hayvandan yalnızca 5'i (% 33,3) O157:H7 kültür pozitif çıkmıştır. Araştırmacılar çalışma sonucunda SRP ile aşılanmanın serum anti-SRP antikor titrelerinde anlamlı bir yanıt oluşturduğunu ve EHEC O157:H7 prevalansını ve dışkıdaki yoğunluğunu azalttığını tespit etmişlerdir.

Thomson vd. (2009), sığırlarda EHEC O157:H7'ye karşı SRP kullanılarak hazırlanan aşının etkinliğini ölçmek için 2 deneme grubundan oluşan bir çalışma yapmıştır. Birinci aşılamada 1250 sığır deneme ve kontrol grubu olarak ikiye bölerek, deneme grubuna SRP aşısı, kontrol grubuna ise yalnızca adjuvant deri altı yolla 21 gün arayla iki doz, ikinci aşılamada ise 1284 sığır iki gruba ayrılarak deneme grubuna SRP aşısı, kontrol grubuna ise adjuvant 21 gün arayla üç doz deri altı yolla uygulanmıştır. Çalışmadaki tüm hayvanlara 10^9 kob O157:H7 ile epruvasyon yapılmıştır. Birinci aşılamada 21, 35, 70 ve 85. günlerde, ikinci aşılamada 42 ve 98. günlerde dışkı örnekleri toplanmıştır. Birinci aşılamada dışkıdaki EHEC O157:H7 prevalansının deneme grubunda daha düşük olduğu, ikinci aşılamada, SRP ile aşılama sonucunda etkenin dışkıyla atılmasının 98. günde % 85.2 azaldığı görülmüştür. SRP ile aşılama, dışkı örneklerinde EHEC O157:H7 yoğunluğunda % 98.2 azalmaya neden olmuştur ve sığırlar SRP ile aşılamadan olumsuz etkilenmemiştir. Aşılanmanın EHEC O157:H7'nin dışkıdaki yoğunluğunu ve dışkıyla atılmasını azaltmak için koruyucu olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Sharma vd. (2011), ısıyla inaktive edilmiş ve LEE kodlu proteinlerin salgılanması için gerekli genleri çıkartılmış mutant bakterin aşısı ile yaptıkları çalışmada, 8-19 haftalık erkek buzağılar aşı ve kontrol grubu olarak ikiye ayrılmış, aşı grubuna mutant bakterin, kontrol grubuna ise PBS, kas içi yolla uygulanmıştır. Buzağılara 10^9 cfu O157:H7 ile epruvasyon yapılmıştır. Çalışma sonucunda mutant bakterin ile aşılanmanın LEE ile kodlanmış proteinlere karşı IgG seviyesinde önemli

bir artış oluşturduğu, EHEC O157:H7'nin dışkıyla atılmasında ise belirgin bir azalma sağladığı görülmüştür.

Bakterinlere alternatif olarak, dış morfolojik yapısı korunan ancak sitoplazma içeriği bulunmayan bakteriyel hayaletler (Bacterial Ghosts, BG) kullanılarak yapılan bir aşı çalışmasında (Vilte et al., 2012), deney grubunu oluşturan beş buzağı deri altı yolla 5 ml PBS içerisinde 10 mg EHEC O157:H7 BG bulunan aşıyla, 21 gün ara ile aşılanmış, kontrol grubuna ise yalnızca PBS verilmiştir. Aşılamadan 14 gün sonra tüm hayvanlara 10^9 kob O157:H7 ile epruvasyon yapılmıştır. Çalışma sonucunda BG ile aşılananın serum IgG seviyesini anlamlı derecede arttırdığı, etkenin dışkıyla atılma süresini ve miktarını önemli derecede azalttığı gözlenmiştir.

McNeilly vd. (2008), H7 flagellin aşısının EHEC O157:H7 kolonizasyonu ve etkenin dışkıyla atılımına etkisini gözlemlemek için 4 gruba ayırdıkları 32 buzağıda bir aşı çalışması yapmıştır. Birinci grup 2 ml PBS eklenmiş, saponin adjuvantıyla hazırlanmış (Quil-A) 60 µg H7 flagellin ile kas içi yolla, ikinci grup 1 ml PBS eklenmiş, 60 µg H7 flagellin ile rektal yolla, üçüncü grup H7 eklenmiş poly (DL-lactide-co-glycolide) mikropartikülleri (PLG:H7) ile rektal yolla aşılanmıştır. Dördüncü gruba ise kontrol grubu olarak yalnızca PBS verilmiştir. Aşılama tarihinden 10 gün sonra hayvanlara 10^{10} kob *E. coli* O157:H7 ile epruvasyon yapılmıştır. H7 ile kas içi ve rektal yolla aşılama, yüksek IgG ve IgA seviyelerine neden olmuştur. Kas içi aşılama etkenin kolonizasyonunu ve dışkıyla atılmasını azaltırken, rektal yolla aşılananın kolonizasyon ve dışkıyla atılmayı etkilemediği görülmüştür. Ayrıca PLG:H7 ile aşılama, H7'ye spesifik antikor yanıtı oluşturmamıştır.

Diğer yandan, sistemik olarak şekillendirilen H7 flagellin spesifik antikorların, flagellin ile ilişkili Toll-Like Reseptör 5 (TLR5) aktivasyonunu interfere/nötralize ederek aşının etkinliğini ve dolayısıyla etkene karşı immün yanıtı zayıflatabildiği gösterilmiştir (McNeilly et al., 2010b).

Rekombinant shigatoksin toksoidleri ile yapılan bir araştırmada (Schmidt et al., 2018), 24 buzağıya 5. ve 8. haftalarda kas içi yolla aşı uygulanmış, 24 buzağı ise kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Aşılanan hayvanlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, serum antikor titrelerinde anlamlı bir artış olduğu görülmüş, kas içi yolla aşılanan grupta kolostrum alan gruba göre antikor titresinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Martorelli vd. (2018), *Brucella* lumazin sentaz ile kaynaştırılmış Stx2'nin B alt birimi (BLS-Stx2B) ile rekombinant intimin c280 aminoasiti ve EspB'yi birleştirmiştir. Üç gruba ayrılan buzağılardan birinci grup intimin ve EspB, ikinci grup ise intimin, EspB ve BLS-STx2B ile aşılanmıştır. Üçüncü grup kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Aşılamadan sonraki 24. günde buzağılara O157:H7 ile epruvasyon yapılmıştır. Aşılama, her iki aşı grubunda da Int₂₈₀ ve EspB'ye karşı oluşan antikorlarda önemli bir artışa neden olmuştur. Stx2B'ye karşı oluşan antikorlar, yalnızca ikinci gruptaki hayvanlarda tespit edilmiştir. Her iki aşı grubunda da kontrol grubuna kıyasla EHEC O157:H7'nin dışkıyla atılımının azaldığı ancak Stx2B'nin aşı formülasyonuna eklenmesinin bağışıklığa bir etkisi olmadığı görülmüştür.

2.3.1.2. Mastitis Kaynaklı *E. coli* Aşı Çalışmaları

Meme bezinin yangısı olarak tanımlanan mastitis, bulaşıcı veya çevresel olarak 2 grupta incelenmektedir. Bulaşıcı patojenler özellikle meme bezine afinite gösteren, çevresel patojenler ise altlıklar, toprak, dışkı ve sağım makinesi gibi çevresel nedenlerle bulaşan fırsatçı mikroorganizmalardır. Mastitise neden olan başlıca bulaşıcı patojenler *S. aureus*, *S. dysgalactiae* ve *S. agalactiae*, başlıca çevresel patojenler ise koliform bakteriler (çoğunlukla *E. coli*) ve *S. uberis*'tir (Bradley, 2002).

İyi yönetilen bir sürüdeki ineklerin yılda yaklaşık % 25'inde koliform mastitis gelişmektedir (Steele et al., 2019). MPEC, akut klinik mastitis vakalarından en sık izole edilen etiyolojik ajandır. Meme bezi, laktozu kullanabilme ve oksijensiz ortamda üreyebilme yeteneğine sahip olan *E. coli*'nin yaşayabilmesi için uygun bir ortamdır. Konakçıdan demir bağlama kapasitesi, bazı suşlarda kapsül ile fagositozdan korunma ve endotoksin gibi virulens faktörleri ise *E. coli*'nin meme bezinde enfeksiyon oluşturmaya için avantaj sağlamaktadır (Hogan and Smith, 2003). Mastitis yapan birçok *E. coli* suşu olmasına rağmen suşun serotipi, genotipi veya spesifik virülens genlerinin varlığı ile klinik hastalık şiddeti arasında bir ilişki olmadığı görülmüştür (Wenz et al., 2006).

Mastitis görülen hayvanlarda bir sonraki dönem doğurganlık oranlarında azalma olması (Schrack et al., 2001), süt veriminin azalması ve ilaç giderlerinin artması ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Mastitisin ekonomik etkileri kadar, halk sağlığındaki önemi de gözden kaçırılmamalıdır. Mastitisin tedavi ve kontrolünde antibiyotiklerin yaygın kullanımı nedeniyle besin zincirine girebilecek olan, antibiyotiklere dirençli bakteri suşlarının artması, halk sağlığı için önemli bir sorun

teşkil etmektedir (White and McDermott, 2001). Bu nedenle mastitise karşı birçok aşı geliştirme çalışması yapılmıştır.

MPEC'e karşı yapılan aşı geliştirme çalışmalarının çoğu mutant *E. coli* J5 (O111:B4) bakterini kullanarak yapılmıştır. Bu bakterin ile yapılan aşılama, diğer koliform bakterilere karşı çapraz reaktif antikorlar üretebilmesi sayesinde, *E. coli*'nin çeşitli serotiplerinin yanı sıra koliform mastitise neden olan diğer bakteri türlerine karşı da koruma sağlamaktadır (Tyler et al., 1992).

González vd. (1989), koliform kökenli mastitise yönelik olarak mutant *E. coli* J5 (O111:B4) bakterinini 2 yıl süren bir aşı çalışmasında değerlendirmiştir. Araştırmacılar 492 ineği aşı ve kontrol grubu olmak üzere iki gruba ayırmış, 296 ineği yağ-su emülsiyonlu adjuvantla hazırlanmış mutant *E. coli* J5 bakterini ile aşılamışlardır. Aşılamalar iki doz kuru dönemde bir doz da buzağılama sonrası olmak üzere toplamda üç doz deri altı yolla 5 ml uygulanmıştır. Kontrol guruba olarak kullanılan 296 inek ise aşılanmamıştır. İlerleyen dönemlerde, 6 adeti aşılanmış grupta, 29 adeti ise kontrol grubunda olmak üzere toplamda 35 adet inekte koliform kökenli klinik mastitis vakası görülmüş, kontrol grubunda 3 inek kronik mastitis, 1 inek ise agalactia nedeniyle sürüden çıkartılmış, klinik mastitis insidensinin aşılanmış ineklerde % 2.57, aşılanmamış ineklerde % 12.77 olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda *E. coli* J5 bakterin aşısının, mastitise karşı koruyucu olduğu görülmüş, özellikle laktasyonun ilk üç ayında mastit görülme sıklığını azalttığı vurgulanmıştır.

İki farklı *E. coli* serotipi ile bir aşı çalışması yapılmıştır. Birinci aşıda inaktif mutant *E. coli* K12 bakterini, ikinci aşıda ise mutant *E. coli* J5 bakterini kullanılmıştır. Birinci denemede 5 inek K12 bakterini ile tek doz aşılanmış ve 3 inek kontrol grubu olarak bırakılmış, ikinci denemede ise 5 inek J5 bakterini ile 3 doz aşılanmış, 5 inek kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Aşılamadan ardından mastitise neden olan *E. coli* P4 suşuyla epruvasyon yapılmıştır. Aşı etkinliğini değerlendirmek için somatik hücre sayımı yapılmış, kan örnekleri toplanmış ve ELISA ile IgG1, IgG2 ve IgM'ye bakılmıştır. Sonuç olarak K12 bakterin ile aşılanan ve aşılanmayan hayvanlar arasında anlamlı bir fark olmadığı, J5 bakterin ile aşılanan ineklerde IgG1 ve IgG2 titrelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı, ancak aşılamadan klinik mastitisi engelleyemediği görülmüştür (Hill, 1991).

Hogan vd. (1992), mutant *E. coli* J5 (O111:B4) bakterin ile 225 inek bulunan bir sürede 2.5 yıl süren bir aşı çalışması yapmıştır. Çalışmadan önce inekler günde 2 kere

sağılmış, sağımdan önce ve sonra dezenfektan olarak % 5.25'lik sodyum hipoklorit kullanılmıştır. İnekler kuru döneme girdikten sonra ayrı bir yere alınmış ve sonraki ilk sağıma kadar aynı yerde beklemiştir. Kuru dönemin sonunda inekler aşı ve kontrol grubu olmak üzere iki gruba ayrılmış, *E. coli* J5 bakterini yağ-su emülsiyonunda hazırlanarak, aşı grubuna 2 doz deri altı yolla kuru dönemden 30 gün sonra ve doğumdan 24 saat sonra uygulanmıştır. Tüm ineklerden buzağılar doğduktan sonraki ilk 7 gün boyunca süt örnekleri toplanmış, klinik mastitis görülen ineklerden süt, antibiyotik tedavisi öncesinde alınmıştır. Çalışma sonucunda koliform bakteriyel meme içi enfeksiyon düzeyinin ve klinik koliform bakteriyel mastitis oranının kontrol ineklerinde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aşılanmış ineklerde serum IgG titresinin aşılandıktan sonraki ilk 6 hafta kontrol grubuna kıyasla daha fazla olduğu ancak ilerleyen dönemlerde bu titrenin giderek azaldığı ve gruplar arasında benzer hale geldiği görülmüştür. *E. coli* J5 bakterin ile aşılanmanın, mastit oluşmasını engelleyemediği ancak hastalığın klinik şiddetini azalttığı sonucuna varılmıştır.

Başka bir aşı çalışmasında 19 inek kuru dönemde, kuru dönemden 30 gün sonra ve buzağılamadan 48 saat sonra *E. coli* J5 bakterin ile aşılanmış, 10 ineğe ise sadece adjuvant uygulanmıştır. Buzağılamadan 30 gün sonra mastitise neden olan *E. coli* suşu meme içine verilmiş, epruvasyondan sonraki 2, 3 ve 4. günlerde bakteri sayımı yapılmıştır. Bakteri sayımına göre aşı grubundaki ineklerde kontrol grubundaki ineklere göre daha az sayıda bakteriye sahip olduğu tespit edilmiş, aşılanmanın meme içi enfeksiyon süresini ve klinik mastitis bulgularını azalttığı sonucuna varılmıştır (Hogan et al., 1995).

Türkiye’de yapılan bir çalışmada, ineklerde koliform mastitise karşı R mutant *E. coli* J5 bakterin aşı etkinliğinin, klinik ve bakteriyolojik incelemelerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Aşı, 16 adet ineğe 3 kez uygulanmıştır. Yapılan değerlendirmede aşı grubundaki 1 (%6), kontrol grubundaki 3 (%30) adet inekte koliform mastitis saptanmıştır. Sonuç olarak, ineklerde kuru dönem ve doğumdan sonra R mutant *E. coli* J5 bakterin aşı uygulanmasının, laktasyonun erken döneminde klinik olarak koliform mastitisin görülme sıklığını azalttığı ifade edilmiştir (Solmaz vd., 2009).

Ferrik enterobactinin bağlanmasından sorumlu olan ferrik enterobactin proteini A (FepA)’nın antijen olarak kullanıldığı bir aşı çalışmasında (Lin et al., 1998) 20 inek, 4 gruba ayrılıp, birinci gruba 100 mg FepA, ikinci gruba 500 mg FepA, üçüncü gruba *E. coli* J5 bakterin, dördüncü gruba ise sadece PBS uygulanmıştır. FepA ile aşılama

sonucu hem serumda hem de sütte FepA'ya karşı yüksek seviyelerde IgG saptanmış, aşılanmayan hayvanlara göre serum IgG titresi 16 kat, süt IgG titresi 32 kat artmıştır. Ayrıca J5 bakterin ile aşılanan ineklere kıyasla daha yüksek IgG titreleri gözlenmiş, farklı FepA dozu alan gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Ticari bir *E. coli* J5 bakterin aşısı ile gerçekleştirilen çalışmada (Tomita et al., 1998) boyun ve supramammar bölgeden yapılan aşılamalar arasındaki farklar araştırılmıştır. Jersey inekleri rastgele üç gruba ayrılarak, birinci grup boyun bölgesinden deri altı, ikinci grup supramammar lenf yumrusu bölgesinden deri altı aşılanmış, üçüncü grup kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Aşılamalar kuru dönemde ve beklenen buzağılama tarihinden 2 hafta önce olmak üzere 2 doz yapılmıştır. Doğum sonrası 14. günde mastitise neden olan bir *E. coli* suşu ile epruvasyon yapılmıştır. Çalışma sonucunda boyun bölgesinden veya supramammar lenf yumrusu bölgesinden yapılan aşılamalarda koliform mastitisin şiddeti arasında fark bulunamamıştır. Bununla birlikte, epruvasyonun 24 saat sonrasında yapılan bakteri sayımında *E. coli* bakteri sayısı aşılanan ineklerde kontrol ineklerine göre anlamlı derecede düşük bulunmuş, aşılanan ineklerde epruvasyonun ardından süt veriminin eski düzeyine daha hızlı geldiği gözlemlenmiş, serum IgG antikor titrelerinin aşılanmış ineklerde önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir ancak aşılama mastitisi önleyememiştir.

Benzer bir çalışmada (Tomita et al., 2000), ticari bir aşı (J VAC, Merial Limited, Athens, GA) ve bu aşıyla karşılaştırma olarak kullanılan başka bir J5 bakterininin mastitis oluşumuna etkisi incelenmiştir. Toplam 8 inek kuru dönemde ve beklenen buzağılama tarihinden 2 hafta önce J VAC aşısıyla, 8 inek kuru dönemde, beklenen buzağılama tarihinden 2 hafta önce ve doğumdan hemen sonra J5 bakterini ile aşılanmış, 8 inek kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Tüm ineklere aşılamadan sonraki 14-30 gün aralığında mastitise neden olan *E. coli* suşuyla epruvasyon yapılmış, epruvasyondan 144 saat sonra yapılan bakteri sayımında, aşılanan ineklerde bakteri sayısının daha düşük olduğu tespit edilmiş, aşı grupları arasında fark bulunamamıştır. Sütteki somatik hücre sayısı ve rektal sıcaklık tüm gruplarda benzer olduğu görülmüştür. Kuru dönemden sonraki 21, 45. günlerde, buzağılamadan sonraki 14, 21, 30, 45. günlerde alınan serum örnekleri değerlendirilerek aşılanan ineklerin IgG1 ve IgG2 antikor titrelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu, IgM seviyelerinin tüm gruplarda benzer olduğu tespit edilmiş, aşılamının inekleri klinik mastitise karşı korumadığı kanaatine varılmıştır.

Wilson vd. (2009), *E. coli* J5 bakterini ile 251 süt ineğini deri altı yolla buzağılamadan 60 ve 28 gün önce toplamda 2 doz aşılamış, 306 ineği ise kontrol grubu olarak bırakmış, grupları klinik mastitis insidansı, süt verimi, ölüm ve sürüden çıkartma oranı yönünden değerlendirmiştir. Aşılanan ineklerin kontrol grubuna kıyasla IgG1 ve IgG2 seviyelerinin daha yüksek olduğu, klinik mastitis sonucu süt veriminin daha az etkilendiği, sürüden çıkartma ya da ölüm oranlarının daha düşük olduğu görülmüş, laktasyonun ilerleyen zamanlarında aşının etkisinin azaldığı ve aşılananlar ve aşılanmayanlar arasında fark olmadığı tespit edilmiştir.

Morimoto vd. (2011), ETEC ishalleri için kullanılan bir aşıyla (Imocolibov), süt ineklerini aşılamış ve aşılanmanın klinik mastitise etkilerini 2 yıl boyunca araştırmıştır. İki gruba ayrılan 480 süt ineğinin yarısını ETEC aşısı ile birer ay arayla 2 doz deri altı yolla aşılamış, kalan yarısını ise kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Aşılanan inekler ile aşılanmayan inekler arasında; süt verimi, kalitesi ve mastitis insidansı yönünden anlamlı bir fark olmadığı, aşılanmanın mastitis gelişimini engellemediği ancak mastitis nedeniyle ölüm veya sürüden çıkartılma oranının aşılananlarda daha düşük olduğu görülmüştür.

Gebeliğin geç dönemlerindeki 10 inek *E. coli* J5 bakterini ile 3 doz aşılanmış, 10 inek ise kontrol grubu olarak bırakılmış, buzağılamadan 10 gün önce meme içine mastitise neden olan *E. coli* suşu ile epruvasyon yapılmıştır. Epruvasyon sonrası serum IgG düzeylerinin, aşılanan ineklerde daha yüksek olduğu saptanmış, aşılanan ineklerden 8'inde, aşılanmayan ineklerin ise 9'unda klinik mastitis görülmüş, California mastitis test ile aşılanan ineklerde daha düşük mastit skoru saptanmıştır. Aşılanmanın klinik mastitisi engellemediği ancak şiddetini azalttığı sonucuna varılmıştır (Gurjar et al., 2013).

Steele vd. (2019), piyasada bulunan 2 ticari aşının etkinliğini değerlendirmek için bir çalışma yapmıştır. Çalışmada daha önce mastitis görülmeyen inekler her grupta 12 inek olacak şekilde 3 gruba ayrılarak, birinci (V1) ve ikinci gruplar (V2) farklı aşılarla, kuru dönemde, buzağılamadan 21 gün önce ve 14 gün sonra 3 doz deri altı yolla aşılanmıştır. Üçüncü grup kontrol grubu olarak aşılanmadan bırakılmış ve kuru dönemde tüm ineklere antibiyotik tedavisi uygulanmıştır. Süt verimi başladıktan 100 gün sonra epruvasyon yapılmıştır. Epruvasyondan sonra 6, 12, 15, 18, 21. saatlerde ve 0, 1, 2, 3, 6, 30 ve 60. günlerde süt örnekleri toplanarak süt antikor düzeyi, somatik hücre ve bakteri sayımı yapılmış, 0, 1, 2, 3, 6, 30 ve 60. günlerde serum örnekleri

toplanarak antikor yanıt değerlendirilmiştir. Ayrıca ineklerin vücut sıcaklığına, aktivite düzeylerine, dinlenme zamanlarına, süt verimine, miktarına ve kalitesine bakılmıştır. 36 inekte yapılan çalışmanın 7. gününde antibiyotik tedavisi mecburiyeti nedeniyle V1 grubundan 3, V2 grubundan 1, kontrol grubundan 3 inek çalışmadan çıkartılmıştır. Değerlendirme sonucunda vücut sıcaklığı, bakteri sayısı, somatik hücre sayısı, süt verimi, miktarı ve kalitesi tüm ineklerde benzer bulunmuştur. V1 grubunda daha yüksek IgG1 ve IgG2 titresini bulunmasına rağmen bunun iyileşmeye herhangi bir etkisi olmadığı, düvelerin daha önce doğum yapmış ineklere göre klinik mastitisi daha hafif atlattığı görülmüş, aşılanan ineklerde mastitisin klinik bulgularının azalmadığı tespit edilmiştir.

2.3.1.3. Enterotoksijenik *E. coli* Aşı Çalışmaları

ETEC fimbrialarına yönelik çalışmalar, bu organellerin biyolojisini ve patogenezdaki rolünü detaylandırmış, böylece yeni tanı teknikleri, profilaktik ve terapötik araçlar geliştirilmiştir. Buzağılardaki ETEC enfeksiyonları, gebe hayvanın aşılanması ve erken kolostrum alımıyla önlenabilmektedir. Ticari olarak üretilip, özellikle inekler ve domuzlar için parenteral uygulanabilen, maternal antikor oluşturmak amacıyla kullanılan birçok aşı mevcuttur. Bu aşılar sıklıkla koruyucu veya saflaştırılmış antijenleri içermektedir ve gebeliğin son dönemlerinde uygulanmaktadır. Gebelerin aşılanması sonucu yüksek ETEC duyarlılığına sahip yeni doğan döneminde ETEC fimbrial antikor düzeyi artmakta ve etkenin yoğun kolonizasyonu önlenabilmektedir. Sonuç olarak, yeni doğan yavrular için ilk birkaç saat gibi erken bir zamanda antijene yönelik spesifik kolostral antikorlar sağlanabilmekte, böylece ETEC virülens faktörleri ve bakterilerin bağırsakta çoğalması engellenebilmektedir (Moon and Bunn, 1993).

Aşılanan ineklerin kolostrum IgG düzeyi ile yeterli kolostrum alan buzağların serum antikor titreleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (Güngör ve Bastan, 2004). Diğer yandan her zaman kolostrumdaki antikor seviyesindeki artış, kan serumundaki antikor titresinde artışa neden olmayabilir. Benzer şekilde aşılanmayan annelerin kolostrumlarında düşük seviyelerde saptanan antikor seviyesi olmasına rağmen, yavruların kan serumlarında koruyucu düzeyde antikor belirlenebilmektedir. Bu durum, intrauterin olarak yavruların bazı enfeksiyöz etkenlerle karşılaşmış olabileceğine işaret etmektedir (Ellis et al., 1996). Sığır ETEC ile ilgili fimbrial antijenler kullanılarak yapılan aşı çalışmalarının yanı sıra, formalinle inaktive edilmiş

bakterinler, fimbriaları eksprese eden zayıflatılmış *S. enterica* mutantları kullanılarak da çeşitli aşı çalışmaları da yapılmıştır (Contrepolis et al., 1978; Acres et al., 1979; Nagy, 1980; Snodgrass et al., 1982; Valente et al., 1988; Crouch et al., 2001; Deng et al., 2013; Hashish et al., 2013; Liu et al., 2014; Hur et al., 2015).

Contrepolis vd. (1978), doğumdan 45 ve 15 gün önce deri altı olarak yağ-su emülsiyon adjuvantı içeren *E. coli* K99 aşısı ile aşıladıkları sığırlara ait kolostrumun buzağılarda oluşturulan deneysel koliseptisemisine karşı koruyuculuk seviyesini araştırmışlardır. Çalışmada, aşılanan 6 sığıra ait buzağılara ve kontrol grubu olarak aşılanmamış 4 sığırdan doğan buzağılara yeterince kolostrum aldıktan sonra *E. coli* B41 (O101:K99:H-) suşu ile epruvasyon yapılmıştır. Aşılanmamış gruptaki tüm buzağılarda ishal, 2 adetinde ölüm görüldüğü, aşılanmış gruptakilerden ise sadece 1 hayvanda orta derecede ishal şekillendiği rapor edilmiştir. Kontrol ve aşılanmış gruptaki tüm buzağılarda 24 saat süresince etkenin atılımının olduğu bildirilmiş, K99 ile aşılanmanın ETEC'e karşı korunmada etkili bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Acres vd. (1979), ETEC'in farklı suşlarını ve alt ünitelerini kullanarak dört gruba ayırdıkları ineklerde bir aşı geliştirme çalışması yapmıştır. Dokuz inekten oluşan birinci grup, saflaştırılmış *E.coli* K99 (F5) adhezini ile, 9 inekten oluşan ikinci grup formalinle inaktive edilmiş ETEC B44 (O9:K30;K99,F41:H-) suşu bakterini ile, 6 inekten oluşan üçüncü grup ise formalinle inaktive edilmiş, altı farklı ETEC suşu içeren (08:K25, 08:K85, 09:K35, 02O, 0101:K28 ve 0101:K30) bakterin ile aşılanmıştır. Toplam 10 inekten oluşan dördüncü grup ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Aşılamalar gebe ineklere, buzağılar doğmadan 3 ve 6 hafta önce olmak üzere 2 doz halinde ve deri altı yolla uygulanmıştır. Doğumdan sonra buzağının annelerinin yanında kalmasına ve kolostrum almasına izin verilmiştir. 12-14 saat sonra oral olarak ETEC B44 suşu ile epruvasyon yapılmış, epruvasyondan sonra K99, K30 ve O9 antijenleri için kolostral antikor titreleri değerlendirilmiştir. Aşılanmamış grupta 24-72 saat aralığında 10 buzağıdan 9'unda şiddetli ishal sonucu ölüm şekillenmiştir. Benzer şekilde 6 farklı suş verilen üçüncü gruptaki 6 buzağıda da ishal şekillenmiş ve 4 buzağı ölmüştür. Birinci ve ikinci grupta K99'a ve ishale karşı koruma sağlanmış ancak ETEC O9:K30 serotipine karşı kolostral antikorlar olmadığı görülmüştür. Saflaştırılmış K99 adhezini alan birinci gruptaki 2 buzağıda geçici ve hafif şiddetli ishal gözlenmiş, ikinci gruptaki 9 buzağının üçünde ishal görülmüş ve yalnızca bir buzağı ölmüştür. Çalışma buzağılarda ETEC'e karşı bağışıklık için aşının K99

adhezini içermesi gerektiğini göstermiştir.

ETEC F41 ve K99 adhezinleri kullanılarak hazırlanan bir aşının etkinliğinin değerlendirildiği çalışmada (Nagy, 1980), iki gruba ayrılan ineklerden birinci grup saflaştırılmış K99 ve F41 adhezinleri, ikinci grup ise kontrol grubu olarak yalnızca saflaştırılmış F41 adhezini ile aşılanmıştır. Aşılamalar 20 ml, deri altı yolla buzağılar doğmadan 5 ve 2 hafta önce olmak üzere 2 doz uygulanmıştır. Her iki grupta da 11 buzağı doğmuştur ve ilk kolostrum alımı sırasında (doğumdan 1 ila 7 saat sonra) *E. coli* B41 (O101:K99:F41) suşu oral yolla verilerek epruvasyon yapılmıştır. Epruvasyon sonucu aşı grubundaki 6 buzağıda, kontrol grubundaki tüm buzağılarda ishal gelişmiş, kontrol grubundan 4 buzağı ishal nedeniyle ölmüştür. Kolostral anti-O101 titreleri her iki grupta da benzer bulunmuş, birinci gruptaki hayvanların anti-K99 titrelerinin ikinci gruba kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. Çalışma sonucunda saflaştırılmış K99 aşısının buzağıları koruyabileceği gösterilmiştir.

ETEC K99 ekstraktı ve inaktif *Rotavirus* içeren aşının etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada (Snodgrass et al., 1982), dört gruba ayrılan 24 gebe inekten altı adet inek 2 ml yağ adjuvanlı K99 ekstraktı ve inaktif *Rotavirus* aşısı ile, 6 adet inek 0.5 ml yağ adjuvanlı K99 ekstraktı ve inaktif *Rotavirus* aşısı ile, 6 adet inek 4 ml alüminyum hidroksit adjuvanlı K99 ekstraktı ve inaktif *Rotavirus* aşısı ile aşılanmış, 6 adet inek kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Aşılamalar dört hafta arayla iki doz yapılmıştır. Bu ineklerden doğan buzağılara 6-18 saat sonra epruvasyon yapılmıştır. Epruvasyon sonrasında yağ adjuvanlı aşı ile aşılanan ineklerde serum ve sütte *Rotavirus*-K99 antikor titrelerinin arttığı tespit edilmiştir. Alüminyum hidroksit adjuvanlı aşı ile aşılanan ineklerde serum *Rotavirus* ve K99 antikor titrelerinde artış olmasına rağmen kolostrum K99 antikor düzeyinde artış olmamıştır. Aşılanmamış ineklerden doğan altı buzağının beşinde epruvasyondan sonra enfeksiyon gelişmiş, aşılanan 18 buzağıdan hiçbirinde klinik enfeksiyon görülmemiştir. Çalışma sonucunda ETEC-*Rotavirus* aşısının birlikte kullanılmasının, bu etkenlere bağlı gelişen buzağı ishallerinin önlenmesinde faydalı olabileceği kanaatine varılmış, kolostrumda K99 antikorunun yüksek düzeye ulaştırılmasında yağ adjuvanlı aşının, alüminyum hidroksit adjuvanlı aşından daha etkili olduğu görülmüştür.

Valente vd. (1988), 6-8 yaşlarındaki 45 sığırı doğum zamanından 6 ve 4 hafta önce deri altı yolla ETEC B41 (O101 :K:-H , K99, F41) suşundan hazırladıkları kısmi purifiye K99 antijeni içeren aşı ile aşılanmışlardır. Çalışmada benzer özelliklerde 4 sığır

kontrol grubu olarak aşılanmamıştır. İki gruptaki sığırlardan doğan tüm buzağılara doğumu takiben kolostrum alımından 5-10 saat sonra 4×10^{10} cfu/ml *E. coli* B44 (O9:K30;K99,F41:H-) suşu ile oral yolla epruvasyon yapılmıştır. Buzağılardan epruvasyon öncesi ve sonrasında rektal svap örnekleri alınarak etkenin dışkı ile saçılım durumu incelenmiştir. Tüm sığırlardan aşılama sırasında, aşılama sonrası 15 ve 25. günde, doğumu takiben 24 saat içinde ve 7 gün sonrasında, buzağılardan ise yeterince kolostrum alımından 12-24 saat sonra ve doğum sonrası 7. günde kan serum örnekleri toplanmıştır. Sığırlardan ilk sağım ile birlikte ve 7 gün sonunda kolostrum örnekleri alınmıştır. Araştırmada, enfekte edilen aşılanmış sığırlardan doğan 45 buzağının 3'ünde (% 6.7) ishal ve ölüm gözlenmiştir. Diğer yandan, kontrol grubundaki aşılanmamış sığırlara ait buzağının tamamı şiddetli ishal sonrası ölmüştür. Aşılanmış hayvanlara ait kan serumu ve kolostrum örneklerindeki anti-K99 antikor titresi, kontrol grubundakilerle karşılaştırıldığında önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Benzer şekilde aşılanmış hayvanların buzağılarından alınan rektal svap örneklerinde, kontrol grubuna göre etkenin saçılımı önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir (Valente et al., 1988).

Itzchak vd. (1992), ETEC K99 aşısı ile deri içi ve deri altı yollarla yapılan aşılamının etkilerini karşılaştırmış, deri içi enjeksiyon bölgelerinin sayısının arttırılmasının antikor titresine etkisini ve iki doz aşılama arasındaki uygun zaman aralığını incelemiştir. Çalışmaya 8-18 aylık 135 düve dâhil edilmiş, 2 aşı denemesi yapılmış ve aşılarında adjuvant kullanılmamıştır. Birinci denemede 74 düve 5 gruba ayrılarak, birinci gruptaki 23 düve deri içi yolla beş bölgeden, ikinci gruptaki 20 düve deri içi yolla iki bölgeden, üçüncü gruptaki 19 düve deri altı yolla bir bölgeden, dördüncü gruptaki 6 düve kas içi yolla bir bölgeden aşılanmıştır. Aşı tüm gruplara toplamda 5 ml olacak şekilde 2 hafta arayla 2 doz uygulanmış, beşinci gruptaki 6 düve ise kontrol grubu olarak bırakılmış ve aşılanmamıştır. İkinci denemede ise 61 düve, 5 gruba ayrılarak, birinci gruptaki 15 düve deri içi yolla iki hafta arayla, ikinci gruptaki 16 düve deri içi yolla üç hafta arayla, üçüncü gruptaki 14 düve deri içi yolla dört hafta arayla, dördüncü gruptaki 11 düve deri altı yolla üç hafta arayla aşılanmıştır. Beşinci gruptaki 5 düve kontrol grubu olarak bırakılmış ve aşılanmamıştır. Birinci denemede aşılanan grupların antikor titreleri sırasıyla 10,70, 10,95, 8,73, 9,31 olarak, ikinci deneyde aşılanan grupların antikor titreleri sırasıyla 12,64, 11,93, 11,64, 11,16 olarak ölçülmüştür. Bu veriler ışığında deri içi yolla aşılamının deri altı yolla aşılamaya göre

anlamalı derecede üstün olduğu, doz aralığı için en uygun zamanın 2 hafta olduğu sonucuna varılmış, aynı miktarda antijen kullanılarak deri içi aşı bölgelerinin sayısının arttırılmasının, antikor titresine etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Farklı gruplara ayrılan 99 gebe sığırdaki *E. coli* K99 pilusu ve A14 antijenlerini içeren bir aşının probiyotik (*Lactobacillus acidophilus*, 2.0×10^8 cfu/ 250 ml süt, oral) ile birlikte veya tek başına uygulanması sonrası buzağı ishallerine etkinliğinin araştırıldığı çalışmada (Avila et al., 1995), 29 hayvan içeren 1. grup aşılanmayan ve probiyotik verilmeyen kontrol grubu, 10 hayvandan oluşan 2. grup aşılanan ve probiyotik verilmeyenler, her biri 10'ar hayvandan oluşan 3. 4. ve 5. grup aşılanan ve sırasıyla 5, 15 ve 30 gün probiyotik verilenler, benzer şekilde her biri 10'ar hayvandan oluşan 6. 7. ve 8. grup aşılanmayan ve sırasıyla 5, 15 ve 30 gün probiyotik verilenler şeklinde dizayn edilmiştir. Aşılamalar deri altı yolla 5 ml yapılmıştır. Araştırmanın sonucunda aşılanan hayvanların aşılanmayan hayvanlara kıyasla daha yüksek antikor titresine sahip olduğu tespit edilmiş, aşı ile kombine edilen 15 ve 30 gün süresince probiyotik uygulamasının buzağılarda ishallerin önlenmesinde en etkili yol olduğu kanaatine varılmıştır.

Brezilya'da ETEC'in engellenmesi amacıyla, kısmen purifiye edilmiş K99 ve F41 fimbriyal antijenlerini içeren yağ emülsiyonlu bir aşı kullanılarak yapılan aşı denemesinde (Yano et al., 1995), gebeliğin 7. ayındaki 9 sığır iki gruba ayrılarak 6 sığır doğumdan 8 ve 2 hafta önce deri altı olarak aşılanmış, aşı uygulanmayan 3 gebe sığır ise kontrol olarak bırakılmıştır. Doğum sonrası yeterince kolostrum almış buzağılara *E. coli* B41 suşu (0101, STa+, K99+, F41+) ile epruvasyon yapılmıştır. Kontrol grubundaki 3 buzağıdan 2'si epruvasyon sonrası 48. saatte ölmüş ve dışkılarından *E. coli* B41 suşu saf olarak izole edilmiştir. Aşılanmış gruplardaki sığırlara ait buzağılarda ise ishal ve ölüm görülmemiştir. Araştırmada, aşı ile oluşturulan kolostral antikorların buzağılara yeterince aktarıldığı ve aşının gebe sığırlarda hiçbir yan etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Crouch vd. (2001), *Rotavirus*, *Coronavirüs* ve *E. coli* F5 (K99) antijenlerinin kombinasyonu ile oluşturulan ticari bir aşığı (Rotavec Corona) değerlendirmiştir. Toplam 25 gebe inek iki gruba ayrılarak 15 ineğe beklenen buzağılama tarihinden 30 gün önce kas içi yolla 2 ml aşı verilmiş, 10 inek ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Kolostrum ve süt örnekleri ile buzağılara ait kan serumu örneklerinin incelenmesi sonucunda aşılanan ineklerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli antikor

artışı belirlenmiştir. Aşılama sonrası elde edilen antikor titresinin 28 güne kadar koruyucu düzeyde kaldığı tespit edilmiştir.

K99 ve F41 içeren bir bakterin aşısının etkinliği Figueiredo vd. (2004), tarafından değerlendirilmiştir. 3 gruba ayrılan hayvanlardan birinci grup doğumdan 30 gün önce tek doz, ikinci grup doğumdan 30 ve 60 gün önce iki doz aşılanmış, üçüncü grup kontrol grubu olarak bırakılmış ve aşılanmamıştır. Doğumdan sonraki 24-36 saatler arasında buzağılardan serum, ineklerden kolostrum toplanmıştır. Anti-K99 ve anti-F41 antikorları, saflaştırılmış K99 ve F41 fimbrial antijenleri kullanılarak ELISA ile tespit edilmiştir. Deneme sonucunda birinci gruptaki buzağı serumu ve kolostrum antikor titresinin kontrol grubuyla yakın olduğu, ikinci gruptaki buzağı serumu ve kolostrum antikor titresinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede üstün olduğu belirlenmiş, iki doz aşılamının önemi vurgulanmıştır.

ETEC ile ilgili yeni aşı çalışmaları sıklıkla fareler üzerinde denenmektedir ve başarıyla sonuçlanan çalışmaların ileride sığırlarda kullanılmak üzere yeni aşı adayları olma potansiyeli bulunmaktadır. Deng vd. (2013), Labil toksinin B alt ünitesiyle birleştirilmiş rekombinant stabil toksin A (STa-LTB)'yı fareler üzerinde yaptıkları bir aşı çalışmasında değerlendirmiştir. Çalışma, konvansiyonel alüminyum hidroksit adjuvantında hazırlanan aşıyla, jelatin nanopartiküller ile hazırlanan rekombinant STa-LTB füzyon proteini aşısının bağışıklık oluşturma yeteneği ve koruyucu etkinliği arasındaki farkı belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışma sonunda ETEC'e karşı nanopartiküler STa-LTB aşısının, konvansiyonel alüminyum hidroksitte hazırlanan STa-LTB aşısına göre önemli ölçüde daha yüksek ve uzun süreli antikor titreleri oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, ETEC enfeksiyonuna karşı nanopartiküler aşının geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılabileceğini göstermiştir.

Sığır viral diyare virusu (BVDV)'ne karşı E2 proteini ve ETEC'e karşı K99 ve STa kullanılarak hazırlanan multiepitop füzyon antijenleri içeren bir aşı çalışmasında (Hashish et al., 2013), multiepitop antijen ile periton içi yolla aşılanan farelerde, anti-K99, anti-STa ve anti-BVDV antikorlarının titresinin arttığı, oluşan antikorların ETEC ve BVDV enfeksiyonlarını önlediği, böyle bir aşılamının güvenli ve güçlü immunojenik olduğu sonucuna varılmış, multiepitop füzyon antijeni stratejisinin geliştirilerek başka heterojen patojenlere karşı da kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Liu vd. (2014), gebe farelerde ağız yoluyla veya burun içi yolla uygulanan F41 ekprese eden rekombinant *Lactobacillus casei* antijeninin ETEC F41'e karşı pasif

bağışıklık koruma düzeyini değerlendirmiştir. Bu rekombinant aşının gebelere uygulanmasından sonra bu gebelerden doğan yavru farelerdeki antikor titrelere bakılmıştır. Aşılama sonucunda yavrularda hem mukozal hem de sistemik bağışıklık uyarılmış, F41'e karşı antikor titresi anlamlı derece artmıştır. F41 ekprese eden rekombinant *L. casei* aşısının ETEC F41'e karşı koruyucu olduğu sonucuna varılmıştır.

E. coli K88 ve K99 eksprese eden *Salmonella* BG'si Hur vd. (2015)'nin yaptığı bir aşı çalışmasında değerlendirilmiştir. Çalışmada 75 fare gruplara bölünmüş ve oral ya da kas içi yolla, bir doz, iki doz veya üç doz aşılanmıştır. Çalışma sonucunda tüm gruplar kontrol grubundan anlamlı derecede daha yüksek bağışıklık yanıtı göstermiş, özellikle, kas içi çift veya üç doz aşılanan gruplarda, belirgin şekilde daha yüksek bağışıklık tepkileri ortaya çıkmıştır.

Gebe sığırlara uygulanan inaktif *E. coli* aşısının kolostrum ve buzağı kan serumlarındaki Ig G seviyelerine etkisinin araştırılması amacıyla yapılan güncel bir çalışmada (Sancak ve Gülhan, 2021), gebeliklerinin farklı dönemlerindeki sığırlara (son 60 ve 30 gün) ticari bir inaktif *E. coli* aşısı uygulanmıştır. Aşılanan sığırların kolostrumu ve bu kolostrumlarla beslenen buzağuların kan serumlarındaki IgG seviyeleri ELISA ile incelenmiştir. Aşılama grupları ve kontrol grubu arasında IgG seviyelerindeki farklılıklar ölçülerek, gruplar arasındaki IgG değerleri karşılaştırılmıştır. Kolostrum örneklerine ait veriler incelendiğinde, kontrol grubu ile tek doz ve iki doz aşılanan hayvanlara ait IgG seviyeleri arasındaki farkın önemli ($p<0,001$) olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde buzağı serumlarına ait veriler değerlendirildiğinde; tek doz ve iki doz aşı yapılan sığırların buzağularında ölçülen kan serum IgG değerlerinde kontrol grubuna göre önemli oranda artış tespit edilmiştir ($p<0,001$). Diğer yandan kontrol grubundaki 7 buzağının tamamında (% 100), tek doz aşılanan sığırlara ait 7 buzağının 5'inde (% 71,4) pasif transfer yetersizliği (PTY) görülürken, iki doz aşılanan 7 buzağının hiçbirinde PTY belirlenememiştir. Böylece aşılanan hayvanlarda PTY oranlarında önemli oranda düşüş sağlandığı, gebe sığırlara uygulanan inaktif *E. coli* aşısı ile oluşturulan immun yanıtın pasif olarak buzağılara transfer edildiği, gebe sığırların gebeliklerinin son 60 ve 30. gününde iki doz aşılamanın, tek doz aşılamaya göre daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

2.3.1.4. *E. coli* Ticari Aşıları

Sığırlarları *E. coli* enfeksiyonlarından korumak için birçok ticari aşı mevcuttur.

Bu aşılar MPEC (Tablo 2.7), ETEC (Tablo 2.8) ve EHEC O157:H7'ye yöneliktir. EHEC O157:H7 aşıları ülkemizde ruhsatlı değildir, bu nedenle kullanılmamaktadır. Ülkemizde ruhsatlı olmayan başka aşılar da mevcuttur (Tablo 2.9). *E. coli* bakterin veya alt üniteleri, ticari aşıların içerisinde genellikle başka bakteri veya virüslerle kombine halde bulunmakla beraber, yalnızca *E. coli* içeren ticari aşılar da bulunmaktadır.

Tablo 2.7. MPEC'e karşı kullanılan ticari aşılar

Ticari Adı	İçerik	Kullanım Şekli ve Doz	Üretici Şirket
Startvac-Topvac	İnaktif <i>E. coli</i> (J5) İnaktif <i>S. aureus</i> (CP8)	Gebelere, ilk aşılama beklenen doğum tarihinden 45 gün önce, ikinci aşılama 35 gün sonra (beklenen doğum tarihinden 10 gün önce), üçüncü aşılama ise ikinci aşılamadan 62 gün sonra (doğumdan 52 gün sonra) olmak üzere 3 doz kas içi yolla 2 ml uygulanmalıdır.	HIPRA
Mastivac	<i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. uberis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> J5 bakterin, <i>A. pyogenes</i>	15 gün ara ile 5 ml deri altı yolla uygulanmalıdır	ATAFEN
Mastivac TT	<i>S. agalactiae</i> <i>S. uberis</i> , <i>S. Dysgalactiae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>E. coli</i> J5 bakterini, <i>S. aureus</i> , <i>C. pyogenes</i>	3 gün arayla ilk doz 20 ml, ikinci ve üçüncü dozlar 15 ml olmak üzere deri altı yolla 3 doz uygulanmalıdır.	ATAFEN

Tablo 2.8. ETEC'e karşı kullanılan ticari aşılar

Ticari Adı	İçerik	Kullanım Şekli ve Doz	Üretici Şirket
Colivac	<i>E. coli</i> (0101:H-K99+, F41+) ve (101:H-K99+, F(Y)+) bakterini	Gebe ineklere doğumlarına 1.5-2 ay kala birer hafta ara ile 5, 7.5 ve 10 ml olarak deri altı yolla 3 doz uygulanmalıdır.	VETAL
Rotavec Corona	İnaktif Rotavirüs (G6-P5) İnaktif Coronavirus, <i>E. coli</i> F5 (K99) bakterini	Gebe ineklere doğumdan önce 3-12 hafta aralığında tek doz kas içi yolla 2 ml uygulanmalıdır.	MSD (INTERVET)
Colidoll	<i>E. coli</i> (0101:H-K99+, F41+) ve 11A (101:H-K99+, F(Y)+) bakterini	Gebe ineklere, doğumdan 4 ve 6 hafta önce 2 ml deri altı yolla 2 defa uygulanmalıdır.	DOLLVET
Scourguard 4KC	İnaktif Rotavirus (G6-G10), İnaktif Coronavirus, <i>E. coli</i> F5 (K99) bakterini	İkinci doz beklenen buzağılama tarihinden 2-3 hafta önce olmak üzere, en az iki hafta arayla 2 ml kas içi yolla 2 doz uygulanmalıdır.	ZOETİS
VBR K99+C	<i>E. coli</i> K99/F41/F17(Fy) bakterini, <i>C. perfringens</i> Tip C bakterin ve toksoitleri	Gebe ineklere doğumdan 1 ay önce tek doz kas içi veya deri altı yolla 2 ml uygulanmalıdır.	ATAFEN
VBR COLİMİX 7	<i>C. perfringens</i> B, C, D, <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. chauvoei</i> , bakterin-toksoitleri <i>E. coli</i> K99/F41/F17(Fy) bakterini	Gebelere son dönemde 3-4 hafta ara ile 2 doz, bir sonraki gebelikte tek doz, buzağılara doğumdan 3-4 ay sonra tek doz deri altı veya kas içi yolla 4 ml uygulanmalıdır.	ATAFEN
VBR COLİMİX 9	<i>C. perfringens</i> B, C, D, <i>C. haemolyticum</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. chauvoei</i> bakterin-toksoitleri ile <i>E. coli</i> K99/F41/F17(Fy) bakterini	Gebeliğin son döneminde 3-4 hafta ara ile 2 doz, bir sonraki gebelikte tek doz, buzağılara doğumdan 3-4 ay sonra tek doz deri altı veya kas içi yolla 4 ml uygulanmalıdır.	ATAFEN
VBR K99	<i>E. coli</i> K99/F41/F17(Fy) bakterini	Gebe ineklere, kas içi veya deri altı yolla doğumdan 1 ay önce tek doz uygulanmalıdır.	ATAFEN
Kolibin RC NEO	<i>E. coli</i> (O8:K35, K99; O9:K35, K99; O101:K30, K99) bakterini, İnaktif Rotavirus (TM-91), İnaktif Coronavirus (C-197)	Gebe ineklere, buzağılamadan 5-7 hafta önce ilk doz olmak üzere 21 gün ara ile kas içi yolla 2 doz uygulanmalıdır.	BİOVETA

Tablo 2.9. Türkiye’de ruhsatlı olmayan ticari aşılar

Ticari Adı	İçerik	Kullanım Şekli ve Doz	Üretici Şirket
Enviracor	İnaktif <i>E. coli</i> (J5)	İneklere gebeliğin 7. ayında 5 ml, 8. ayında 5 ml ve doğumdan sonraki iki hafta içerisinde 5 ml olmak üzere toplamda 3 doz deri altı yolla uygulanmalıdır.	ZOETİS
İmocolibov	<i>E. coli</i> K99/F41/F17/F31A bakterini	Gebe ineklere doğumdan 2 ve 6 hafta önce olmak üzere 2 doz deri altı yolla 5 ml uygulanmalıdır.	MERİAL
Scour Bos 9	İnaktif Rotavirus, İnaktif Coronavirus, <i>C. perfringens</i> tip C bakterin toksoidi, <i>E. coli</i> .K99 bakterini	Gebe ineklere buzağılamadan 8-16 hafta önce 2 ml kas içi yolla uygulanmalıdır.	NOVARTİS
Epitopix O157:H7 SRP	<i>E. coli</i> O157:H7 SRP	İlk doz 2 ml deri altı yolla, ikinci doz bundan 2-4 hafta sonra, üçüncü doz ise en az 6 hafta sonra uygulanmalıdır.	EPİTOPIX
<i>E. coli</i> Bacterial Extract	<i>E. coli</i> O157:H7 SRP	İlk doz 2 ml deri altı yolla, ikinci doz bundan 2-4 hafta sonra, üçüncü doz ise en az 6 hafta sonra uygulanmalıdır.	ZOETİS
J VAC	İnaktif <i>E. coli</i> (J5)	Gebeliğin 7. ayında bir doz, buzağılama tarihinden 1-3 hafta sonra bir doz olmak üzere toplamda 2 doz, 2 ml kas içi veya deri altı yolla uygulanmalıdır.	MERİAL
Lactovac C	İnaktif Rotavirus İnaktif Coronavirus <i>E. coli</i> K99/F41 bakterini	Gebe ineklere doğumdan 2 ve 6 hafta önce olmak üzere 2 doz deri altı yolla 5 ml uygulanmalıdır. Aşılanan hayvanlar bir sonraki gebelikte doğumdan 2-6 hafta önce tek doz aşılanmalıdır.	ZOETİS

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Örnek Toplama ve Fenotipik İdentifikasyon

Bu çalışmanın materyalini neonatal sepsisemi vakalarının sık görüldüğü ve bu nedenle ekonomik kayıpların fazla olduğu Kars ve ilçelerindeki 10 günlükten küçük neonatal sepsisemili buzağılardan alınan, 200 adet dışkı örneği oluşturdu. Dışkı örnekleri steril dışkı kaplarına alınarak soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı ve kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklandı. Tez çalışmasının tüm laboratuvar çalışmaları Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütüldü. Dışkı örneklerinden *E. coli* izolasyonu amacıyla MacConkey agara (Oxoid, İngiltere) ekimler yapılarak, 37 °C’de 24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda laktoz pozitif olan tek bir koloniden EMB agara (Oxoid, İngiltere) ekim yapıldı ve aynı koşullarda inkubasyona bırakıldı. Metalik refle renk veren kolonilere IMVIC, üreaz testleri, TSI agara inokulasyon ve hareket muayenesi yapılarak izolatların *E. coli* açısından fenotipik identifikasyonu gerçekleştirildi. TSA’da üreyen koloniler, izolatların fenotipik antibiyotik duyarlılık testi için kullanılan bakteri süspansiyonu ve bakteriyel DNA eldesi işleminde kullanıldı. Tüm izolatlar -20 °C’de stoklandı.

3.2. DNA Ekstraksiyonu

İzolatlara ait bakteriyel DNA eldesi amacıyla kaynatma yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, TSA’da üreyen saf kültür halindeki 4 koloni seçilerek, 150 µl steril distile su içerisinde süspansiyon edildi. Örnekleri içeren süspansiyonlar 100 °C’de 10 dakika kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra 11.000 G’de 3 dakika santrifüj sonrası elde edilen süpernatant templeyt DNA olarak kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı (González Pasayo et al., 2019)

3.3. *E. coli*’nin Genotipik Olarak Doğrulanması

Fenotipik olarak tanımlanan *E. coli* izolatlarının genotipik olarak tür düzeyinde *E. coli* olarak doğrulanmasında El-Razik vd. (2010) kullandıkları protokol modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. Bu amaçla (Eco 2083 (F): 5’-GCT TGA CAC TGA ACA TTG AG-3’; Eco 2745 (R): 5’-GCA CTT ATC TCT TCC GCA TT-3’) 16S rRNA primer çifti kullanıldı ve 662 bp’lik bantlar pozitif olarak kabul edildi. Genotipik doğrulama için 10XPCR buffer (2,5 µl), MgCl₂ (3 µl), primer (her bir primer için 0.25 µl), deoksiniükleotit trifosfat (dNTP) (0,5 µl) ve Taq polimeraz (0,3

µl) ve 13,2 µl steril distile su içeren karışım 5 µl hedef DNA ile toplam hacim 25 µl olacak şekilde PCR karışımı hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 95°C’de 2 dak ilk denatürasyon, 35 siklus 94°C’de 45 sn denatürasyon, 57°C’de 45 sn bağlanma, 72°C’de 45 sn uzama ve son siklustan sonra 72°C’de 10 dakika son uzama aşaması şekilde gerçekleştirildi.

Amplifiye edilmiş PCR ürünü yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra, 10 µL alınıp etidyum bromür (2µg/ml) içeren % 1,5’lik agaroz jel kuyularına yüklendi. Jel, 60 dakika boyunca 150 voltta jel elektroforezine tabi tutuldu ve ultraviyole (UV) transillüminatör kullanılarak görüntülendi. Amplikonların boyutunun belirlenmesi ve hedeflenen amplikon boyutlarını (662 bp) oluşturup oluşturmadıklarının değerlendirilmesi için DNA Marker (Thermo Scientific, SM0241, 100 bp DNA Ladder) kullanıldı. *E. coli* ATCC 25922 suşu pozitif kontrol olarak kullanılırken hedef DNA içermeyen karışım ise negatif kontrol olarak kullanıldı.

3.4. Antibiyotik Dirençlilik Tespiti

3.4.1. Disk Difüzyon Metodu

İzolatların sık kullanılan antibiyotik sınıflarını temsil edecek şekilde seçilen ampisilin (AMP;10 µg), gentamisin (CN;10 µg), kloromfenikol (C;30 µg), tetrasiklin (TE;30 µg), sefalotin (KF;30 µg), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT;1,25/23,75 µg), streptomisin (S;10 µg) ve enrofloksasin (ENR;5 µg) antibiyotik disklerinden (Bioanalysis, Türkiye) oluşturulan 8 farklı antibiyotiğe dirençlilik/duyarlılık durumlarının belirlenmesinde Kirby-Bauer standart disk difüzyon testi kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesi CLSI (2015, 2018, 2020) kılavuzunda belirtilen kriterlere göre yapıldı. Bu amaçla standart antibiyotik disklere duyarlılığı belirlenecek bakteri kültüründen birkaç koloni alınarak BHI broth (Oxoid, İngiltere) tüplerine ekildi. Tüpler 5-6 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben kültürün bulanıklığı, McFarland 0.5 standart bulanıklığına göre ayarlandı. Taze sıvı kültürlerinden 100 µl alınarak MHA (Oxoid, İngiltere) besiyerinin tüm yüzeyine yayma ekim yapıldı. Standart antibiyotik diskler 120x120 mm’lik pleytlere steril forseps yardımı ile aseptik olarak yerleştirilerek besiyerleri ile teması sağlandı. Pleytlar aerobik koşullarda 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan zon çapları ölçülerek sefalotin CLSI (2015), enrofloksasin CLSI (2018) ve diğer antibiyotikler CLSI (2020) kriterlerine göre standart değerlerle

karşılaştırılarak yorumlandı. Böylece sonuçlar duyarlı (S), orta derecede duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak değerlendirildi. Kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı. Üç veya daha fazla farklı antibiyotik grubuna dirençli bulunan bakteri izolatları çoklu ilaca dirençli (ÇİD) izolatlar olarak belirlendi (Magiorakos et al., 2012).

3.4.2. Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi

İzolatlarda antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi amacıyla, disk difüzyon tekniğine paralel olarak seçilen ve sık kullanılan antibiyotiklere karşı dirençlilik genleri, spesifik primerler kullanılarak simpleks ve multipleks PCR (mPCR) ile araştırıldı. Bu amaçla ampisilin (*CITM*), gentamisin (*aac[3]-IV*), kloromfenikol (*cat1* ve *cmlA*), tetrasiklin (*tetA*, *tetB*, *tetC*), sefalotin (*bla_{SHV}*), sülfanomid (*sul1*, *sul2* ve *sul3*), streptomisin (*aadA1*) ve florokinolon (*qnrA*, *qnrB* ve *qnrS*) direnç genlerini belirlemek için daha önceki çalışmalarda (Chanawong et al., 2000; Pérez and Hanson, 2002; Cattoir et al., 2007; Kozak et al., 2009; Shahrani et al., 2014) belirtilen PCR protokolleri modifiye ve optimize edilerek kullanıldı (Tablo 3.1 ve Tablo 3.2).

Direnç genlerinin pozitif kontrolleri için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan ve ilgili genlere sahip olduğu bilinen *E. coli* suşları kullanıldı. Sülfanomid direncini (*sul1*, *sul2* ve *sul3*) belirlemeye yönelik yapılan mPCR çalışmasında 13,85 µl steril distile su, 5 µl hedef DNA, 2,5 µl MgCl₂, 2,5 µl 10x PCR buffer, 0,5 µl dNTP, 0,3 µl Taq polimeraz ve Tablo 3.1’de belirtilen son primer konsantrasyonlarından oluşan toplam 25 µl karışım kullanıldı. mPCR kullanılarak tespit edilen *sul1*, *sul2* ve *sul3* genleri için PCR amplifikasyon koşulları 95°C’de 15 dk ön denatürasyon, 95°C’de 1 dk denatürasyon, 66°C’de 1 dk bağlanma ve 72°C’de 1 dk uzama olmak üzere 30 sikludan ve 72°C’de 10 dk final uzamadan oluşturuldu (Kozak et al., 2009).

Tetrasiklin direnç genlerinin (*tetA*, *tetB* ve *tetC*) belirlenmesi amacıyla 8,9 µl steril distile su, 7 µl hedef DNA, 3 µl MgCl₂, 2,5 µl 10x PCR buffer, 2,5 µl dNTP, 0,3 µl Taq Polimeraz ve Tablo 3.1’de belirtilen son primer konsantrasyonlarından oluşan 25 µl karışım kullanılarak mPCR yapıldı. Bu genler için PCR amplifikasyon koşulları 94°C’de 15 dk ön denatürasyon, 94°C’de 1 dk denatürasyon, 58°C’de 1 dk bağlanma ve 72°C’de 1 dk uzama olmak üzere 35 sikludan ve 72°C’de 10 dk final uzama şeklinde oluşturuldu (Kozak et al., 2009).

Diğer bir mPCR çalışmasında ise florokinolon direnç genlerinin (*qnrA*, *qnrB* ve *qnrS*) tespiti hedeflendi. Bu amaçla mPCR; 15 µl steril distile su, 5 µl hedef DNA, 1,5 µl MgCl₂, 2,5 µl 10x PCR buffer, 0,55 µl dNTP, 0,3 µl Taq Polimeraz ve Tablo 3.1’de belirtilen son primer konsantrasyonlarından oluşan 25 µl karışımda yapıldı. mPCR kullanılarak tespit edilen *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* genleri için PCR amplifikasyon koşulları 95°C’de 5 dk ön denatürasyon, 95°C’de 1 dk denatürasyon, 59°C’de 1 dk bağlanma ve 72°C’de 1 dk uzama olmak üzere 35 siklusedan ve 72°C’de 5 dk final uzamadan oluşturuldu (Cattoir et al., 2007).

Gentamisin (*aac[3]-IV*), kloromfenikol (*cat1* ve *cmlA*) ve streptomisin (*aadA1*) direncini belirlemeye yönelik mPCR çalışmasında 16 µl steril distile su, 2,5 µl hedef DNA, 2,5 µl MgCl₂, 2,5 µl 10x PCR buffer, 0,3 µl dNTP, 0,2 µl Taq Polimeraz ve Tablo 3.1’de belirtilen son primer konsantrasyonlarından oluşan toplam 25 µl karışım kullanıldı. Bu genlerin tespiti amacıyla yapılan PCR amplifikasyon koşulları 94°C’de 8 dk ön denatürasyon, 95°C’de 1 dk denatürasyon, 55°C’de 1 dk 10 sn bağlanma ve 72°C’de 2 dk uzama olmak üzere 32 siklusedan ve 72°C’de 8 dk final uzama şeklinde oluşturuldu (Shahrani et al., 2014).

Ampisilin (*CITM*) direncini belirlemeye yönelik PCR çalışmasında 4,76 µl steril distile su, 5 µl hedef DNA, 10 µl Amplitaq gold 360 master mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) ve Tablo 3.1’de belirtilen son primer konsantrasyonlarından oluşan toplam 20 µl karışım kullanıldı. PCR kullanılarak tespit edilen CITM geni için PCR amplifikasyon koşulları 94°C’de 3 dk ön denatürasyon, 94°C’de 30 sn denatürasyon, 64°C’de 30 sn bağlanma ve 72°C’de 1 dk uzama olmak üzere 25 siklusedan ve 72°C’de 7 dk final uzama aşamalarından oluşturuldu (Pérez-Pérez and Hanson, 2002).

Sefalotin (*bla_{SHV}*) direnç geninin tespiti amacıyla yapılan PCR çalışmasında ise 17,1 µl steril distile su, 2 µl hedef DNA, 2,5 µl MgCl₂, 2,5 µl 10x PCR buffer, 0,2 µl dNTP, 0,1 µl dream taq DNA Polimeraz (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) ve Tablo 3.1’de belirtilen son primer konsantrasyonlarından oluşan 25 µl karışım kullanıldı. *bla_{SHV}* geni için PCR amplifikasyon koşulları 94°C’de 5 dk ön denatürasyon, 94°C’de 30 sn denatürasyon, 62°C’de 30 sn bağlanma ve 72°C’de 30 sn uzama olmak üzere 30 siklusedan ve 72°C’de 5 dk final uzamasından oluşturuldu (Chanawong et al., 2000).

Amplifiye edilmiş PCR ürünleri yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra,

mikropipet ile karışımdan 10 µL alınıp etidyum bromür (2µg/ml) içeren % 1,5'lik agaroz jel kuyularına yüklendi. Jel elektroforezinin ardından ultraviyole (UV) transillüminatör kullanılarak görüntülendi.

Tablo 3.1. Antibiyotik direnç genlerinin tespitinde kullanılan PCR bileşenlerinin konsantrasyonu

PCR Malzemeleri ve Konsantrasyonları (µl)									
Hedef Gen	Steril distile su	10X PCR Buffer	MgCl ₂ (25 mM)	dNTP (10 mM)	Primer Kons. (100 µM stok)		Taq Polimeraz (5 U)	Hedef DNA	Toplam hacim
					İleri	Geri			
<i>sul1</i>					0,05	0,05			
<i>sul2</i>	13,85	2,5	2,5	0,5	0,075	0,075	0,3	5	25
<i>sul3</i>					0,05	0,05			
<i>tet (A)</i>					0,05	0,05			
<i>tet (B)</i>	8,9	2,5	3	2,5	0,1	0,1	0,3	7	25
<i>tet (C)</i>					0,25	0,25			
<i>qnr(A)</i>					0,025	0,025			
<i>qnr(B)</i>	15	2,5	1,5	0,55	0,025	0,025	0,3	5	25
<i>qnr(S)</i>					0,025	0,025			
<i>bla_{SHV}</i>	17,1	2,5	2,5	0,2	0,3	0,3	0,1 (dream taq)	2	25
<i>CITM</i>	4,76	1x Master Mix (10)			0,12	0,12	-	5	20
<i>aadA1</i>					0,125	0,125			
<i>aac[3]-IV</i>					0,125	0,125			
<i>cat1</i>	16	2,5	2,5	0,3	0,125	0,125	0,2	2,5	25
<i>cmlA</i>					0,125	0,125			

Tablo 3.2. Antibiyotik direnç genlerinin tespitinde kullanılan primerler ve PCR koşulları

Antibiyotik Grubu	Hedef Gen	Primer	Nükleotid sekans (5'-3')	Ürün (bp)
<i>Ampisilin</i>	<i>CITM</i>	<i>CITM-F</i>	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462
		<i>CITM-R</i>	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	
<i>Tetrasiklin</i>	<i>tetA</i>	<i>TetA-L</i>	GGCGGTCTTCTTCATCATGC	502
		<i>TetA-R</i>	CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA	
	<i>tetB</i>	<i>TetBGK-F2</i>	CGCCCAGTGCTGTTGTTGTC	173
		<i>TetBGK-R2</i>	CGCGTTGAGAAGCTGAGGTG	
	<i>tetC</i>	<i>TetC-L</i>	GCTGTAGGCATAGGCTTGGT	888
		<i>TetC-R</i>	GCCGGAAGCGAGAAGAATCA	
<i>Sülfanomid</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1-F</i>	CGGCGTGGGCTACCTGAACG	433
		<i>sul1-B</i>	GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	
	<i>sul2</i>	<i>sulIII-L</i>	CGGCATCGTCAACATAACCT	721
		<i>sulIII-R</i>	TGTGCGGATGAAGTCAGCTC	
	<i>sul3</i>	<i>sul3-GKa-F</i>	CAACGGAAGTGGGCGTTGTGGA	244
		<i>sul3-GKa-R</i>	GCTGCACCAATTCGCTGAACG	
<i>Florokinolon</i>	<i>qnr(A)</i>	<i>QnrAm-F</i>	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580
		<i>QnrAm-R</i>	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	
	<i>qnr(B)</i>	<i>QnrBm-F</i>	GGMATHGAAATTCGCCACTG	264
		<i>QnrBm-R</i>	TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA	
	<i>qnr(S)</i>	<i>QnrSm-F</i>	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428
		<i>QnrSm-R</i>	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	
<i>Sefalotin</i>	<i>blaSHV</i>	<i>SHV-F</i>	AAGATCCACTATCGCCAGCAG	768
		<i>SHV-R</i>	ATTCAGTTCCGTTTCCCACCGG	
<i>Gentamicin</i>	<i>aac[3]-IV</i>	<i>aac[3]-IV-F</i>	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT	111
		<i>aac[3]-IV-R</i>	TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	
<i>Streptomisin</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA1-F</i>	TATCCAGCTAAGCGCGAACT	447
		<i>aadA1-R</i>	ATTTGCCGACTACCTTGGTC	
<i>Kloramfenikol</i>	<i>cat1</i>	<i>cat1-F</i>	AGTTGCTCAATGTACCTATAACC	547
		<i>cat1-R</i>	TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	
<i>Kloramfenikol</i>	<i>cmlA</i>	<i>cmlA-F</i>	CCGCCACGGTGTGTTGTTATC	698
		<i>cmlA-R</i>	CACCTTGCCTGCCCATCATTAG	

3.5. Serotip Dağılımının Belirlenmesi

İzolatlar, neonatal septisemili buzağılarda sık görülen O101, O9, O26, O145 ve O111 serotip genlerinin belirlenmesi amacıyla spesifik primerler kullanılarak multipleks PCR (mPCR) ile araştırıldı. Bu amaçla serotip genlerinin belirlenmesi için daha önceki çalışmalarda (Liu et al., 2009; Shahrani et al., 2014) belirtilen PCR protokolleri modifiye ve optimize edilerek kullanıldı (Tablo 3.3 ve Tablo 3.4).

O101 ve O9 genlerinin tespiti amacıyla 21,8 µl steril distile su, 5 µl hedef DNA, 1 µl MgCl₂, 1 µl 10x PCR buffer, 0,7 µl dNTP, 0,1 µl Taq Polimeraz ve Tablo 3.3'de belirtilen son primer konsantrasyonlarından oluşan toplam 30 µl karışım kullanıldı. mPCR kullanılarak tespit edilen O101 ve O9 genleri için PCR amplifikasyon koşulları 95°C'de 10 dk ön denatürasyon, 95°C'de 30 sn denatürasyon, 50°C'de 45 sn bağlanma ve 72°C'de 1 dk 10 sn uzama olmak üzere 30 sikludan ve 72°C'de 5 dk final uzama aşamalarından oluşturuldu (Liu et al., 2009). O26, O145 ve O111 genlerinin tespiti amacıyla yapılan mPCR çalışmasında ise 12,2 µl steril distile su, 5 µl hedef DNA, 1,5 µl MgCl₂, 2,5 µl 10x PCR buffer, 0,6 µl dNTP, 0,2 µl Taq Polimeraz ve Tablo 3.3'de belirtilen son primer konsantrasyonlarından oluşan toplam 25 µl karışım kullanıldı. O26, O145 ve O111 genleri için PCR amplifikasyon koşulları 95°C'de 1 dk ön denatürasyon, 95°C'de 20 sn denatürasyon, 56°C'de 40 sn bağlanma ve 72°C'de 30 sn uzama olmak üzere 30 sikludan ve 72°C'de 8 dk final uzama aşamalarından oluşturuldu (Shahrani et al., 2014). Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren % 1,5'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi.

Tablo 3.3. Serotip genlerinin tespitinde kullanılan PCR bileşenlerinin konsantrasyonu

PCR Malzemeleri ve Konsantrasyonları (µl)									
Hedef Gen	Steril distile su	10X PCR Buffer	MgCl ₂ (25 mM)	dNTP (10 mM)	Primer Kons. (100 µM stok)		Taq Polimeraz (5 U)	Hedef DNA	Toplam hacim
					İleri	Geri			
O9	21,8	1	1	0,7	0,05	0,05	0,1	5	30
O101					0,15	0,15			
O26	12,2	2,5	1,5	0,6	0,5	0,5	0,2	5	25
O145					0,5	0,5			
O111					0,5	0,5			

Tablo 3.4. Serotip genlerinin tespitinde kullanılan primerler ve PCR koşulları

Serotip	Primer	Nükleotid sekans (5'–3')	Ürün (bp)	Kaynak
O9	wzt-F	TGGGTGTTAAAAGACATCAA	1142	(Liu et al., 2009)
	wzt-R	CCCAGAAATCCATGCTC		
O101	wzm-F	GTGTTACTTTCATATCGTCCAG	507	
	wzm-R	ATGCAATGCGGTTTCTAC		
O26	wzx-F	CAGAATGGTTATGCTACTGT	423	(Shahrani et al., 2014)
	wzx-R	CTTACATTTGTTTTCGGCATC		
O145	wzx-F	CCATCAACAGATTTAGGAGTG	609	
	wzx-R	TTTCTACCGCGAATCTATC		
O111	wzx-F	TAGAGAAATTATCAAGTTAGTTCC	406	
	wzx-R	ATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC		

3.6. Virulens Genlerin Belirlenmesi

İzolatlarda, neonatal septisemide rol alan enterotoksijenik virulens genlerin belirlenmesi amacıyla simpleks ve multipleks PCR çalışmaları yapıldı. F41, F5 (K99), F17c, STa, LT-II ve EAST1 virulens genleri Tablo 3.5 ve Tablo 3.6'da belirtilen spesifik primerler kullanılarak incelendi. Virulens genlerinin belirlenmesi amacıyla daha önceki çalışmalarda (Güler et al., 2008; Zajacova et al., 2012; Shahrani et al., 2014; Umpiérrez et al., 2016) bildirilen PCR protokolleri modifiye ve optimize edilerek kullanıldı.

F5 geninin tespiti için 14,55 µl steril distile su, 5 µl hedef DNA, 2,25 µl MgCl₂, 2,5 µl 10x PCR buffer, 0,2 µl dNTP, 0,1 µl Taq Polimeraz ve Tablo 3.5'te belirtilen son primer konsantrasyonlarından oluşan toplam 25 µl karışım kullanıldı. F5 geninin tespiti amacıyla yapılan PCR amplifikasyon koşulları 94°C'de 4 dk ön denatürasyon, 94°C'de 1 dk denatürasyon, 50°C'de 1 dk bağlanma ve 72°C'de 1 dk uzama olmak üzere 30 sikludan ve 72°C'de 5 dk final uzama aşamalarından oluşturuldu (Umpiérrez et al., 2016).

F17c virulens geninin tespiti amacıyla 14,6 µl steril distile su, 5 µl hedef DNA, 2 µl MgCl₂, 2,5 µl 10x PCR buffer, 0,5 µl dNTP, 0,15 µl Taq Polimeraz ve Tablo 3.5'te belirtilen son primer konsantrasyonlarını içeren toplam 25 µl karışım

oluşturuldu. PCR karışımı, 95 °C’de 3 dk 6n denat6rasyonu takiben, 94 °C’de 1 dk denat6rasyon, 56 °C’de 45 s primer baēlanma, 72 °C ‘de 1 dk uzama olmak 6zere 34 siklus ve 72 °C’de 10 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu (Shahrani et al., 2014).

LT-II virulens geninin tespiti amacıyla yapılan diēer bir PCR 6alışmasında ise 17,65 µl steril distile su, 2,5 µl hedef DNA, 1,5 µl MgCl₂, 2,5 µl 10x PCR buffer, 0,5 µl dNTP, 0,1 µl Taq Polimeraz ve Tablo 3.5’te belirtilen son primer konsantrasyonlarından oluşan toplam 25 µl karışım kullanıldı. PCR kullanılarak tespit edilen *LT-II* geni i6in PCR amplifikasyon koşulları 94°C’de 6 dk 6n denat6rasyon, 95°C’de 50 sn denat6rasyon, 56°C’de 1 dk 10 sn baēlanma ve 72°C’de 50 sn uzama olmak 6zere 34 siklusdan ve 72°C’de 6 dk final uzama aşamalarından oluşturuldu (Shahrani et al., 2014).

EAST1 virulens geni i6in ise Zajacova vd. (2012) bildirdikleri PCR protokol6 modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. Bu ama6la yapılan PCR 6alışmasında 17,4 µl steril distile su, 5 µl hedef DNA, 2,5 µl Amplitaq gold 360 master mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) ve Tablo 3.5’te belirtilen son primer konsantrasyonlarından oluşan toplam 25 µl karışım kullanıldı. PCR karışımı, 94 °C’de 3 dk 6n denat6rasyonu takiben, 94 °C’de 40 sn denat6rasyon, 55 °C’de 2 dk baēlanma, 72 °C ‘de 3 dk uzama olmak 6zere 30 siklus ve 72 °C’de 3 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

STa ve *F41* virulens genlerinin tespiti amacıyla ger6ekleştirilen mPCR 6alışmasında 34,85 µl steril distile su, 5 µl hedef DNA, 3 µl MgCl₂, 5 µl 10x PCR buffer, 0,9 µl dNTP, 0,25 µl Taq Polimeraz ve Tablo 3.5’te belirtilen son primer konsantrasyonlarından oluşan toplam 50 µl karışım kullanıldı. mPCR kullanılarak tespit edilen *STa* ve *F41* genleri i6in PCR koşulları 94 °C’de 3 dk 6n denat6rasyonu takiben, 94 °C’de 30 s denat6rasyon, 50 °C’de 45 s baēlanma, 70 °C ‘de 1.5 dk uzama olmak 6zere 25 siklus ve 70 °C’de 10 dk final uzama aşamalarından oluşturuldu (G6ler et al., 2008).

Tablo 3.5. Virulens genlerinin tespitinde kullanılan PCR bileşenlerinin konsantrasyonu

PCR Malzemeleri ve Konsantrasyonları (µl)									
Hedef Gen	Steril distile su	10X PCR Buffer	MgCl ₂ (25 mM)	dNTP (10 mM)	Primer Kons. (100 µM stok)		Taq Polimeraz (5 U)	Hedef DNA	Son hacim
					İleri	Geri			
<i>F5</i>	14,55	2,5	2,25	0,2	0,2	0,2	0,1	5	25
<i>F17</i>	14,6	2,5	2	0,5	0,125	0,125	0,15	5	25
<i>LT-II</i>	17,65	2,5	1,5	0,5	0,125	0,125	0,1	2,5	25
<i>STa</i>	34,85	5	3	0,9	0,25	0,25	0,25	5	50
<i>F41</i>					0,25	0,25			
<i>EAST 1</i>	17,4	1x Master Mix (2,5)			0,05	0,05	-	5	25

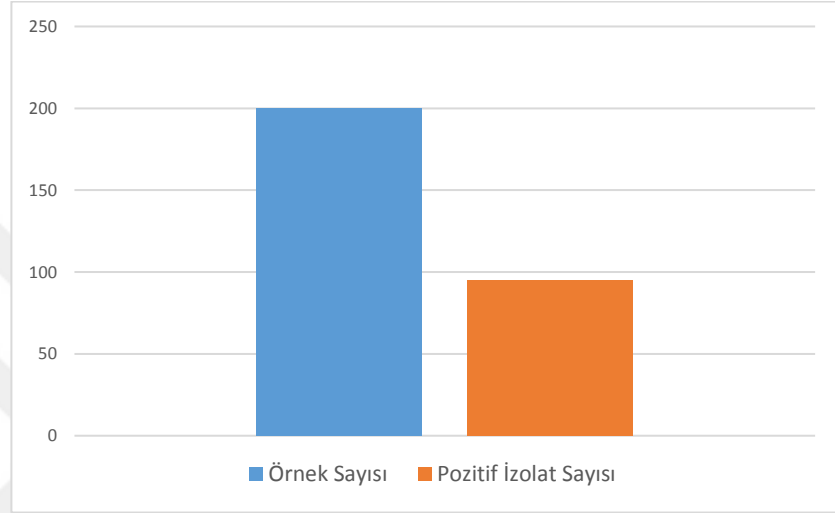
Tablo 3.6. Virulens genlerinin tespitinde kullanılan primerler ve PCR koşulları

Virulens Gen	Primer	Nükleotid sekans (5'-3')	Ürün (bp)	Kaynak
<i>F5</i>	<i>K99-F</i>	TATTATCTTAGGTGGTATGG	314	(Umpiérre z et al., 2016)
	<i>K99-R</i>	GGTATCCTTTAGCAGCAGAGTATTTTC		
<i>F41</i>	<i>F41-F</i>	GCATCAGCGGCAGTATCT	380	(Güler et al., 2008)
	<i>F41-R</i>	GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT		
<i>F17c</i>	<i>F17c-F</i>	GCAGGAACCGCTCCCTTGGC	416	(Shahrani et al., 2014)
	<i>F17c-R</i>	CAACTAACGGGATGTACAGTTTC		
<i>STa</i>	<i>STa-F</i>	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA	190	(Güler et al., 2008)
	<i>STa-R</i>	AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA		
<i>LT-II</i>	<i>LTII-F</i>	GCACACGGAGCTCCTCAGTC	218	(Shahrani et al., 2014)
	<i>LTII-R</i>	TCCTTCATCCTTTCAATGGCTTT		
<i>EAST1</i>	<i>east 11a</i>	CCATCAACACAGTATATCCGA	111	(Zajacova et al., 2012)
	<i>east 11b</i>	GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT		

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Kars ve ilçelerindeki 10 günlükten küçük neonatal sepsisemili buzağılardan alınan 200 dışkı örneğinden fenotipik olarak karakterize edilen 95 (% 47,5) *E. coli* izolatının PCR ile doğrulaması sırasında, tüm izolatlar 662 bp bant ile tespit edildi ve *E. coli* olarak doğrulandı (Şekil 4.1).



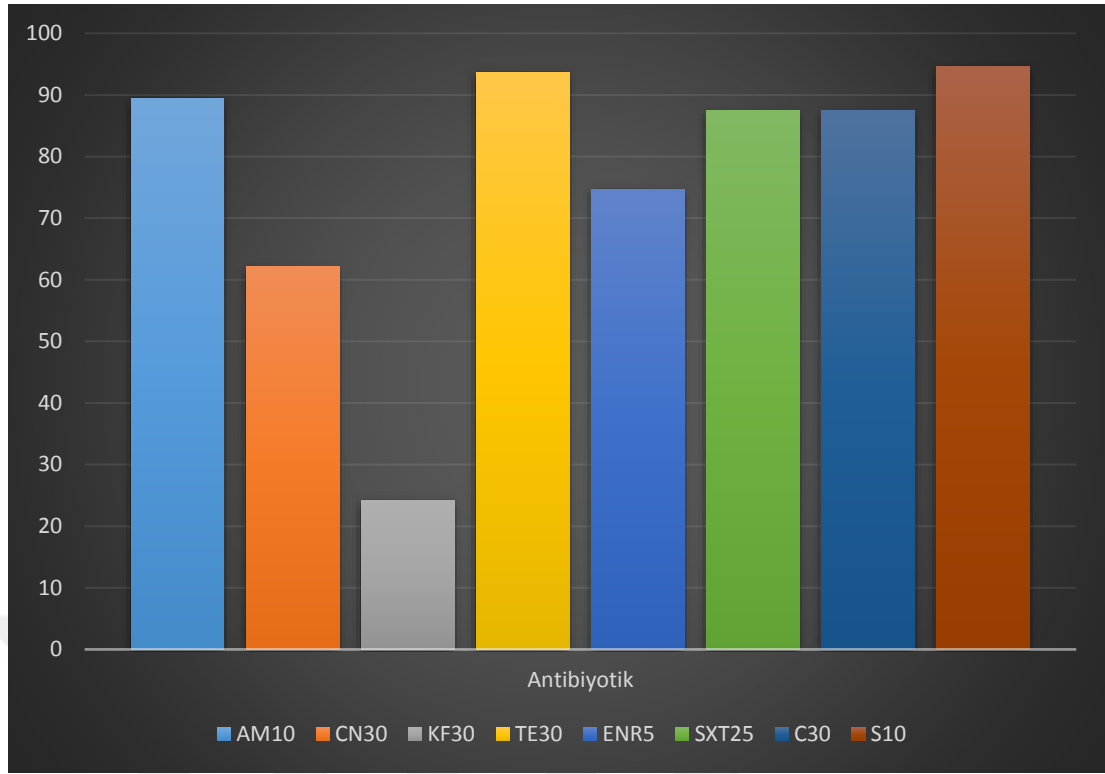
Şekil 4.1. Fenotipik ve genotipik olarak izole ve identifiye edilen *E. coli* sayısı

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Kirby-Bauer standart disk difüzyon testiyle yapılan fenotipik antibiyotik direnç analizine göre izolatların 90'ı (% 94,7) streptomisine, 89'u (% 93,7) tetrasikline, 85'i (% 89,5) ampisiline, 83'ü (% 87,4) trimetoprim-sulfametoksazole, 83'ü (% 87,4) kloromfenikole, 71'i (% 74,7) enrofloksasine, 59'u (% 62,1) gentamisine ve 23'ü (% 24,2) de sefalotine karşı dirençli bulundu (Tablo 4.1, Şekil 4.2). *E. coli* izolatlarının antibiyotik dirençlilik profilleri Tablo 4.2.'de sunuldu. Orta duyarlılar, dirençli olarak kabul edildi.

Tablo 4.1. *E. coli* izolatlarının antibiyotik dirençlilik/duyarlılık oranları

Antibiyotik	Dirençlilik Oranı	Duyarlılık Oranı
AM10	85 (% 89,5)	10 (% 10,5)
CN10	59 (% 62,1)	36 (% 37,9)
KF30	23 (% 24,2)	72 (% 75,8)
TE30	89 (% 93,7)	6 (% 6,3)
ENR5	71 (% 74,7)	24 (% 25,3)
SXT25	83 (% 87,4)	12 (% 12,6)
C30	83 (% 87,4)	12 (% 12,6)
S10	90 (% 94,7)	5 (% 5,3)



Şekil 4.2. *E. coli* izolatlarının antibiyotik dirençlilik oranları (%)

Tablo 4.2. *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri

Sayı	İzolat No	AM10	CN10	KF30	TE30	ENR5	SXT25	C30	S10
1	4	R	R	S	R	R	R	R	R
2	5	R	R	R	R	R	R	R	R
3	7	R	S	R	R	R	R	R	R
4	11	R	R	S	R	R	R	R	R
5	12	R	R	R	R	R	R	R	R
6	13	R	R	S	R	R	R	R	R
7	14	R	R	S	R	R	R	R	R
8	16	R	R	S	R	R	R	R	R
9	19	S	R	S	R	S	R	R	R
10	20	R	S	S	R	S	R	R	R
11	21	R	S	R	R	S	R	R	R
12	23	R	R	R	R	R	R	R	R
13	24	R	R	S	R	R	R	R	R
14	25	R	S	S	R	S	R	R	R
15	27	R	S	S	R	S	R	R	R
16	28	R	S	S	R	S	R	R	R
17	29	R	S	R	R	R	R	R	R
18	30	R	R	S	R	R	R	R	R
19	33	R	R	R	R	R	R	R	R
20	37	R	R	S	R	R	R	R	R
21	38	R	R	S	R	R	R	R	R
22	39	R	R	R	R	R	R	R	R
23	43	R	S	S	R	S	R	R	R
24	44	R	R	R	R	R	R	R	R
25	45	R	R	S	R	S	R	R	R
26	46	R	R	R	R	R	R	R	R
27	48	R	R	S	R	R	R	R	R

Tablo 4.2. (devamı)

28	49	R	R	S	R	R	R	R	R
29	50	R	R	S	S	R	R	R	R
30	55	R	S	S	R	R	R	R	R
31	56	S	S	S	R	S	S	R	R
32	57	R	S	S	R	S	S	R	R
33	58	R	R	S	R	R	R	R	R
34	59	R	R	S	R	R	R	R	R
35	61	R	S	S	R	R	R	R	R
36	63	R	R	S	R	R	R	R	R
37	64	R	R	S	R	R	R	R	R
38	66	R	R	S	R	R	R	R	R
39	67	R	R	S	R	R	R	R	R
40	68	R	R	S	R	R	R	R	R
41	69	R	R	S	R	R	R	R	R
42	70	R	R	S	R	R	R	R	R
43	75	R	S	S	R	R	R	R	R
44	76	R	S	S	R	R	R	S	R
45	78	R	S	S	R	R	R	R	R
46	79	R	R	S	R	R	R	R	R
47	85	S	S	S	R	S	S	S	S
48	86	S	S	S	R	S	S	S	S
49	88	R	S	S	R	R	R	R	R
50	89	S	S	S	S	S	R	S	S
51	91	R	R	S	R	R	R	R	R
52	94	R	S	S	R	R	R	R	R
53	95	R	R	R	S	R	R	R	R
54	97	R	R	S	R	R	R	R	R
55	99	R	S	S	R	S	R	S	R
56	101	S	R	S	R	R	R	R	R
57	103	R	S	S	R	R	R	R	R
58	104	R	S	S	R	R	R	R	R
59	105	R	S	S	R	R	R	R	R
60	109	R	R	S	R	R	R	R	R
61	110	R	S	S	R	R	R	S	R
62	111	R	S	S	R	R	R	R	R
63	112	R	R	S	R	R	R	R	R
64	113	R	S	S	R	R	S	R	R
65	115	R	R	S	S	R	R	R	R
66	116	R	S	S	R	R	R	R	R
67	119	S	S	S	R	R	S	R	R
68	120	R	S	S	R	S	R	S	R
69	124	R	S	S	R	S	R	S	R
70	126	S	R	S	R	R	R	R	R
71	132	S	S	S	S	S	S	S	S
72	135	R	R	R	R	R	R	R	R
73	136	R	R	S	R	R	R	R	R
74	137	R	R	R	R	R	S	R	R
75	138	R	R	R	S	R	R	R	R
76	139	R	R	R	R	R	R	R	R
77	140	R	R	R	R	R	R	R	R
78	142	R	R	S	R	R	R	R	R
79	143	R	S	S	R	S	R	R	R
80	144	R	R	S	R	S	R	R	R
81	145	S	R	S	R	S	R	R	R
82	146	R	S	S	R	S	S	S	S
83	147	R	S	S	R	S	S	S	R

Tablo 4.2. (devamı)

84	148	R	R	R	R	R	R	R	R
85	149	R	R	R	R	S	R	R	R
86	150	R	R	S	R	R	R	R	R
87	151	R	R	R	R	R	R	R	R
88	152	R	R	S	R	R	R	R	R
89	153	R	R	R	R	R	R	R	R
90	154	R	S	S	R	S	S	S	R
91	155	R	R	R	R	R	R	R	R
92	156	R	R	R	R	R	R	R	R
93	157	R	R	S	R	R	R	R	R
94	158	R	R	S	R	R	R	R	R
95	159	R	R	R	R	R	R	R	R

AM10: Ampisilin (10 µg), CN10: Gentamisin (10 µg), KF30: Sefalotin (30 µg), TE30: Tetrasiklin (30 µg), ENR5: Enrofloksasin (5 µg), SXT25: Trimetoprim-sülfametoksazol (25 µg), C30: Kloromfenikol (30 µg), S10: Streptomisin (10 µg)

İzolatların çoklu antibiyotik dirençlilikleri değerlendirildiğinde 95 *E. coli* izolatının 90'ının (% 94,7) üç ve daha fazla antibiyotik grubuna (ÇİD) direnç gösterdiği belirlendi. Çoklu antibiyotik dirençliliği saptanan 90 izolatın 16'sı (% 17,8) sekiz, 37'si (% 41,1) yedi, 18'i (% 20) altı, 13'ü (% 14,4) beş, 3'ü (% 3,3) dört ve 3'ü (% 3,3) de üç farklı antibiyotiğe birlikte dirençli bulundu (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. *E. coli* izolatlarının çoklu antibiyotik dirençlilik sonuçları

Antibiyotik Direnç Profili	Antibiyotik sayısı	İzolat sayısı (%)
AM-CN-KF-TE-ENR-SXT-C-S	8	16 (17.8)
AM-CN-TE-ENR-SXT-C-S		31
AM-KF-TE-ENR-SXT-C-S		2
AM-CN-KF-ENR-SXT-C-S	7	2
AM-CN-KF-TE-SXT-C-S		1
AM-CN-KF-TE-ENR-C-S		1
Toplam		37 (41.1)
AM-TE-ENR-SXT-C-S		11
AM-CN-ENR-SXT-C-S		2
AM-CN-SXT-C-S	6	2
CN-TE-ENR-SXT-C-S		2
AM-KF-TE-SXT-C-S		1
Toplam		18 (20)
AM-TE-SXT-C-S		7
AM-TE-ENR-SXT-S	5	2
AM-TE-SXT-C-S		2
CN-TE-SXT-C-S		2
Toplam		13 (14.4)

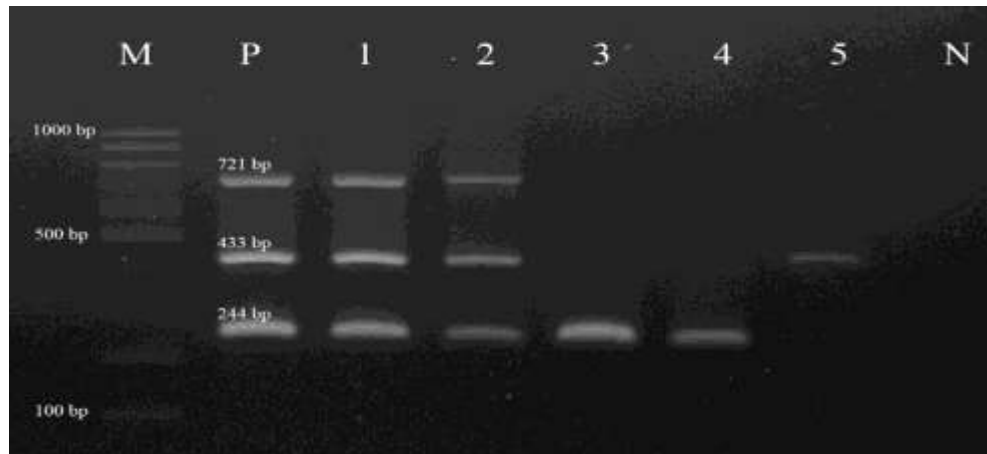
Tablo 4.3. (devamı)

AM-TE-SXT-S	4	2
TE-ENR-C-S		1
Toplam		3 (3.3)
AM-TE-S	3	2
TE-C-S		1
Toplam		3 (3.3)
TOPLAM		90 (94.7)*
AM-TE	2	1
*3 ve daha fazla antibiyotiğe dirençli izolat sayısı		

AM10: Ampisilin (10 µg), CN10: Gentamisin (10 µg), KF30: Sefalotin (30 µg), TE30: Tetrasiklin (30 µg), ENR5: Enrofloksasin (5 µg), SXT25: Trimetoprim-sülfametoksazol (25 µg), C30: Kloromfenikol (30 µg), S10: Streptomisin (10 µg)

4.3. Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Toplam 95 adet *E. coli* izolatı sülfanomid direnç genleri açısından incelendiğinde *sul1*, *sul2* ve *sul3* izolatların sırasıyla 64 (% 67,4), 51 (% 53,7) ve 71'inde (% 74,7) belirlendi (Şekil 4.3). Sülfanomid direnç genlerinin çoğu kombine halde bulundu. 60 izolatta *sul1* ve *sul2*, 41 izolatta *sul1* ve *sul3*, 43 izolatta *sul2* ve *sul3*, 39 izolatta ise *sul1*, *sul2* ve *sul3* genleri birlikte tespit edildi.



Şekil 4.3. Sülfonamid direncine neden olan *sul1* (433 bp), *sul2* (721 bp) ve *sul3* (244 bp) genlerinin mPCR ile belirlenmesi (M: Marker (Thermo Scientific, SM0241, 100 bp DNA Ladder), P: Pozitif Kontrol, N: Negatif Kontrol, 1 ve 2: *sul1*, *sul2* ve *sul3*, 3 ve 4: *sul3*, 5: *sul1*)

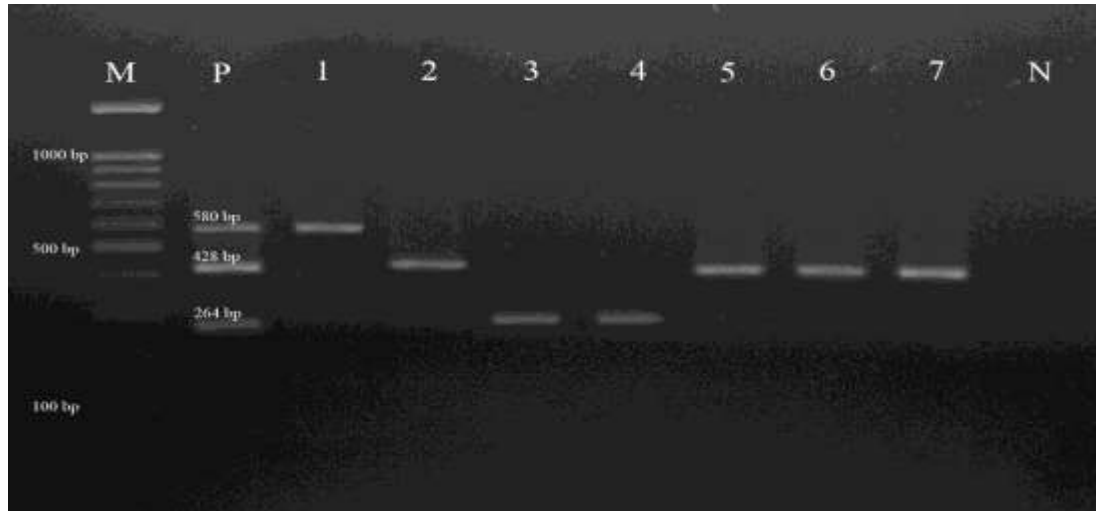
İzolatlar tetrasiklin direnç geni varlığı yönünden araştırıldığında *tet(A)*, *tet(B)* ve *tet(C)* genleri sırasıyla 52 (% 54,7), 84 (% 88,4) ve 5 (% 5,3) izolatta tespit edildi (Şekil 4.4). Tetrasiklin direnç genleri mPCR ile tespit edilen izolatlardan 50'sinin *tet(A)* ve

tet(B), 4'ünün *tet(A)* ve *tet(C)*, 4'ünün *tet(B)* ve *tet(C)*, 3'ünün *tet(A)*, *tet(B)* ve *tet(C)* genlerini ortak olarak taşıdığı belirlendi.



Şekil 4.4. Tetrasiklin direncine neden olan *tet(A)* (502 bp), *tet(B)* (173 bp) ve *tet(C)* (888 bp) genlerinin mPCR ile belirlenmesi (M: Marker (Thermo Scientific, SM0241, 100 bp DNA Ladder), P: Pozitif Kontrol, N: Negatif Kontrol, 1, 5, 6, 7: *tet(A)*, *tet(B)* ve *tet(C)* 2 ve 3: *tet(A)* ve *tet(B)*)

Florokinolon direnç belirleyicileri ile ilgili olarak izolatların 1'inde (% 1,05) *qnr(A)*, 54'ünde (% 56,8) *qnr(B)* ve 25'inde (% 26,3) *qnr(S)* saptanırken, 15 izolatın *qnr(B)* ve *qnr(S)* için ortak olduğu belirlendi. Öte yandan *qnr(A)* direnç genine sahip olan izolatın *qnr(B)* ve *qnr(S)* genlerini de taşıdığı tespit edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Florokinolon direncine neden olan *qnr(A)* (580 bp), *qnr(B)* (264 bp) ve *qnr(S)* (428 bp) genlerinin mPCR ile belirlenmesi [M: Marker (Thermo Scientific, SM0241, 100 bp DNA Ladder), P: Pozitif Kontrol, N: Negatif Kontrol, 1: *qnr(A)*, 2, 5-7: *qnr(S)*, 3,4: *qnr(B)*]

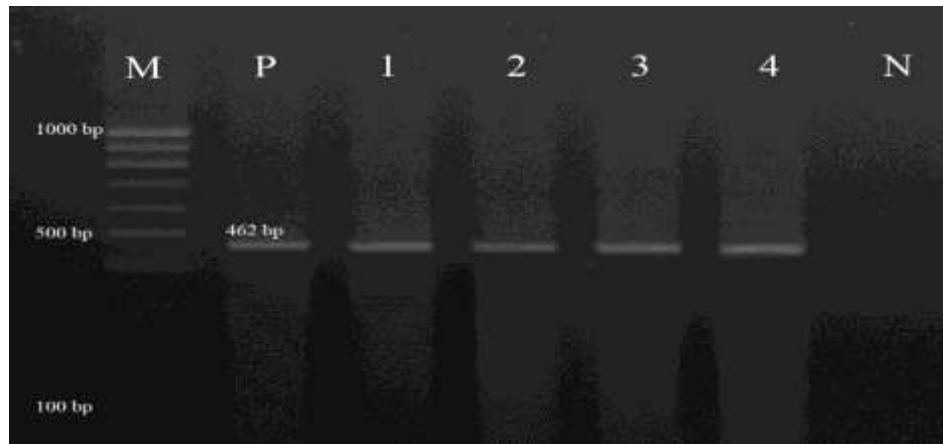
Gentamisin direncine neden olan *aac[3]-IV*, streptomisin direncine neden olan *aadA1* ve kloramfenikol direncine neden olan *cmlA* ve *cat1* genleri mPCR ile incelendiğinde izolatların 12'sinin (% 12,6) *aac[3]-IV*, 35'inin (% 36,8) *aadA1*,

58'inin (% 61) *cmlA* ve 27'sinin (% 28,4) *cat1* genleri yönünden pozitif olduğu tespit edildi. 19 izolatın *cmlA* ve *cat1* direnç genlerini ortak olarak taşıdığı belirlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Gentamisin direncine neden olan *aac[3]-IV* (111 bp), streptomisin direncine neden olan *aadA1* (447 bp), kloramfenikol direncine neden olan *cmlA* (698) ve *cat1* (547 bp) genlerinin mPCR ile belirlenmesi (M: Marker (Thermo Scientific, SM0241, 100 bp DNA Ladder), P: Pozitif Kontrol, N: Negatif Kontrol, 1: *cmlA*, *cat1* ve *aac[3]-IV*, 2: *cat1*, 3 ve 4: *cmlA* ve *cat1*)

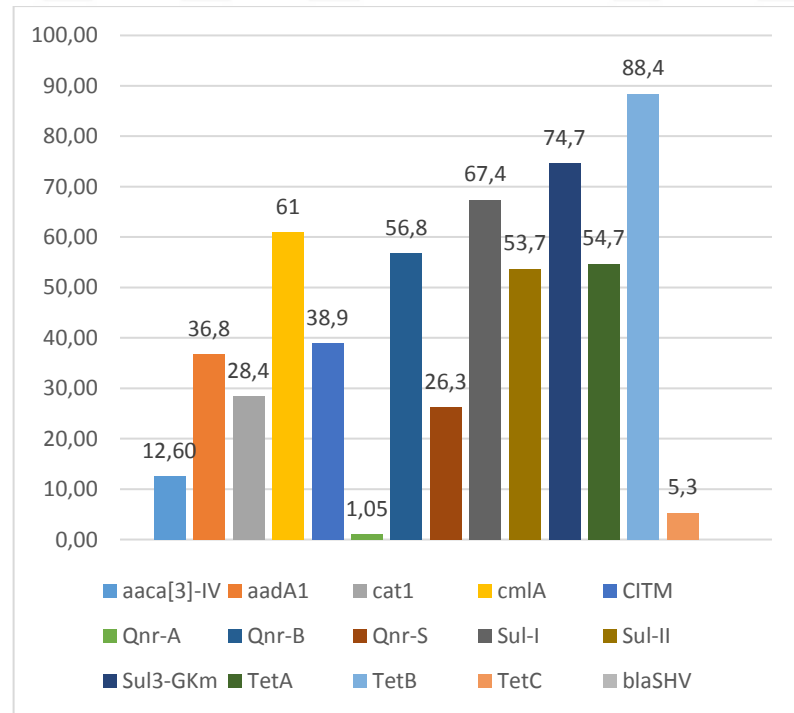
İzolatların ampisilin direncine neden olan *CITM* gen varlığı değerlendirildiğinde 37 izolatın (% 38,9) bu geni taşıdığı ortaya kondu (Şekil 4.7). İzolatların hiçbirinde *blaSHV* geni tespit edilemedi. *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç geni oranları Tablo 4.4'te, *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç geni varlığı Şekil 4.8'de sunuldu. *E. coli* izolatlarının fenotipik ve genotipik antibiyotik dirençlilik durumları Tablo 4.5'te gösterildi.



Şekil 4.7. Ampisilin direncine neden olan *CITM* (462 bp) geninin PCR ile belirlenmesi (M: Marker (Thermo Scientific, SM0241, 100 bp DNA Ladder), P: Pozitif Kontrol, N: Negatif Kontrol, 1,2,3,4: *CITM*)

Tablo 4.4. *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç geni oranları

Antibiyotik	Direnç Geni	Pozitif Gen Oranı
Gentamisin	<i>aaca[3]-IV</i>	12 (%12.6)
Streptomisin	<i>aadA1</i>	35 (%36.8)
Kloramfenikol	<i>cat1</i>	27 (%28.4)
	<i>cmlA</i>	58 (%61)
Ampisilin	<i>CITM</i>	37 (%38.9)
Enrofloksasin	<i>Qnr-A</i>	1 (%1.05)
	<i>Qnr-B</i>	54 (%56.8)
	<i>Qnr-S</i>	25 (%26.3)
Trimetoprim-sulfametoksazol	<i>Sul-I</i>	64 (%67.4)
	<i>Sul-II</i>	51 (%53.7)
	<i>Sul3-GKm</i>	71 (%74.7)
Tetrasiklin	<i>TetA</i>	52 (%54.7)
	<i>TetB</i>	84 (%88.4)
	<i>TetC</i>	5 (%5.3)
Sefalotin	<i>blaSHV</i>	0



Şekil 4.8. *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç geni varlığı (%)

Tablo 4.5. İzolatların antibiyotik direncinin fenotipik ve genotipik olarak birlikte incelenmesi

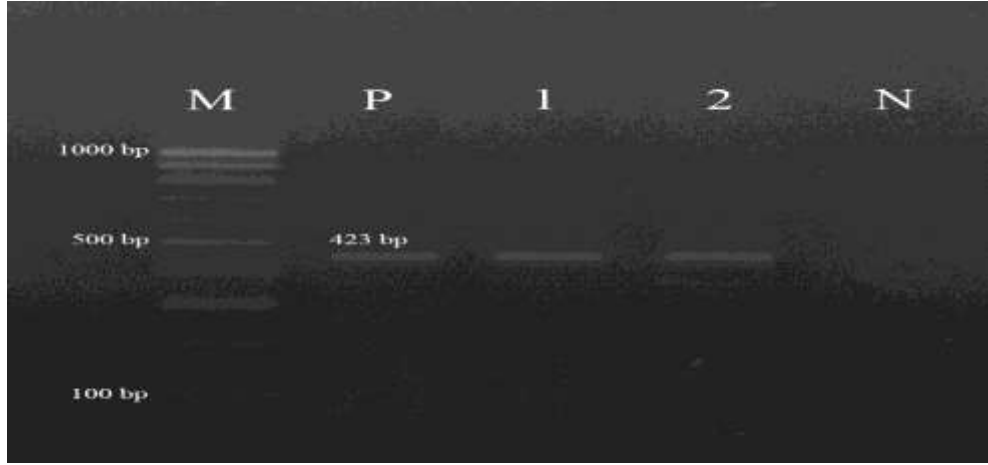
Antibiyotik / Direnç Geni		Pozitif Gen Oranı	Fenotipik Dirençlilik Oranı
Gentamisin	<i>aaca[3]-IV</i>	12 (%12,6)	59 (%62,1)
Streptomisin	<i>aadA1</i>	35 (%36,8)	90 (% 94,7)
Kloramfenikol	<i>cat1</i>	27 (%28,4)	83 (%87,4)
	<i>cmlA</i>	58 (%61)	
Ampisilin	<i>CITM</i>	37 (%38,9)	85 (%89,5)
Enrofloksasin	<i>Qnr-A</i>	1 (%1,05)	71 (%74,7)
	<i>Qnr-B</i>	54 (%56,8)	
	<i>Qnr-S</i>	25 (%26,3)	
Trimetoprim-sulfametoksazol	<i>Sul-I</i>	64 (%67,4)	83 (%87,4)
	<i>Sul-II</i>	51 (%53,7)	
	<i>Sul3-GKm</i>	71 (%74,7)	
Tetrasiklin	<i>TetA</i>	52 (%54,7)	89 (%93,7)
	<i>TetB</i>	84 (%88,4)	
	<i>TetC</i>	5 (%5,3)	
Sefalotin	<i>blaSHV</i>	0	23 (%24,2)

4.4. Serotip Genlerinin Belirlenmesi

Patojenitede önemli rol oynayan serotiplerin genotipik olarak belirlenmesi amacıyla yapılan genoserotiplendirme sonucunda; izolatlardan 32'sinin (% 33,7) *O101* (Şekil 4.9), 6'sının (% 6,3) *O26* (Şekil 4.10), 2'sinin (% 2,1) de *O145* serotipi olduğu tespit edildi. Hiçbir izolatta *O111* ve *O9* serotipi saptanamazken, 55 izolatın (% 57,9) test edilen serotiplerin tamamı yönünden negatif olduğu görüldü (Tablo 4.6).



Şekil 4.9. *O101* (507 bp) geninin PCR ile belirlenmesi (M: Marker (Thermo Scientific, SM0241, 100 bp DNA Ladder), P: Pozitif Kontrol, N: Negatif Kontrol, 1, 2 ve 3: *O101*)



Şekil 4.10. O26 (423 bp) geninin PCR ile belirlenmesi (M: Marker (Thermo Scientific, SM0241, 100 bp DNA Ladder), P: Pozitif Kontrol, N: Negatif Kontrol, 1 ve 2: O26)

Tablo 4.6. *E. coli* izolatlarının serotiplendirme (genotipik) sonuçları

İzolat No	Serotip (Genotipik)				
	O101	O145	O26	O9	O111
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
19	-	-	+	-	-
20	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-
28	-	-	+	-	-
29	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
33	-	-	+	-	-
37	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-
44	+	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-
46	-	+	-	-	-
48	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-
50	+	-	-	-	-
55	+	-	-	-	-
56	+	-	+	-	-
57	-	-	+	-	-
58	+	-	-	-	-
59	+	-	+	-	-
61	+	-	-	-	-

Tablo 4.6. (devamı)

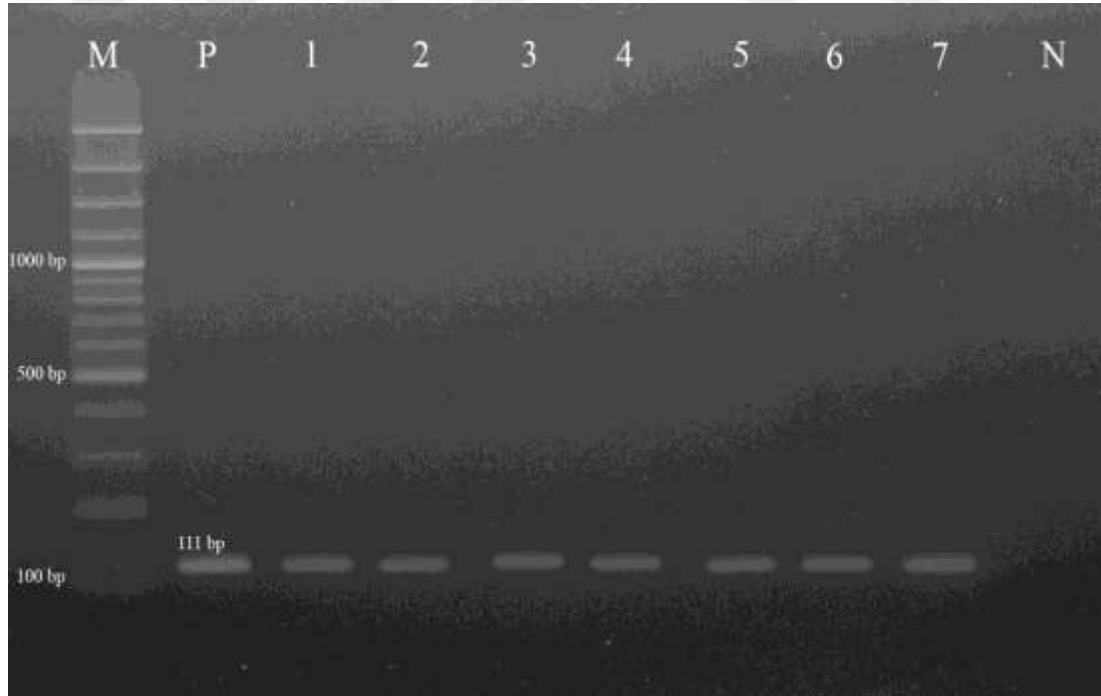
İzolot No	Serotip (Genotipik)				
	O101	O145	O26	O9	O111
63	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-
66	+	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-
68	+	-	-	-	-
69	+	-	-	-	-
70	+	-	-	-	-
75	+	-	-	-	-
76	+	-	-	-	-
78	-	+	-	-	-
79	+	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-
91	-	-	-	-	-
94	+	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-
97	-	-	-	-	-
99	+	-	-	-	-
101	-	-	-	-	-
103	-	-	-	-	-
104	-	-	-	-	-
105	-	-	-	-	-
109	-	-	-	-	-
110	-	-	-	-	-
111	-	-	-	-	-
112	+	-	-	-	-
113	-	-	-	-	-
115	+	-	-	-	-
116	-	-	-	-	-
119	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-
124	-	-	-	-	-
126	+	-	-	-	-
132	+	-	-	-	-
135	-	-	-	-	-
136	-	-	-	-	-
137	-	-	-	-	-
138	-	-	-	-	-
139	+	-	-	-	-
140	-	-	-	-	-
142	+	-	-	-	-
143	+	-	-	-	-
144	+	-	-	-	-
145	+	-	-	-	-
146	+	-	-	-	-
147	+	-	-	-	-
148	-	-	-	-	-
149	+	-	-	-	-
150	-	-	-	-	-
151	-	-	-	-	-
152	-	-	-	-	-
153	+	-	-	-	-

Tablo 4.6. (devamı)

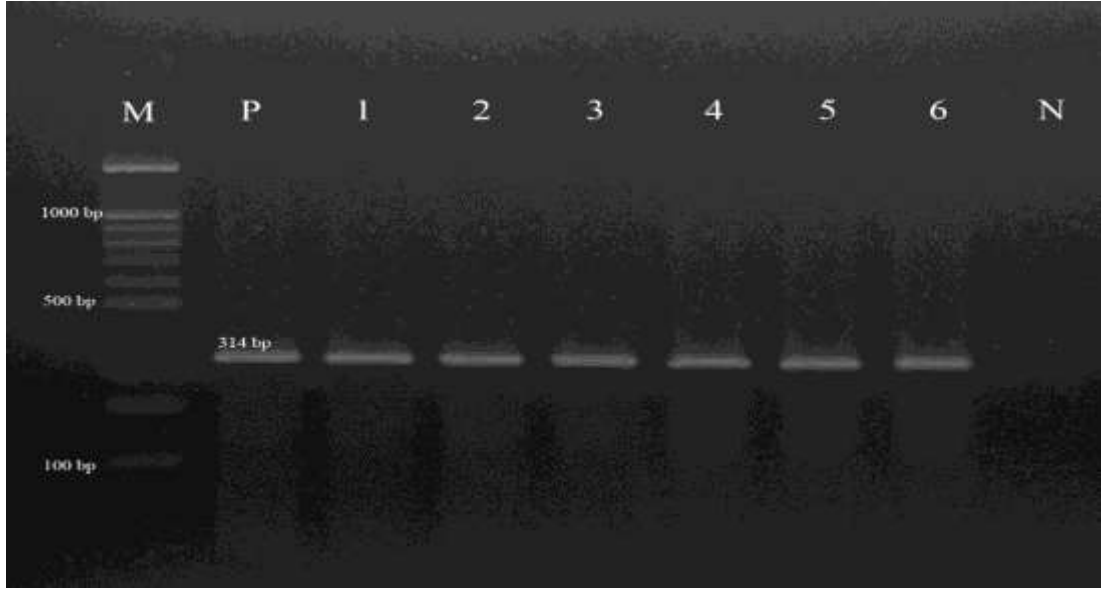
İzolat No	Serotip (Genotipik)				
	O101	O145	O26	O9	O111
154	+	-	-	-	-
155	-	-	-	-	-
156	-	-	-	-	-
157	-	-	-	-	-
158	-	-	-	-	-
159	-	-	-	-	-
Toplam	31 (%32.6)	2 (%2.1)	6 (%6.3)	0 (%0)	0 (%0)

4.5. Virulens Genlerin Belirlenmesi

Virülens genlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan tekli ve çoklu PCR çalışmaları sonucunda; 22 (% 23,2) izolatın *East1* (Şekil 4.11), 21 izolatın (% 22,1) *F5* (Şekil 4.12), 19 izolatın (% 20) *STa*, 17 izolatın (% 17,9) *F41* (Şekil 4.13) ve 3 izolatın (% 3,2) da *LT* geni taşıdığı tespit edildi. İzolatların hiçbirinde *F17c* geni tespit edilemedi (Tablo 4.7). Virulens genlerinin izolatlarda tekli veya kombine halde bulunduğu belirlendi. *E. coli* izolatlarına ait tekli ve çoklu virülens gen profilleri (virotip dağılımı) Tablo 4.8’de sunuldu. Diğer yandan *E. coli* izolatlarında virülens gen profili ve test edilen antibiyotiklere dirençlilik açısından pozitiflik sonuçları Tablo 4.9 ve Tablo 4.10’da gösterildi.



Şekil 4.11. *East1* (111 bp) geninin PCR ile belirlenmesi (M: Marker (Thermo Scientific, SM0241, 100 bp DNA Ladder), P: Pozitif Kontrol, N: Negatif Kontrol, 1-7: *East1*)



Şekil 4.12. *F5* (314 bp) geninin PCR ile belirlenmesi (M: Marker (Thermo Scientific, SM0241, 100 bp DNA Ladder), P: Pozitif Kontrol, N: Negatif Kontrol, 1-6: *F5*)



Şekil 4.13. *STa* (190 bp) ve *F41* (380 bp) genlerinin mPCR ile belirlenmesi (M: Marker (Thermo Scientific, SM0241, 100 bp DNA Ladder), P: Pozitif Kontrol, N: Negatif Kontrol, 1-5: *STa* ve *F41*, 6-12: *STa*)

Tablo 4.7. *E. coli* izolatlarının virulens gen sonuçları

İzolat No	<i>F5</i>	<i>EAST1</i>	<i>LT</i>	<i>STA</i>	<i>F41</i>	<i>F17</i>
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.7. (devamı)

İzolasyon No	F5	EAST1	LT	STA	F41	F17
23	-	-	-	-	-	-
24	-	+	-	-	-	-
25	-	+	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-
30	-	+	-	-	-	-
33	-	+	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-
48	-	+	-	-	-	-
49	+	-	-	+	+	-
50	+	-	-	+	+	-
55	+	-	-	+	+	-
56	+	+	-	-	-	-
57	+	+	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	+	+	-
61	+	-	-	+	+	-
63	+	-	-	+	+	-
64	+	-	-	+	+	-
66	+	-	-	+	+	-
67	+	+	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-
79	+	-	-	+	+	-
85	-	-	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-	-
88	-	+	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-	-
91	+	+	-	+	+	-
94	-	-	-	+	+	-
95	-	-	-	-	-	-
97	+	-	-	+	+	-
99	-	-	-	-	-	-
101	-	-	-	-	-	-
103	-	-	+	-	-	-
104	-	-	-	-	-	-
105	+	-	+	+	+	-
109	+	-	+	+	+	-
110	-	-	-	-	-	-
111	-	-	-	-	-	-
112	-	+	-	-	-	-
113	-	-	-	-	-	-
115	+	-	-	+	+	-
116	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.7. (devamı)

İzolot No	F5	EAST1	LT	STA	F41	F17
119	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-
124	+	-	-	-	-	-
126	+	-	-	+	+	-
132	-	-	-	-	-	-
135	-	-	-	-	-	-
136	-	+	-	-	-	-
137	+	-	-	+	-	-
138	-	+	-	-	-	-
139	-	-	-	-	-	-
140	-	-	-	-	-	-
142	-	-	-	-	-	-
143	-	-	-	-	-	-
144	-	-	-	-	-	-
145	-	+	-	-	-	-
146	-	+	-	-	-	-
147	-	-	-	-	-	-
148	-	+	-	-	-	-
149	-	+	-	-	-	-
150	-	+	-	-	-	-
151	-	+	-	-	-	-
152	-	-	-	-	-	-
153	-	+	-	+	-	-
154	+	-	-	-	-	-
155	-	-	-	-	-	-
156	-	+	-	-	-	-
157	-	-	-	-	-	-
158	+	-	-	+	+	-
159	-	+	-	-	-	-
Toplam (n=95)	21(%22.1)	22(%23.2)	3(%3.2)	19(%20)	17(%17.9)	0(%0)

Tablo 4.8. *E. coli* izolatlarının tekli ve çoklu virulens gen profilleri (virotip)

Virülens Gen Profili	Gen Sayısı	İzolot sayısı (%)
<i>F5,F41,STa,LT</i>	4	2 (%2,1)
<i>F5, F41,STa,EAST1</i>		1 (%1)
<i>F5,F41,STa</i>	3	12 (%12,6)
<i>F5,EAST1</i>	2	3 (%3,1)
<i>STa,F41</i>		2 (%2,1)
<i>F5,STa</i>		1 (%1)
<i>STa, EAST1</i>		1 (%1)
<i>EAST1</i>	1	17 (%17,9)
<i>F5</i>		2 (%2,1)
<i>LT</i>		1 (%1)

Tablo 4.9. İzolatların virotipine göre antibiyotik dirençlik sonuçları

Virülens Geni	Dirençli İzolat Sayısı							
	AM10	CN10	KF30	TE30	ENR5	SXT25	C30	S10
<i>EAST1 (17)</i>	16	14	7	16	13	16	16	16
<i>F5,F41,STa (12)</i>	11	10	0	10	12	12	12	12
<i>F5,EAST1 (3)</i>	2	1	0	3	1	1	3	3
<i>F5,F41,STa,LT (2)</i>	2	1	0	2	2	2	2	2
<i>STa,F41 (2)</i>	2	1	0	2	2	2	2	2
<i>F5 (2)</i>	2	0	0	2	0	1	0	2
<i>F5, F41,STa,EAST1 (1)</i>	1	1	0	1	1	1	1	1
<i>STa, EAST1 (1)</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>F5,STa (1)</i>	1	1	1	1	1	0	1	1
<i>LT (1)</i>	1	0	0	1	1	1	1	1

Tablo 4.10. İzolatların virulens gen profillerine göre antibiyotik dirençlik sonuçları

Virülens gen profili (Pozitif izolat sayısı)	İzolat No	ANTİBİYOTİKLER*							
		AM10	CN10	KF30	TE30	ENR5	SXT25	C30	S10
<i>East1 (17)</i>	24	+	+	-	+	+	+	+	+
	25	+	-	-	+	-	+	+	+
	30	+	+	-	+	+	+	+	+
	33	+	+	+	+	+	+	+	+
	48	+	+	-	+	+	+	+	+
	88	+	-	-	+	+	+	+	+
	112	+	+	-	+	+	+	+	+
	136	+	+	-	+	+	+	+	+
	138	+	+	+	-	+	+	+	+
	145	-	+	-	+	-	+	+	+
	146	+	-	-	+	-	-	-	-
	148	+	+	+	+	+	+	+	+
	149	+	+	+	+	-	+	+	+
	150	+	+	-	+	+	+	+	+
	151	+	+	+	+	+	+	+	+
	156	+	+	+	+	+	+	+	+
	159	+	+	+	+	+	+	+	+
Toplam Dirençli İzolat Sayısı		16	14	7	16	13	16	16	16
<i>F5,F41,STa (12)</i>	İzolat No	AM10	CN10	KF30	TE30	ENR5	SXT25	C30	S10
	49	+	+	-	+	+	+	+	+
	50	+	+	-	-	+	+	+	+
	55	+	-	-	+	+	+	+	+
	61	+	-	-	+	+	+	+	+
	63	+	+	-	+	+	+	+	+
	64	+	+	-	+	+	+	+	+
	66	+	+	-	+	+	+	+	+
	79	+	+	-	+	+	+	+	+
	97	+	+	-	+	+	+	+	+
	115	+	+	-	-	+	+	+	+
	126	-	+	-	+	+	+	+	+
	158	+	+	-	+	+	+	+	+

Tablo 4.10. (devamı)

Toplam Dirençli İzolat Sayısı		11	10	0	10	12	12	12	12
<i>F5, EAST1</i> (3)	İzolat No	AM10	CN10	KF30	TE30	ENR5	SXT25	C30	S10
	56	-	-	-	+	-	-	+	+
	57	+	-	-	+	-	-	+	+
	67	+	+	-	+	+	+	+	+
Toplam Dirençli İzolat Sayısı		2	1	0	3	1	1	3	3
<i>F5,F41,STa,LT</i> (2)	İzolat No	AM10	CN10	KF30	TE30	ENR5	SXT25	C30	S10
	105	+	-	-	+	+	+	+	+
	109	+	+	-	+	+	+	+	+
Toplam Dirençli İzolat Sayısı		2	1	0	2	2	2	2	2
<i>STa,F41</i> (2)	İzolat No	AM10	CN10	KF30	TE30	ENR5	SXT25	C30	S10
	59	+	-	-	+	+	+	+	+
	94	+	+	-	+	+	+	+	+
Toplam Dirençli İzolat Sayısı		2	1	0	2	2	2	2	2
<i>F5</i> (2)	İzolat No	AM10	CN10	KF30	TE30	ENR5	SXT25	C30	S10
	124	+	-	-	+	-	+	-	+
	154	+	-	-	+	-	-	-	+
Toplam Dirençli İzolat Sayısı		2	0	0	2	0	1	0	2
<i>F5, F41,STa,EAST1</i> (1)	İzolat No	AM10	CN10	KF30	TE30	ENR5	SXT25	C30	S10
	91	+	+	-	+	+	+	+	+
Toplam Dirençli İzolat Sayısı		1	1	0	1	1	1	1	1
<i>STa, EAST1</i> (1)	İzolat No	AM10	CN10	KF30	TE30	ENR5	SXT25	C30	S10
	153	+	+	+	+	+	+	+	+
Toplam Dirençli İzolat Sayısı		1	1	1	1	1	1	1	1
<i>F5,STa</i> (1)	İzolat No	AM10	CN10	KF30	TE30	ENR5	SXT25	C30	S10
	137	+	+	+	+	+	-	+	+
Toplam Dirençli İzolat Sayısı		1	1	1	1	1	0	1	1
<i>LT</i> (1)	İzolat No	AM10	CN10	KF30	TE30	ENR5	SXT25	C30	S10
	103	+	-	-	+	+	+	+	+
Toplam Dirençli İzolat Sayısı		1	0	0	1	1	1	1	1

*Dirençli izolatlar +, Duyarlı izolatlar - olarak gösterildi.

5. TARTIŞMA

ETEC, insanlarda turist ishaline (Al-Abri et al., 2005), yeni doğan çiftlik hayvanlarında ise ciddi dehidrasyon ve elektrolit dengesizliği nedeniyle ölümle sonuçlanabilen sulu ishalleri neden olmaktadır (Çabalar vd., 2001; Picco et al., 2015). ETEC, insanlarda ve çiftlik hayvanlarında koliform kökenli ishallerde en sık görülen etkindir (Nagy and Fekete, 2005; Gülhan vd., 2009a). ETEC enfeksiyonlarının patogeneğinde en önemli virülens faktörleri fimbrial adhezinler ve enterotoksinlerdir (Gülhan vd., 2009b). Buzağılarda neonatal sepsisemiye neden olan ETEC enfeksiyonlarında en sık tespit edilen virulens faktörleri F5 (K99), F17 (FY), F41, ST, labil toksin LT ve enteroagregatif stabil toksin 1 (EAST-1)'dir (Kaper et al., 2004). Buzağı *E. coli* enfeksiyonlarında sık görülen serotipler ise O157, O26, O103, O111, O145, O45, O91, O113, O121, O128, O8, O9 ve O101'dir (Dubreuil et al., 2016).

Antibiyotiklere dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar, insan ve hayvan sağlığı için artan bir tehdit oluşturmaktadır (Wernli et al., 2011). Antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin bakteriler tarafından kısa sürede gerçekleşmesi, patojenik bakterilerin % 70'inin en az bir antibiyotiğe dirençli olması, yeni antibiyotiklere karşı direnç gelişim riski ve bu ilaçların maliyeti nedeniyle bakterilerle mücadele oldukça zorlaşmıştır (Economou and Gousia, 2015). Artan antibiyotik direnci nedeniyle tüm Dünya'da her yıl yaklaşık 700.000 kişi hayatını kaybetmektedir (Woolhouse et al., 2016). 2050 yılına kadar bu sayının yaklaşık 10 milyon olacağı tahmin edilmektedir (O'Neill, 2016). Ayrıca bu dirençli bakteriler nedeniyle çiftlik hayvanlarında oluşan enfeksiyonlar sonucu görülen verim kaybı, ilaç masrafları ve hatta ölümler nedeniyle ekonomik kayıp oldukça yüksek orandadır (Algammal et al., 2020).

Günümüzde dünyanın farklı yerlerinde buzağılardan elde edilen *E. coli* izolatlarında yüksek oranda görülen antibiyotik direnci önemli bir sorun teşkil etmektedir (DeFrancesco et al., 2004; Sato et al., 2005; Duse et al., 2015). Buzağılardan elde edilen dirençli *E. coli* izolatları bu nedenle aynı ekosistemde bulunan diğer bakteriler için önemli direnç genleri kaynağı olabilmektedir (Donaldson et al., 2006; Di Labio et al., 2007). Genel olarak, genç buzağuların dışkıyla saçtıkları dirençli *E. coli* prevalansı, buzağular daha önce antimikrobiyallerle tedavi edilmemiş olsa bile yüksektir (Khachatryan et al., 2004; de Verdier et al., 2012; Duse et al., 2015).

Bu çalışmada neonatal sepsisemiye neden olan buzağı *E. coli* izolatlarının sık kullanılan antibiyotiklere karşı fenotipik ve genotipik direnç paternleri ile izolatlarının sık görülen serotip ve virülans genleri araştırıldı. Fenotipik antibiyotik testinin sonuçlarına göre streptomisin (% 94,7), tetrasiklin (% 93,7), ampisilin (% 89,5), trimetoprim-sulfametoksazol (% 87,4), kloromfenikol (% 87,4), enrofloksasin (% 74,7) ve gentamisine (% 62,1) karşı yüksek oranda antibiyotik dirençliliği saptandı. *E. coli* izolatlarında antibiyotik direnç gen varlığı değerlendirildiğinde ise izolatların % 88,4'ünde *tet(B)*, % 74,7'sinde *sul3*, % 67,4'ünde *sul1*, % 61'inde *cmlA*, % 56,8'inde *qnr(B)*, % 54,7'sinde *tet(A)*, % 53,7'sinde *sul2*, % 38,9'unda *CITM*, % 36,8'inde *aadA1*, % 28,4'ünde *cat1*, % 26,3'ünde *qnr(S)*, % 12,6'sında *aac[3]-IV*, % 5,3'ünde *tet(C)* ve % 1,05'inde *qnr(A)* genleri belirlendi. İzolatların hiçbirinde *blaSHV* geni tespit edilemedi. Değerlendirilen izolatların % 94,7'si çoklu antibiyotik dirençli bulundu. Benzer bir sonuç, Konya'dan % 77,3 (Güler vd., 2008) ve Erzurum'dan % 71,4 (Cengiz ve Adiguzel, 2020) oranında çoklu ilaca dirençli *E. coli* izolatı bildiren araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Bangladeş'te diyareli buzağılardan elde edilen ÇİD'e sahip *E. coli* durumunu belirleyen bir çalışmada (Haque et al., 2022), izole edilen *E. coli* suşlarının % 100'ünün ÇİD'ne sahip izolat olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, dünyanın farklı bölgelerinde % 50-% 100 (Pereira et al., 2014; Umpiérrez et al., 2017; Salaheen et al., 2019; Sobhy et al., 2020; Feuerstein et al., 2021) arasında değişen yüksek bir ÇİD oranı ve bunun aksine % 50'nin altında (de Verdier et al., 2012; Gharieb et al., 2019; Algammal et al., 2020) olan ÇİD oranı bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Çoklu antibiyotik direncindeki farklılıkların, hayvanların bakım ve besleme şartlarının farklılık göstermesinden, antibiyotik kullanım miktarından ve coğrafi konum farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada değerlendirilen fenotipik direnç oranları incelendiğinde, izolatların neredeyse tüm antibiyotiklere karşı yüksek oranda dirençli olduğu görüldü ve en yüksek dirençlilik, streptomisine (% 94,7) karşı saptandı. İran'da neonatal sepsisemili buzağılardan elde edilen *E. coli* izolatlarında yapılan geniş çaplı bir çalışmada (Shahrani et al., 2014), streptomisin direnç oranı % 98,2 olarak belirlenmiş olup yakın zamanda Mısır'da yapılan farklı bir çalışmada söz konusu direncin % 95 (Algammal et al., 2020) oranında olduğu tespit edilmiştir. Bulunan sonuçlar bu çalışmada oldukça yüksek oranda belirlenen streptomisin direnç oranıyla uyumludur.

Diğer yandan tez çalışmasında belirlenen streptomisin direnç oranı, Brezilya (% 32,4), Amerika (% 58), Kanada (% 67), İsviçre (% 50) ve Mısır'da (% 67) streptomisin direnci bildiren yakın tarihli çalışmalara (Khachatryan et al., 2004; Rigobelo et al., 2006; Gow and Waldner, 2009; de Verdier et al., 2012; Sobhy et al., 2020) göre nispeten daha yüksek bulundu. Streptomisinle ilgili direnç geni olan *aadA1* geni bu çalışmada % 36,8 olarak tespit edildi. Kanada'da yapılan bir çalışmada (Gow et al., 2008) *aadA1* direnç geni oranı % 19,2 olarak belirlenmiştir. Yakın zamanda Amerika'da yapılan bir çalışmada (Tyson et al., 2015) *aadA1* geni direnç oranı % 9,2 olarak bulunmuştur. Mısır'da yapılan bir çalışmada ise (Hakim et al., 2017) bu gen % 42,8 oranında tespit edilmiştir. İran'da çeşitli antibiyotik direnç genlerinin incelendiği bir araştırmada ise *aadA1* direnç geni oranının % 52,3 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar çalışmada buldunan direnç oranıyla uyumludur. Öte yandan *aadA1* direnç geni oranı Brezilya ve İran'da yapılan çalışmalar sonucunda (Guerra et al., 2006, Shahrani et al., 2014, Pourtaghi and Sodagari, 2016) sırasıyla % 66, % 92,7 ve % 100 olarak tespit edilmiştir. Bu araştırma sonuçlarının tez çalışmasında bulunan sonuca göre yüksek olduğu görüldü.

Bu çalışmada hayvanlarda sık kullanılan ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde oldukça önemli bir antibiyotik olan tetrasikline (OIE,2021) karşı direnç oldukça yüksek oranda (% 93,7) bulundu. Bu sonuç neonatal septisemili buzağılardan izole edilen *E. coli* izolatlarında Sudan (% 70), Amerika (% 79,2), Kanada (% 86,7), İran (% 98,1), Şili (% 64) ve Mısır'da (% 79,5) yapılan çalışmalarla (Khachatryan et al., 2004; Gow and Waldner, 2009; Shahrani et al., 2014; Ayis et al., 2015; Astorga et al., 2019; Sobhy et al., 2020) benzerlik göstermektedir. Ayrıca Türkiye'de Güler vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, % 69,3 olarak bulunan tetrasiklin direnç oranı, bu tez çalışmasında bulunan yüksek direnç oranı ile uyumludur. Öte yandan İsviçre'de yapılan bir çalışmada (de Verdier et al., 2012) buzağılardan elde edilen *E. coli* izolatlarında tetrasikline karşı direncin % 44,6 olduğu tespit edilmiş ve Çin'de Jia vd. (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmada bu oranın % 33 olduğu bildirilmiştir. Brezilya'da yapılan bir çalışmada (Rigobelo et al., 2006) % 45,7, Irak'ta yapılan başka bir çalışmada (Hasan et al., 2018) ise % 31,3 tetrasiklin direnci rapor edilmiştir. İspanya'da yakın tarihli bir araştırmada (Prieto et al., 2022) tetrasiklin direnç oranı % 29 olarak bulunmuştur. Bu çalışmaların sonuçları tez çalışmasında bulunan tetrasiklin direnç oranına göre nispeten daha düşüktür. Çalışmada izolatlar tetrasiklin direnç geni

varlığı yönünden araştırıldığında *tet(A)*, *tet(B)* ve *tet(C)* genleri sırasıyla % 54,7, % 88,4 ve % 5,3 olarak tespit edildi. Çek Cumhuriyeti'nde *tet(A)* direnç geni varlığını inceleyen araştırmacılar (Dolejska et al., 2008) çalışma sonucunda bu geni % 70 olarak bulmuştur. Brezilya'da yapılan bir araştırmada (Guerra et al., 2006) % 66 oranında *tet(A)*, % 42 oranında *tet(B)* direnç geni tespit edilmiştir. Kanada'da bir grup araştırmacının tetrasiklin direnç geni durumunu incelediği bir çalışmada (Gow et al., 2008) % 12 oranında *tet(A)*, % 68 oranında *tet(B)*, % 3,3 oranında ise *tet(C)* direnç genleri belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından yapılan farklı bir çalışmada ise (Gow and Waldner, 2009) bu oranlar sırasıyla % 17,9, % 72,6 ve % 2,8 oranında rapor edilmiştir. İran'da yapılan 2 farklı çalışmada *tet(A)* geni %49 (Shahrani et al., 2014) ve % 54,5 (Pourtaghi and Sodagari, 2016) olarak bulunurken, % 40,6 (Shahrani et al., 2014) oranında *tet(B)* direnç geni tespit edilmiştir. Yakın zamanda Amerika'da yapılan bir çalışmada (Tyson et al., 2015) *tet(A)*, *tet(B)* ve *tet(C)* direnç geni oranlarının sırasıyla % 71,1, % 22,4 ve % 21,1 olduğu ortaya konulmuştur. Çin'de yapılan bir araştırmada (Jia et al., 2022) *tet(A)* ve *tet(B)* genleri sırasıyla % 29 ve % 19 olarak bildirilmiştir.

Bu çalışmada incelenen izolatlarda bulunan yüksek direnç oranına sahip diğer bir antibiyotik ise ampisilindir (% 89,5). Çalışmada bulunan yüksek direnç oranı Türkiye'de Güler vd. (2008) tarafından bulunan yüksek direnç oranı (% 65,3) ile uyumludur. Bununla birlikte, dünyanın farklı bölgelerinde % 50-% 100 arasında değişen (Shahrani et al., 2014; Ayis et al., 2015; Gharieb et al., 2019; Sobhy et al., 2020; Jia et al., 2022) yüksek ampisilin direnç oranları bildiren çalışmalar ve % 50'nin altında olan (Khachatryan et al., 2004; de Verdier et al., 2012; Gow and Waldner, 2009; Prieto et al., 2022) nispeten daha düşük oranda ampisilin direnci bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmada izolatların ampisiline karşı antibiyotik direnç geni olan *CITM* gen varlığı incelendiğinde % 38,9 olarak bulundu. İran'da yapılan bir çalışmada (Shahrani et al., 2014) bu oran % 77 olarak tespit edilmiştir.

İzolatların tedavi amacıyla sık kullanılan diğer bir antibiyotik olan trimetoprim-sülfametaksazol direnci incelendiğinde bu çalışmada bulunan yüksek direnç oranı (% 87,4), Kars iline komşu olan Erzurum'da Cengiz ve Adıgüzel (2020) tarafından bulunan direnç oranı (% 69,9) ile uyumludur. Bu oran Konya'da yapılan başka bir çalışmada (Güler vd., 2008) % 52 olarak bulunmuştur. İran'da bir grup araştırmacı tarafından yapılan araştırmada trimetoprim sülfametaksazol oranı oldukça yüksek

oranda (% 90,3) tespit edilmiştir (Shahrani et al., 2014). Öte yandan Kanada’da yapılan bir çalışmada trimetoprim-sülfametaksazol direnç oranı % 29,2 olarak bulurken (Gow and Waldner, 2009) bu oran Brezilya’da % 43,4 (Rigobelo et al., 2006), Şili’de % 48 (Astorga et al., 2019), Mısır’da % 36,7 (Algammal et al., 2020), % 45 (Gharieb et al., 2019) ve % 43,2 (Sobhy et al., 2020) olarak rapor edilmiştir. Irak’ta Hasan vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada trimetoprim-sülfametaksazol direnci % 12,5 olarak bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında trimetoprim sülfametaksazol oranının yakın tarihli diğer çalışmalara göre nispeten daha yüksek oranda olduğu görüldü. Bu çalışmada sülfanomid direncine neden olan *sul1*, *sul2* ve *sul3* genleri izolatların sırasıyla % 67,4, % 53,7 ve % 74,7’sinde belirlendi. Çalışma ile uyumlu olarak dünyanın farklı bölgelerinde % 57,1-% 87 arasında değişen (Khachatryan et al., 2004; Guerra et al., 2006; Shahrani et al., 2014; Pourtaghi and Sodagari, 2016; Hakim et al., 2017) *sul1*, %67-81 arasında değişen (Guerra et al., 2006; Gow et al., 2008; Dolejska et al., 2008; Gow and Waldner, 2009) *sulII* genleri tespit edilen çalışmalar bulunmaktadır. Diğer yandan bu çalışmadan farklı olarak % 17,1-% 42 arasında (Guerra et al., 2006; Gow et al., 2008; Gow and Waldner, 2009; Tyson et al., 2015; Algammal et al., 2020) nispeten daha düşük oranda *sulI* geni tespit edilen çalışmalar mevcuttur. Benzer şekilde bu çalışmadan farklı olarak düşük oranda *sulIII* ve *sulIII* geni tespit edilen çalışmalar (Guerra et al., 2006; Tyson et al., 2015; Naderi et al., 2016) bulunmaktadır.

Kloramfenikol direnç oranı değerlendirildiğinde neonatal septisemili buzağılardan elde edilen izolatlarda bu oran % 87,4 olarak bulundu. DSÖ (WHO, 2019), kloramfenikolü insan sağlığı açısından "yüksek derecede önemli antimikrobiyaller" başlığı altında sınıflandırılmıştır. İran’da yapılan bir çalışmada (Shahrani et al., 2014) 830 adet diyareli buzağıdan elde edilen 630 *E. coli* izolatı çeşitli gruplara ait antibiyotik direnci yönünden değerlendirildiğinde kloramfenikol direnci % 73,8 olarak bulunmuş, bu sonuç çalışma verileri ile benzerlik göstermektedir. Sudan’da yapılan bir araştırmada (Ayis et al., 2015) bulunan % 74 oranındaki kloramfenikol direnci tez çalışmasında bulunan sonuçla uyumludur. Bununla birlikte Türkiye’de Cengiz ve Adıgüzel (2020) tarafından diyareli buzağılara ait izolatlarda yapılan diğer bir çalışmada kloramfenikol direnci % 56,4 olarak rapor edilmiştir. Öte yandan diğer çalışmalarda rapor edilen % 9,8 (Khachatryan et al., 2004), % 25,5 (Gow and Waldner, 2009) ve % 9,4 (Hasan et al., 2018) oranındaki kloramfenikol direnç oranları tez çalışmasında bulunan sonuçlara göre oldukça düşüktür. Bu çalışmada

kloramfenikol direncine neden olan *cmlA* ve *cat1* genleri mPCR ile incelendiğinde izolatların % 61 *cmlA* ve % 28,4 *cat1* genleri yönünden pozitif olduğu tespit edildi. Almanya’da yapılan bir çalışmada (Guerra et al., 2003) bulunan % 68 *cat1* ve % 36 *cmlA* genleri çalışmada bulunan sonuçla zıt şekilde farklılık göstermektedir. Aynı araştırmacıların yaptığı benzer bir çalışmada (Guerra et al., 2006) *cat1* değeri % 70 olarak tespit edilmiştir. Amerika’da bir grup araştırmacı tarafından yürütülen bir çalışmada (Tyson et al., 2015) *cat1* direnç geni % 3,9 olarak bulunurken *cmlA* geni ise % 2,6 olarak belirlenmiştir. İran’da yapılan diğer bir çalışmada (Shahrani et al., 2014) *cat1* direnç geni çalışma sonuçlarıyla uyumlu olarak % 20,3 oranında bulunurken *cmlA* direnç geni bu çalışmada bulunan sonuçtan daha düşük (% 21,9) oranda tespit edildi. Kanada’da yürütülen bir çalışmada (Gow and Waldner, 2009) bildirilen *cat1* değeri çalışma ile uyumlu olarak % 24,5 olarak rapor edilmiştir. Yakın zamanda İran’da yapılan bir çalışmada (Pourtaghi and Sodagari, 2016) bu iki direnç geni izolatlarda % 100 oranında tespit edilmiştir.

Bu çalışmada direnç oranı tespiti amacıyla incelenen diğer bir antibiyotik ise enrofloksasindir. İzolatlardaki enrofloksasin direnç oranı % 74,7 olarak tespit edildi. Genel olarak bu çalışmada bulunan enrofloksasin direnci yüzdesi (%74,7) önceki çalışmalarda bulunan % 6,3-41,3 aralığındaki direnç oranları incelendiğinde (Orden et al., 1999; Güler vd., 2008; Astorga et al., 2019; Algammal et al., 2020, Jia et al., 2022; Prieto et al., 2022) nispeten yüksek olduğu görüldü. Ancak, bulgularla uyumlu olduğu tespit edilen diğer çalışmalarda, % 100 (Hasan et al., 2018), % 52,6 (Cengiz ve Adıgüzel, 2020) ve % 61,4 (Shahrani et al., 2014) gibi yüksek enrofloksasin direnci rapor edilmiştir. Tez çalışmasında enrofloksasin antibiyotiklerin dahil olduğu bir grup olan florokinolon direnç belirleyicileri ile ilgili yapılan mPCR çalışmasında izolatların 1’inde (% 1,05) *qnr(A)*, 54’ünde (% 56,8) *qnr(B)* ve 25’inde (% 26,3) *qnr(S)* saptanırken, 15 izolatın *qnr(B)* ve *qnr(S)* için ortak olduğu belirlendi. Öte yandan *qnr(A)* direnç genine sahip olan izolatın *qnr(B)* ve *qnr(S)* genlerini de taşıdığı tespit edildi. İran’da yapılan yakın tarihli bir araştırmada (Pourtaghi and Sodagari, 2016) yalnızca *qnr(A)* direnç geni araştırılarak % 9 oranında tespit edilmiştir. Öte yandan Vietnam’da buzağı kaynaklı izolatlarda yapılan bir çalışmada (Hang et al., 2019) *qnr(S)* direnç geni % 21 oranında tespit edilirken *qnr(A)* ve *qnr(B)* direnç genlerinin hiçbir izolatta bulunmadığı raporlanmıştır. Türkiye’de yapılan bir çalışmada ise (Cengiz vd., 2012) *qnr(A)* direnç geni % 0,8, *qnr(S)* direnç geni ise % 2,5 oranında

rapor edilirken hiçbir izolatın *qnr(B)* direnç genine sahip olmadığı bildirilmiştir. Çin’de yapılan yakın tarihli bir araştırmada (Jia et al., 2022) *qnr(S)* direnç geni % 9,5 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada izolatların antibiyotik dirençlilik durumunun belirlenmesi amacıyla incelenen, hayvanlarda sık kullanılan ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde oldukça önemli diğer bir antibiyotik olan gentamisine karşı direnç %62,1 olarak tespit edildi. Bu sonucun neonatal septisemili buzağılardan izole edilen *E. coli* izolatlarında İran (% 79,7), Mısır (% 95), Sudan (% 96,7), Irak (% 100) ve İspanya’da (% 93) yapılan çalışmalardan (Khachatryan et al., 2004; Gow and Waldner, 2009; Shahrani et al., 2014; Ayis et al., 2015; Astorga et al., 2019; Hasan et al., 2018; Sobhy et al., 2020) nispeten daha düşük olduğu, Brezilya (% 21,4), Kanada (% 1,9), Şili (% 9), Mısır (% 20) ve Çin’de (% 38) yapılan çalışmalarda bulunan (Khachatryan et al., 2004; Gow and Waldner, 2009; Shahrani et al., 2014; Astorga et al., 2019; Sobhy et al., 2020) değerlerden ise daha yüksek olduğu tespit edildi. Ülkemizde ise 2008 ve 2020 yıllarında yapılan 2 farklı çalışmada gentamisin direnç oranları sırasıyla % 24 ve % 30,1 olarak raporlanmıştır (Güler vd., 2008, Cengiz ve Adıgüzel, 2020). Bu çalışmada, gentamisin direncine neden olan *aac[3]-IV* geni PCR ile incelendiğinde izolatların % 12,6 oranında bu direnç genine sahip olduğu belirlendi. Bu sonucun Almanya (% 60 ve % 50) ve İran’da (% 76,8 ve % 54,5) yapılan çalışmalara göre (Guerra et al., 2003; Guerra et al., 2006; Shahrani et al., 2014; Pourtaghi and Sodagari, 2016) oldukça düşük olduğu gözlemlendi. Kanada’da yapılan bir çalışmada ise (Gow and Waldner, 2009) bu direnç geni % 0,9 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada direnç oranları incelenen antibiyotikler arasında en düşük direnç (%24,2) sefalotine karşı saptandı. Bu sonuç İspanya (% 16,4), Brezilya (% 46,1) ve Kanada’da (% 7,5) yapılan diğer çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Orden et al., 1999; Rigobelo et al., 2006; Gow and Waldner, 2009). Diğer yandan bu tez çalışmasında bulunan sonuçtan farklı olarak % 52,1-% 96,9 arasında değişen yüksek sefalotin direnci bildiren yakın tarihli farklı çalışmalar da (Shahrani et al., 2014; Ayis et al., 2015; Hasan et al., 2018) bulunmaktadır. Ayrıca Türkiye’de Güler vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada bulunan % 72 sefalotin direnci oranı bu tez çalışmasında bulunan direnç oranına göre oldukça yüksektir. Bu çalışmada sefalotin direnç geni belirleyicisi olan *blaSHV* geni izolatların hiçbirinde tespit edilemedi. Kanada’da yapılan bir çalışmada (Gow et al., 2008) *blaSHV* direnç geni benzer şekilde hiçbir

izolatla pozitif bulunamamıştır. Yakın tarihli Çin ve Tunus'ta yapılan çalışmalarda bu direnç geni % 9,5 ve % 15,5 olarak tespit edilmiştir (Jia et al., 2022; Yahia et al., 2023). Öte yandan İran'da yapılan bir çalışmada (Shahrani et al., 2014) *blaSHV* direnç geni % 41,3 olarak rapor edilmiştir. Antibiyotik direnç oranlarında ülkeler arasında ve aynı ülkelerin farklı şehirlerinde dahi farklılık görülen bu sonuçların çiftliklerdeki buzağı bakım ve besleme şartları, kullanılan antibiyotik miktarları, bölgesel ve mevsimsel farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca izolatlarda görülen yüksek orandaki antibiyotik direncinin, buzağının bu antibiyotiklere dirençli bakterilerle kontamine olmuş ortamlarla daha fazla temasının olduğunun göstergesi olduğunu düşündürmektedir.

Modifiye Kauffman şemasına göre *E. coli*, O (somatik), H (flagellar) ve K (kapsüler) yüzey antijen profilleri temelinde serotiplendirilmektedir (Kaper et al., 2004). Son yapılan çalışmalarda 185 adet O antijeni (Liu et al., 2020) rapor edilmiştir. Buzağı *E. coli* enfeksiyonlarında sık görülen serotipler O157, O26, O103, O111, O145, O45, O91, O113, O121, O128, O8, O9 ve O101'dir (Dubreuil et al., 2016). Bu serotipler çeşitli patotiplere ait olmakla birlikte genellikle buzağılarda ishale neden olmaktadır. Buzağılarda asemptomatik seyrederek insanlara bulaşan ve enfeksiyona neden olan serotiplerde bulunmaktadır. Bu çalışmada, patojenitede önemli rol oynayan serotiplerin genotipik olarak belirlenmesi amacıyla O101, O26, O145, O111 ve O9 serotip genleri incelendi. O101 için yapılan genoserotiplendirme sonucunda izolatların % 33,7 oranında bu gene sahip olduğu belirlendi. İran'da yapılan bir çalışmada (Ghanbarpour and Oswald, 2009) O101 serotip geni izolatların % 45,2'sinde tespit edilirken % 54,8 izolatın incelenen hiçbir O serotipine ait olmadığı raporlanmıştır. İran'da farklı araştırmacılar tarafından yapılan (Yadegari et al., 2019) incelemede bu oran % 42,50 olarak bulunmuştur. Sonuçlar bu çalışmada tespit edilen sonuçla benzerlik göstermektedir. Öte yandan İran'da yapılan farklı bir çalışmada (Shams et al., 2012) O101 serotip geni oranı % 3,7 olarak rapor edilmiştir. Almanya'da bir grup araştırmacının yürüttüğü yakın tarihli bir araştırmada ise (Feuerstein et al., 2021) bu oran % 14,8 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar tez çalışmasında bulunan sonuca göre nispeten daha düşüktür. Bu çalışmada incelenen diğer serotip genlerinden bir diğeri araştırma sonucunda % 6,3 oranında tespit edilen O26'dır. Bu sonuç Amerika (% 2,1), İran (% 9,2) Güney Afrika (% 10,2), Belçika (% 3,9) ve Mısır'da (% 10 ve % 3,3) yapılan yakın tarihli çalışmalarla (Ekiri et al., 2014; Shahrani et al., 2014; Mainga et

al., 2017; Gharieb et al., 2019; Algammal et al., 2020; Habets et al., 2020) uyumludur. Öte yandan İngiltere (% 17,3) ve Belçika'da (% 30,9) yapılan çalışmalar (Pearce et al., 2004; Engelen et al., 2020) sonucunda bulunan O26 serotip oranlarının bu çalışma verilerine göre nispeten daha yüksek olduğu görüldü. Diğer yandan İran'da yapılan bir çalışmada (Taghadosi et al., 2018) bütün izolatların O26 serotipi yönünden negatif olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada O145 serotip geninin belirlenmesi amacıyla yapılan mPCR sonucunda izolatların % 2,1 oranında bu gene sahip olduğu tespit edildi. İran'da yapılan bir çalışmada (Shahrani et al., 2014) O145 serotip geni izolatların % 2,2'sinde bulunmuştur. Benzer şekilde Güney Afrika'da yürütülen bir araştırmada O145 serotipi % 2,5 olarak tespit edilmiştir (Mainga et al., 2017). Belçika'da yakın bir zamanda yapılan çalışmada (Habets et al., 2020) bu oranın % 6,9 olduğu raporlanmıştır. Bu sonuçlar çalışmada bulunan oranla benzerlik göstermektedir. Öte yandan İngiltere'de yapılan bir çalışmada (Pearce et al., 2004) O145 serotip oranı % 0,6 olarak bulunurken, Amerika (Ekiri et al., 2014) ve İran'da (Taghadosi et al., 2018) yapılan çalışmalarda bütün izolatların O145 yönünden negatif olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada O111 ve O9 serotiplerin genotipik olarak belirlenmesi amacıyla yapılan PCR çalışmaları sonucunda hiçbir izolatın bu genlere sahip olmadığı belirlendi. O9 serotipi Almanya da yapılan bir çalışmada (Feuerstein et al., 2021) % 6,5, İran'da yapılan iki farklı çalışmada ise (Shams et al., 2012; Yadegari et al., 2019) % 2,2 ve % 8,3 olarak rapor edilmiştir. O111 serotipi İngiltere, Amerika, Güney Afrika ve İran'da yapılan çalışmalarda (Pearce et al., 2004; Ekiri et al., 2014; Mainga et al., 2017; Taghadosi et al., 2018) bu tez çalışmasıyla benzer olarak hiçbir izolatta tespit edilememiştir. Öte yandan İran (% 2,5), Belçika (% 26,6) ve Mısır'da (% 4 ve % 20) yürütülen araştırmalar (Shahrani et al., 2014; Gharieb et al., 2019; Algammal et al., 2020; Habets et al., 2020) sonucunda belirlenen O111 serotipi sonuçlarının bu çalışma verilerine göre nispeten daha yüksek olduğu görüldü. Yapılan araştırmalar arasında serotip dağılımındaki bu çeşitliliğin coğrafi farklılıklar nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

ETEC virülens faktörleri arasında çeşitli fimbrial adhezinler ve enterotoksinler bulunmaktadır. Adhezinlerin birincil görevi bağırsak epiteline yapışmayı sağlamaktır (Kaper et al., 2004). Hayvanlardan izole edilen ilk *E. coli* fimbrial adhezin, domuzlarda belirlenen F4 (K88) antijenidir (Nataro and Kaper, 1998). ETEC'de en sık tespit edilen fimbrialar, hayvan türlerine göre farklılık gösteren F4 (K88), F5 (K99),

F6 (987P), F17 (FY), F18, F41 gibi fimbrial adhezinlerdir. ETEC, ince bağırsağa yerleştikten sonra, ishale neden olan enterotoksinler üretmektedir. Enterotoksinlerin birincil görevi bağırsaklardan su ve elektrolit kaybına neden olmaktır (Croxen et al., 2013). ETEC suşları LT (LTI-LTII), ST (STa, STb) ve enteroagregatif stabil toksin 1 (EAST1) üretebilmektedir (Dubreuil et al., 2016). Bir ETEC suşu bu tip fimbria ve toksinlerin birini veya birden fazlasını üretebilmektedir (Zhang et al., 2006).

Virülens genlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan tekli ve çoklu PCR çalışmaları sonucunda; 22 (% 23,2) izolatın *East1*, 21 izolatın (% 22,1) *F5*, 19 izolatın (% 20) *STa*, 17 izolatın (% 17,9) *F41* ve 3 izolatın (% 3,2) da *LT* geni taşıdığı tespit edildi. İzolatların hiçbirinde *F17c* geni saptanamadı. Virülens genlerinin izolatlarda tekli veya kombine halde bulunduğu görüldü. İzolatların % 2,1'inin *F5*, *F41*, *STa*, *LT*, % 1'inin *F5*, *F41*, *STa*, *East1*, % 12,6'sının *F5*, *F41*, *STa*, % 3,1'inin *F5*, *East1*, % 2,1 *STa*, *F41*, %1'inin *F5*, *STa*, %1'inin *STa*, *East1* virülens genlerini kombine halde bulundurduğu belirlendi. Öte yandan % 17,9 izolatın *East1*, % 2,1 izolatın *F5*, % 1 izolatın ise *LT* virülens genini tekli olarak taşıdığı bulundu. Brezilya'da yapılan bir çalışmada (Rigobelo et al., 2006), *STa* geni % 25,4, *LT* geni % 13,2 bulunurken; izolatların % 5,2'sinin bu 2 gene birlikte sahip olduğu rapor edilmiştir. Konya'da Güler vd. (2008) tarafından yürütülen bir çalışmada izolatların % 13,3'ünün *F5*, *F41*, *STa*; % 2,7'sinin *F5* ve *F41* genlerini kombine halde bulundurduğu, % 40 izolatın *F17* virülens genine sahip olduğu bildirilmiştir. İran'da yapılan bir çalışmada (Ghanbarpour and Oswald, 2009) *F5* ve *F41* genleri izolatların tümünde negatif bulunmuştur. Aynı çalışmada *F17* geninin izolatların % 29'unda bulunduğu raporlanırken, yalnızca % 9,6 izolatın *F17c* genine sahip olduğu tespit edilmiştir. Brezilya'da bir grup araştırmacı tarafından yapılan bir çalışmada (Andrade et al., 2012); izolatların % 5,7'sinin *F41*, % 3,1'inin *F5*, % 0,6'sının *STa* genlerini tek başına, % 0,6'sının *F41*, *STa*, *F5*, % 0,6'sının *F41* ve *STa* genlerini kombine halde bulundurduğu bildirilmiştir. İsviçre'de Kerstin vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada bütün izolatlar *F5*, *STa* ve *LT* genleri yönünden negatif bulunmuştur. İran'da yapılan bir çalışmada (Shams et al., 2012) % 1,5 izolatta *F5* ve *F41*, % 4 izolatta ise *F5*, *F41* ve *STa* genlerinin pozitif olduğu tespit edilmiştir. Kore'de Hur vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada *STa* geni % 76,7, *F5* geni % 8,7 ve *F41* geni % 7,3 oranında bulunmuştur. Aynı çalışmada *Stx*, *F41*; *F5*, *F41* ve *F5*, *STa* genleri % 0,6 oranlarında kombine olarak tespit edilmiştir. İran'da geniş kapsamlı yapılan bir

araştırmada (Shahrani et al., 2014); izolatların % 1,25'inin *LT*, *STa*, *F5*, % 11,4'ünün *F5*, *F41*, % 28,4'ünün *F5*, *LT*, % 10,6'sının *F41*, *LT* ve % 0,6'sının *F41*, *STa*, *LT* genlerini bulundurduğu rapor edilmiştir. Sudan'da yapılan bir çalışmada (Ayis et al., 2015) izolatlarda % 90 *STa*, % 20 *LT*, %17,3 *F5* ve % 10 *STa*, *LT* genlerinin tespit edildiği bildirilmiştir. Arjantin'de Picco vd. (2015) tarafından yapılan geniş çaplı bir çalışmada % 2,6 *F17*, % 0,5 *STa*, % 0,2 *F5* genleri bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar izolatların % 0,5'inin *F1* ve *STa*, % 0,3'ünün *F17* ve *F5*, % 0,2'sinin *STa*, *F5* ve *F17*, % 0,2'sinin ise *STa*, *F5* ve *F41* genlerini birlikte bulundurduğunu ortaya koymuştur. Brezilya'da yapılan bir çalışmada *F5* virülens geni oranı bu çalışma ile benzer olarak % 2,4 olarak rapor edilmiştir (Coura et al., 2019). Mısır'da Awad vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada izolatlarda *F5*, *STa* ve *LT* virülens genleri sırasıyla % 14, % 16,7 ve % 6 olarak tespit edilmiştir. Mısır'da farklı araştırmacıların yürütmüş olduğu bir çalışmada (Algammal et al., 2020) izolatlarda *LT*, *F41* genleri % 12,7, *LT*, *STa* genleri % 5, *LT*, *F41*, *STa* genleri % 5 ve *STa* geni % 8,9 olarak bulunmuştur. Bu tez çalışmasının yapıldığı Kars iline komşu olan Erzurum ilinde yürütülen bir çalışmada (Cengiz ve Adıgüzel, 2020) izolatların % 5,7'sinin *STa*, % 2,6'sının *STa*, *F5* ve % 5,7'sinin *STa*, *F41*, *K99* genlerine sahip olduğu rapor edilmiştir. Kore'de ishaller ve sağlıklı buzağılar üzerinde yapılan bir araştırmada (Ryu et al., 2020) ishallerli buzağıkların % 37,7 *F17*, % 0,6 *F5*, % 0,3 *STa* ve % 0,6 *F17*, *F5* genlerine sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmada hiçbir izolatın *F41* genine sahip olmadığı rapor edilmiştir. Mısır'da Sobhy vd. (2020) tarafından yürütülen bir araştırmada % 3,4 izolatın *STa*, % 12,5 izolatın *F5* genlerine sahip olduğu ve izolatların *LT* geni yönünden negatif olduğu tespit edilmiştir. Uruguay'da yapılan bir araştırmada *F5*, *F41*, *STa* ve *LT* genleri sırasıyla % 4, % 3,4, % 5,4 ve % 0,7 olarak rapor edilmiştir (Umpiérrez et al., 2021). İran'da yapılan başka bir araştırmada, *F5* genlerinin varlığı araştırılmış ve hiçbir izolatın bu gene sahip olmadığı bulunmuştur (Keykhaei et al., 2021). Yakın zamanda Almanya'da yapılan bir çalışmada (Feuerstein et al., 2021) izolatların % 13,9'unun *F17*, % 2,8'inin *F5*, *STa*, % 3,7'sinin *F5*, *F41*, *STa* genlerini birlikte bulundurduğu rapor edilirken, tüm izolatların *LT* geni yönünden negatif olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada en yüksek oranda bulunan virülens faktörü *East1*'dir. Çalışmada *East1* virülens geni izolatların % 23,2'sinde tespit edildi. Bu sonuç Japonya (% 9,1), İsviçre (% 32,1), Brezilya (% 39,3) ve Mısır'da (% 10,7) yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Yamamoto and Nakazawa, 1997; de Verdier et al., 2012; Coura et al., 2019; Awad et al., 2020). Öte yandan Belçika'da yapılan bir çalışmada (Bertin et al.,

1998), *East1* virölens geni incelenmiş ve % 66 oranında tespit edilmiştir. Hindistan’da yapılan bir araştırmada (Gupta et al., 2013) izolatların % 68,1’inin *East1* genine sahip olduğu belirlenmiştir. Kongo’da bir grup araştırmacı tarafından yürütülen bir çalışmada ise (Ngeleka et al., 2019) bu oran % 59 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar çalışmada bulunan sonuca göre nispeten yüksektir. Ayrıca yakın zamanda Hindistan’da yapılan bir çalışmada (Srivani et al., 2022) *East1* geni % 3,3 olarak rapor edilmiştir. Bu sonucun çalışmada saptanan değere göre nispeten düşük olduğu görüldü. Virölens gen oranları arasındaki farklılığın tarama için uygulanan farklı tekniklerin yanı sıra coğrafi çeşitlilikle ve serotip farklılığıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada incelenen hiçbir izolatta tespit edilmeyen *F17c* geninin, bazı çalışmalarda yüksek oranda tespit edildiği görüldü. Bu durum *F17* ile ilgili genetik çeşitlilik ile açıklanabilir. Bu nedenle bu gen varlığının ortaya konulması için daha geniş varyantları içeren (*F17a*, *F17b*, *F17G* ve *F111*) ileri düzey araştırmalar yapılması gerektiği sonucuna varıldı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

ETEC, insanlarda ve çiftlik hayvanlarında koliform kökenli ishallerde en sık görülen etkindir. Buzağılarda görülen ETEC enfeksiyonları geçmişte olduğu gibi günümüzde de hayvancılık ekonomisini olumsuz etkilemeye devam etmektedir. Yeni doğan çiftlik hayvanlarında sık görülen ETEC ciddi dehidrasyon ve elektrolit dengesizliği sonucu ölümle sonuçlanabilen sulu ishallerle karakterizedir. Buzağılarda görülen *E. coli* enfeksiyonlarına farklı serotiplere ve bölgesel olarak değişebilen çeşitli virülens faktörlerine sahip etkenler neden olmaktadır. Dünya genelinde de antibiyotiklerin bilinçsiz şekilde ve sık kullanılması nedeniyle artan antibiyotik direnci hem tedavi giderlerinin artması hem de tedavinin zorlaşması nedeniyle önem taşımaktadır. Hem insan hem de hayvan sağlığında artan bu antibiyotik direnci nedeniyle tek antibiyotiğe veya sınıfa olduğu gibi çoklu antibiyotik direncinin görüldüğü enfeksiyonların artması endişe verici bir hale gelmiştir. Meydana gelen bu direnç sebebiyle ETEC'e neden olan etkenlerde de çoklu antibiyotik direncinin artışı önem arz etmektedir. Bu durum tedavi seçeneklerini sınırlayarak önemli ekonomik kayıplara yol açabilmektedir. Bu nedenle antibiyotik direnç sorununun ele alınmasında tek sağlık yaklaşımı çatısı altında iş birliği kritik öneme sahiptir.

Tez çalışması amacıyla örneklerin toplandığı Kars ilinde, Kars İl Tarım ve Orman Müdürlüğü'nün 01.10.2022 tarihinde başlatmış olduğu "Buzağılar Ölmesin İşletmelerimiz Şenlensin Projesi" bölgede buzağı ölümlerinin önem arz ettiğini göstermektedir. Bu proje ile buzağı ölümlerinin sık görüldüğü Kars iline bağlı 382 köy ve 56 mahallede buzağılarda hastalık, bakım ve besleme, buzağı ishalleri ve aşı uygulamalarının faydaları konusunda eğitim, yayın ve yayım faaliyetlerinin etkin bir şekilde yürütülmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca bu projeye Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından zorunlu olarak uygulanmayan buzağı septisemi aşısının işletmelere ücretsiz bir şekilde uygulanması ve zorunlu aşı haline getirilmesi hedeflenmektedir. Buzağı septisemi aşısı kullanımının yaygınlaştırılarak buzağı ölümlerinin minimize edilmesi ve ekonomik gelir düzeylerinin optimal seviyeye çıkartılması amaçlanmaktadır. Proje sayesinde Kars bölgesinde 200.000 adet damızlık büyükbaş dişi hayvanlar için septisemi aşısı uygulanması aktif olarak uygulanmaya devam etmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında incelenen 200 farklı neonatal septisemili buzağı dışkı örneğinin 95 (% 47,5) adetinden *E. coli*'nin izole edilmesi, bakteriyel nedenli buzağı ishallerinde söz konusu etkenin etiyolojik açıdan önemini göstermektedir.

Proje kapsamında izole edilen *E. coli* suşlarına uygulanan fenotipik ve genotipik analizlerde, gerek tekli gerekse çoklu antibiyotik dirençliliğinin yüksek oranda olduğu ve test edilen bazı antibakteriyellerin halen bölgede hayvan sağlığında yoğun olarak görüldüğü tespit edildi. Bu durum, hem Ülkemiz hem de global düzeyde gelişen antibiyotik dirençliliği bakımından dikkate alınması gereken bir durum olarak değerlendirildi.

E. coli suşlarının patojenitelerinde önemli rol oynayan serotiplerin, genotipik olarak belirlenmesi amacıyla yapılan genoserotiplendirme sonucunda, buzağı orijinli izolatlardan 32'sinin (% 33,7) *O101*, 6'sının (% 6,3) *O26*, 2'sinin (% 2,1) *O145* serotipi olduğu tespit edildi. Hiçbir izolatta *O111* ve *O9* serotipi saptanamadı. Bu bulgu, Kars ve yöresindeki neonatal septisemili buzağılarda dominant serotipin *O101* olduğunu göstermektedir.

İzole edilen *E. coli* suşlarında virülens genleri yönünden moleküler yöntemlerle yapılan analizlerde 22 (% 23,2) izolatın *East1*, 21 izolatın (% 22,1) *F5*, 19 izolatın (% 20) *STa*, 17 izolatın (% 17,9) *F41* ve 3 izolatın (% 3,2) da *LT* geni taşıdığı tespit edildi. İzolatların hiçbirinde *F17c* geni tespit edilemedi. Bu veri, Kars ve yöresindeki septisemili buzağılarda virülens genlerinin hangi düzeyde baskın olduklarını göstermesi bakımından önem arz etmektedir.

Gerçekleştirilen bu tez çalışması bir bütün olarak değerlendirildiğinde, neonatal septisemili *E. coli* izolatlarının çeşitli serotip ve virülens faktörlerine sahip olduğu görüldü. Aynı bölgede barınan buzağılar arasında dahi farklı serotip ve virülens faktörlerinin görülmesi, profilaksi amacıyla kullanılan aşılarda başarısını etkileyen önemli bir faktör olduğu dikkate alındığında, çalışma kapsamında karakterize edilen bazı *E. coli* suşlarının, ileriki dönemlerde yapılacak aşı çalışmalarında aday aşı suşları olabileceği değerlendirildi. Diğer yandan, *E. coli* izolatlarında sık görülen virülens faktörlerine yönelik aşı üretilmesi için bölgesel olarak veritabanı oluşturulmasına ihtiyaç duyulduğu sonucuna varıldı. Konuyla ilgili detaylı verilerin elde edilebilmesi için büyük ölçekli epidemiyolojik çalışmaların yapılması önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Abushaheen, M.A., Muzaheed, Fatani, A.J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D.D., Jhugroo, C., Vellappally, S, Khan, A.A., Shaik, J. and Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease a Month*. 66(6), 100971.
- Acres, S., Isaacson, R., Babiuk, L. and Kapitány, R. (1979). Immunization of Calves Against Enterotoxigenic Colibacillosis by Vaccinating Dams with Purified K 99 Antigen and Whole Cell Bacterins. *Infection and immunity*. 25, 121-126.
- Akyüz, E., Naseri, A., Erkiş, E.E., Makay, M., Uzlu, E., Kırmızıgül, A.E. ve Gökçe, G. (2017). Neonatal Buzağı İshalleri ve Sepsis. *Kafkas University Institute of Natural and Applied Science Journal*. 10(2), 181-191.
- Al Mawly, J., Grinberg, A., Prattley, D., Moffat, J., Marshall, J. and French, N. (2015). Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. *The Veterinary Journal*. 203(2), 155-160.
- Al-Abri, S.S., Beeching, N.J. and Nye, F.J. (2005). Traveller's diarrhoea. *The Lancet Infectious Diseases*. 5(6), 349-360.
- Al-Gallas, N., Bahri, O., Bouratbeen, A., Ben Haasen, A., Ben Aissa, R. (2007). Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77(3), 571-582.
- Algammal, A.M., El-Kholy, A.W., Riad, E.M., Mohamed, H.E., Elhaig, M.M., Yousef, S.A., Hozzein, W.N. and Ghobashy, M.O.I. (2020). Genes Encoding the Virulence and the Antimicrobial Resistance in Enterotoxigenic and Shiga-Toxigenic *E. coli* Isolated from Diarrheic Calves. *Toxins (Basel)*. 12(6), 383.
- Alikhani, M.Y., Sedighi, I., Zamani, A., Aslani, M.M. and Sadrosadat, T. (2012). Incidence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from young children with diarrhoea in the west of Iran. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 59(3), 367-374.
- Anantha, R.P., Stone, K.D. and Donnenberg, M.S. (2000). Effects of bfp mutations on biogenesis of functional enteropathogenic *Escherichia coli* type IV pili. *Journal of Bacteriology*. 182(9), 2498-2506.
- Andrade, G.I., Coura, F.M., Santos, E.L., Ferreira, M.G., Galinari, G.C., Facury Filho, E.J., de Carvalho, A.U., Lage, A.P. and Heinemann, M.B. (2012). Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 44(7), 1783-1790.
- Argenzio, R.A., Liacos, J., Berschneider, H.M., Whipp, S.C. and Robertson, D.C. (1984). Effect of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* and theophylline on ion transport in porcine small intestine. *Canadian journal of comparative medicine*. 48(1), 14-22.
- Arriaga, Y.L., Harville, B.A. and Dreyfus, L.A. (1995). Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infection and Immunity*. 63(12), 4715-4720.
- Arshad, N. and Visweswariah, S.S. (2012). The multiple and enigmatic roles of guanylyl cyclase C in intestinal homeostasis. *FEBS Letters*. 586(18), 2835-2840.
- Astorga, F., Navarrete-Talloni, M.J., Miró, M.P., Bravo, V., Toro, M., Blondel, C.J. and Hervé-Claude, L.P. (2019). Antimicrobial resistance in *E. coli* isolated from dairy calves and bedding material. *Heliyon*. 5(11), e02773.
- Avila, F.A., Paulillo, A.C., Schocken-Iturrino, R.P., Lucas, F.A., Orgaz, A. and Quintana, J.L. (1995). A comparative study of the efficiency of a pro-biotic and the anti-K99 and anti-

- A14 vaccines in the control of diarrhea in calves in Brazil. *Revue D'élevage et de Médecine Vétérinaire Des Pays Tropicaux*. 48(3), 239-243.
- Awad, W.S., El-Sayed, A.A., Mohammed, F.F., Bakry, N.M., Abdou, N.M.I. and Kamel, M.S. (2020). Molecular characterization of pathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic and in-contact cattle and buffalo calves. *Tropical Animal Health and Production*. 52(6), 3173-3185.
- Aydemir, S., Coplu, N., Gulay, Z., Gur, D., Hasdemir, U., Karahan, Z., Karatuna, O., Kayacan, Z.C. ve Soyletir, G. (2016). Antibiyotik Duyarlılık Testleri, EUCAST: Uygulama, Yorum ve Uzman Kurallar. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 46. 1-206.
- Ayis, E.A.A., Elgaddal, A.A. and Almofti, Y.A. (2015). Isolation, Identification and Enterotoxin Detection of *Escherichia Coli* Isolated from Calf Diarrhea and their Virulence Characteristics. *Journal of Applied and Industrial Sciences*. 3 (4), 141-149.
- Bardiau, M., Szalo, M. and Mainil, J.G. (2010). Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. *Veterinary Research*. 41(5), 57.
- Barnich, N. and Darfeuille-Michaud, A. (2007). Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. 23(1), 16-20.
- Bartels, C.J., Holzhauer, M., Jorritsma, R., Swart, W.A. and Lam, T.J. (2010). Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*. 93(3), 162-169.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45(4), 493-496.
- Baumgart, D.C. and Sandborn, W.J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 369, 1641-1657.
- Bavro, V.N., Pietras, Z., Furnham, N., Pérez-Cano, L., Fernández-Recio, J., Pei, X.Y., Misra, R. and Luisi, B. (2008). Assembly and channel opening in a bacterial drug efflux machine. *Molecular cell*. 30(1), 114-121.
- Becker, P.M., Widjaja-Greefkes, H.C. and van Wikselaar, P.G. (2010). Inhibition of binding of the AB5-type enterotoxins LT-I and cholera toxin to ganglioside GM1 by galactose-rich dietary components. *Foodborne Pathogens and Diseases*. 7(3), 225-233.
- Beddoe, T., Paton, A.W., Le Nours, J., Rossjohn, J. and Paton, J.C. (2010). Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins. *Trends in Biochemical Sciences*. 35(7), 411-418.
- Behera, B., Anil Vishnu, G.K., Chatterjee, S., Sitaramgupta, V.V., Sreekumar, N., Nagabhushan, A., Rajendran, N., Prathik, B.H. and Pandya, H.J. (2019). Emerging technologies for antibiotic susceptibility testing. *Biosensors and Bioelectronics*. 142, 111552.
- Benkova, M., Soukup, O. and Marek, J. (2020). Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *Journal of Applied Microbiology*. 129(4), 806-822.
- Bennett, J.W. and Chung, K.T. (2001). Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Advances in Applied Microbiology*. 49, 163-184.
- Benz, I. and Schmidt, M.A. (1989). Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 57(5), 1506-1511.
- Berberov, E.M., Zhou, Y., Francis, D.H., Scott, M.A., Kachman, S.D. and Moxley, R.A. (2004). Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe

- diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins. *Infection and Immunity*. 72(7). 3914-3924.
- Berdal, J.E., Follin-Arbelet, B. and Bjørnholt, J.V. (2019). Experiences from multiplex PCR diagnostics of faeces in hospitalised patients: clinical significance of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and culture negative campylobacter. *BMC Infectious Disease*. 19(1), 630.
- Berkes, J., Viswanathan, V.K., Savkovic, S.D. and Hecht, G. (2003). Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut*. 52(3), 439-451.
- Bertin, Y., Martin, C., Girardeau, J.P., Pohl, P. and Contrepois, M. (1998). Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. *FEMS Microbiology Letters*. 162(2), 235-239.
- Beutin, L., Jahn, S. and Fach, P. (2009). Evaluation of the 'GeneDisc' real-time PCR system for detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26, O103, O111, O145 and O157 strains according to their virulence markers and their O- and H-antigen-associated genes. *Journal of Applied Microbiology*. 106(4), 1122-1132.
- Bhan, M.K., Raj, P., Levine, M.M., Kaper, J.B., Bhandari, N., Srivastava, R., Kumar, R. and Sazawal, S. (1989). Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *The Journal of Infectious Diseases*. 159(6), 1061-1064.
- Bhatt, S., Romeo, T. and Kalman, D. (2011). Honing the message: post-transcriptional and post-translational control in attaching and effacing pathogens. *Trends in Microbiology*. 19(5), 217-224.
- Bieber, D., Ramer, S.W., Wu, C.Y., Murray, W.J., Tobe, T., Fernandez, R. and Schoolnik, G.K. (1998). Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*. 280, 2114-2118.
- Bihannic, M., Ghanbarpour, R., Auvray, F., Cavalie, L., Chatre, P., Boury, M., Brugere, H., Madec, J.Y. and Oswald, E. (2014). Identification and detection of three new F17 fimbrial variants in *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Veterinary Research*. 45(1), 76.
- Bilinski, P., Kapka-Skrzypczak, L., Posobkiewicz, M., Bondaryk, M., Holownia, P. and Wojtyla, A. (2012). Public health hazards in Poland posed by foodstuffs contaminated with *E. coli* O104:H4 bacterium from the recent European outbreak. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 19(1), 3-10.
- Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O. and Piddock, L.J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 13(1), 42-51.
- Blanco, J., Blanco, M., Alonso, M.P., Blanco, J.E., Garabal, J.I. and González, E.A. (1992). Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2. *FEMS Microbiology Letters*. 75(2-3), 155-159.
- Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J., Mora, A., Balaguer, L., Mouriño, M., Juárez, A. and Jansen, W.H. (1996). O serogroups, biotypes, and eae genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(12), 3101-3107.
- Boquet, P. (2001). The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon*. 39(11), 1673-1680.

- Borriello, G., Lucibelli, M.G., De Carlo, E., Auriemma, C., Cozza, D., Ascione, G., Scognamiglio, F., Iovane, G. and Galiero, G. (2012). Characterization of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from diarrhoeic Mediterranean water buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Research in Veterinary Science*. 93(1), 18-22.
- Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B. and Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infection and Immunity*. 67(9), 4499-4509.
- Bradley, A. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal*. 164(2), 116-128.
- Broes, A., Fairbrother, J.M., Jacques, M. and Lariviere, S. (1989). Requirement for capsular antigen KX105 and fimbrial antigen CS1541 in the pathogenicity of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* O8:KX105 strains. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 53(1), 43-47.
- Brunder, W., Schmidt H. and Karch, H. (1997). EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Molecular Microbiology*. 24(4), 767-778.
- Brunder, W., Schmidt, H. and Karch, H. (1996). KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology*. 142(11), 3305-3315.
- Bryan, A., Youngster, I. and McAdam, A.J. (2015). Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. *Clinics in Laboratory Medicine*. 35(2), 247-272.
- Brzuszkiewicz, E., Thürmer, A., Schuldes, J., Leimbach, A., Liesegang, H., Meyer, F.D., Boelter, J., Petersen, H., Gottschalk, G. and Daniel, R. (2011). Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enter-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Archives of Microbiology*. 193(12), 883-891.
- Buetow, L., Flatau, G., Chiu, K., Boquet, P. and Ghosh, P. (1956). Structure of the Rho-activating domain of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1. *Nature Structural & Molecular Biology*. 8(7), 584-588.
- Bush, K. (2013). Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences journal*. 1277, 84-90.
- Busque, P., Letellier, A., Harel, J. and Dubreuil, J.D. (1995). Production of *Escherichia coli* STb enterotoxin is subject to catabolite repression. *Microbiology*. 141(7), 1621-1627.
- Butaye, P., Cloeckaert, A. and Schwarz, S. (2003). Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 22(3), 205-210.
- Çabalar, M., Boynukara, B., Gülhan, T. ve Ekin, İ. H. (2001). Prevalence of Rotavirus, *Escherichia coli* K99 and O157:H7 in Healthy Dairy Cattle Herds in Van, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. 25(2), 191-196.
- Callaway, T.R., Edrington, T.S. and Nisbet, D.J. (2014). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* from migratory brown-headed cowbirds (*Molothrus ater*), common Grackles (*Quiscalus quiscula*), and cattle egrets (*Bubulcus ibis*). *Foodborne Pathogens and Disease*. 11(10), 791-794.
- Caprioli, A., Falbo, V., Roda, L.G., Ruggeri, F.M. and Zona, C. (1983). Partial purification and characterization of an *escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infection and Immunity*. 39(3), 1300-1306.

- Carrière, J., Darfeuille-Michaud, A. and Nguyen, H.T. (2014). Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*. 20(34), 12102-12117.
- Casey, T.A., Connell, T.D., Holmes, R.K. and Whipp, S.C. (2012). Evaluation of heat-labile enterotoxins type IIa and type IIb in the pathogenicity of enterotoxigenic *Escherichia coli* for neonatal pigs. *Veterinary Microbiology*. 159(1-2), 83-89.
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.-J. and Nordmann, P. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 60(2), 394-397.
- Cengiz, M., Buyukcangaz, E., Arslan, E., Mat, B., Sahinturk, P., Sonal, S., Gocmen, H. ve Sen, A. (2012). Molecular characterisation of quinolone resistance in *Escherichia coli* from animals in Turkey. *The Veterinary Record*. 171(6), 155-159.
- Cengiz, S. ve Adiguzel, M. (2020). Determination of virulence factors and antimicrobial resistance of *E. coli* isolated from calf diarrhea, part of eastern Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 67(4), 365-371.
- Chanawong, A., M'Zali, F.H., Heritage, J., Lulitanond, A. and Hawkey P.M. (2000). Characterisation of extended-spectrum beta-lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiology Letters*. 184(1), 85-89.
- Chao, K.L. and Dreyfus, L.A. (1997). Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*. 65(8), 3209-3217.
- Chaudhuri, R.R. and Henderson, I.R. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*. 12(2), 214-226.
- Chen, H.D. and Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 29(1), 83-98.
- Cho, Y.I. and Yoon, K.J. (2014). An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Science*. 15(1), 1-17.
- Choi, C., Kwon, D. and Chae, C. (2001). Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin genes in *E. coli* isolated from diarrheic piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13(1), 26-29.
- Chung, W.Y., Carter, R., Hardy, T., Sack, M., Hirst, T.R. and James, R.F. (2006). Inhibition of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit pentamer (EtxB5) assembly in vitro using monoclonal antibodies. *Journal of Biological Chemistry*. 281(51), 39465-39470.
- Ciftci, A. ve Aksoy, A. (2015). Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri Veterinary Sciences- Pharmacology and Toxicology*. 1, 1-10.
- Cohen, M.B., Mann, E.A., Lau, C., Henning, S.J. and Giannella, R.A. (1992). A gradient in expression of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin receptor exists along the villus-to-crypt axis of rat small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 186(1), 483-490.
- Collingwood, C., Kemmett, K., Williams, N. and Wigley, P. (2014). Is the Concept of Avian Pathogenic *Escherichia coli* as a Single Pathotype Fundamentally Flawed. *Frontiers in Veterinary Science*. 14(1), 5.
- Contrepolis, M., Girardeau, J.P., Dubourguier, H.C., Gouet, P. and Levieux, D. (1978). Specific protection by colostrum from cows vaccinated with the K 99 antigen in newborn calves

- experimentally infected with *E. coli* Ent+ K99+. *Annals of Veterinary Research*. 9(2), 385-388.
- Costa, T.R., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M.S., Redzej, A., Trokter, M. and Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*. 13(6), 343-359.
- Coura, F.M., de Araújo Diniz, S., Silva, M.X., de Oliveira, C.H.S., Mussi, J.M.S., de Oliveira, C.S.F., Lage, A.P. and Heinemann, M.B. (2019). Virulence factors and phylotyping of *Escherichia coli* isolated from non-diarrheic and diarrheic water buffalo calves. *Ciência Rural*. 49(5), e20180998.
- Cowan, S. (1954). A review of names for coliform organisms. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*. 4, 119 –124.
- Cravioto, A., Tello, A., Navarro, A., Ruiz, J., Villafán, H., Uribe, F. and Eslava, C. (1991). Association of *Escherichia coli* HEP-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet*. 337(8736), 262-264.
- Crossman, L.C., Chaudhuri, R.R., Beatson, S.A., Wells, T.J., Desvaux, M., Cunningham, A.F., Petty, N.K., Mahon, V., Brinkley, C., Hobman, J.L., Savarino, S.J., Turner, S.M., Pallen, M.J., Penn, C.W., Parkhill, J., Turner, A.K., Johnson, T.J., Thomson, N.R., Smith, S.G.J. and Henderson, I.R. (2010). A commensal gone bad: complete genome sequence of the prototypical enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407. *Journal of Bacteriology*. 192(21), 5822-5831.
- Crouch, C.F., Oliver, S. and Francis, M.J. (2001). Serological, colostral and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, coronavirus and *Escherichia coli* F5 (K99). *Veterinary Record*. 149(4), 105-108.
- Croxen, M.A. and Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. 8(1), 26-38.
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska M. and Finlay, B.B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(4), 822-880.
- Culyba, M.J., Mo, C.Y. and Kohli, R.M. (2015). Targets for Combating the Evolution of Acquired Antibiotic Resistance. *Biochemistry*. 54(23), 3573-3582.
- Czaplewski, L., Bax, R., Clokie, M., Dawson, M., Fairhead, H., Fischetti, V.A., Foster, S., Gilmore, B.F., Hancock, R.E., Harper, D., Henderson, I.R., Hilpert, K., Jones, B.V., Kadioglu, A., Knowles, D., Ólafsdóttir, S., Payne, D., Projan, S., Shaunak, S., Silverman, J., Thomas, C.M., Trust, T.J., Warn, P. and Rex, J.H. (2016). Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. *The Lancet Infectious Diseases*. 16(2), 239-251.
- Czczulin, J.R., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M.H., Navarro-Garcia, F. and Nataro, J.P. (1997). Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 65(10), 4135-4145.
- Çitil, M. ve Gökçe, E. (2013). Neonatal Septisemi. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*. 4(1), 62-70.
- Daniels, R. (2011). Surviving the first hours in sepsis: getting the basics right (an intensivist's perspective). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66(2), 11-23.
- Davies, J. and Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74(3), 417-433.

- de Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H. and Peeters, J.E. (1999). A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology*. 29(8), 1269-1287.
- De Rycke, J., Milon, A. and Oswald, E. (1999). Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Veterinary Research*. 30(2-3), 221-233.
- de Verdier, K., Nyman, A., Greko, C. and Bengtsson, B. (2012). Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 54(1), 2.
- De, S.N., Bhattacharya, K. and Sarkar, J.K. (1956). A study of the pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. *Journal of Pathology and Bacteriology*. 71(1), 201-209.
- DeFrancesco, K.A., Cobbold, R.N., Rice, D.H., Besser, T.E. and Hancock, D.D. (2004). Antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli* from dairy cattle associated with recent multi-resistant salmonellosis outbreaks. *Veterinary Microbiology*. 98(1), 55-61.
- Delahay, R.M., Frankel, G. and Knutton, S. (2001). Intimate interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* at the host cell surface. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 14(5), 559-565.
- Deng, G., Zeng, J., Jian, M., Liu, W., Zhang, Z., Liu, X. and Wang, Y. (2013). Nanoparticulated heat-stable (STa) and heat-labile B subunit (LTB) recombinant toxin improves vaccine protection against enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge in mouse. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 115(2), 147-153.
- Deng, W., Puente, J.L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B.A., Vázquez, A., Barba, J., Ibarra, J.A., O'Donnell, P. and Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T. and Finlay, B.B. (2004). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(10), 3597-3602.
- DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D., Abe, A., Ruschkowski, S. and Finlay, B.B. (1999). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. *Infection and immunity*. 67(5), 2389-2398.
- Dho-Moulin, M. and Fairbrother, J.M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*. 30(2-3), 299-316.
- Di Labio, E., Regula, G., Steiner, A., Miserez, R., Thomann, A. and Ledergerber, U. (2007). Antimicrobial resistance in bacteria from Swiss veal calves at slaughter. *Zoonoses Public Health*. 54(9-10), 344-352.
- DiGiandomenico, A. and Sellman, B.R. (2015). Antibacterial monoclonal antibodies: the next generation. *Current Opinion in Microbiology*. 27, 78-85.
- Dodds, D.R. (2017). Antibiotic resistance: A current epilogue. *Biochemical Pharmacology*. 134, 139-146.
- Dolejska, M., Senk, D., A. Cizek, A., Rybníková, J., Sychra, O. and Literak, I. (2008). Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in cattle and house sparrows on two Czech dairy farms. *Research in Veterinary Science*. 85, 491-494.
- Donaldson, S.C., Straley, B.A., Hegde, N.V., Sawant, A.A., DebRoy, C. and Jayarao, B.M. (2006). Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(6), 3940-3948.

- Dorsey, F.C., Fischer, J.F. and Fleckenstein, J.M. (2006). Directed delivery of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*. 8(9), 1516-1527.
- Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R.M. and Hartland, E.L. (2002). Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 70(12), 6761-6769.
- Dreyfus, L.A., Frantz, J.C. and Robertson, D.C. (1983). Chemical properties of heat-stable enterotoxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of different host origins. *Infection and Immunity*. 42(2), 539-548.
- Dreyfus, L.A., Harville, B., Howard, D.E., Shaban, R., Beatty, D.M. and Morris, S.J. (1993). Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90(8), 3202-3206.
- Duan, Q., Xia, P., Nandre, R., Zhang, W. and Zhu, G. (2019). Review of Newly Identified Functions Associated With the Heat-Labile Toxin of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 9, 292.
- Dubreuil, J.D. (1997). *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology*. 143(6), 1783-1795.
- Dubreuil, J.D. (2012). The whole Shebang: the gastrointestinal tract, *Escherichia coli* enterotoxins and secretion. *Current Issues of Molecular Biology*. 14(2), 71-82.
- Dubreuil, J.D., Isaacson, R.E. and Schifferli, D.M. (2016). Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 7(1). doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016.
- Duijkeren, E., Schink, A.K., Roberts, M., Wang, Y. and Schwarz, S. (2018). Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Microbiology Spectrum*. 6(1), doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0019-2017.
- Durand, G.A., Raoult, D. and Dubourg, G. (2019). Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 53(4), 371-382.
- Duse, A., Waller, K.P., Emanuelson, U., Unnerstad, H.E., Persson, Y. and Bengtsson, B. (2015). Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 98(1), 500-516.
- Dziva, F. and Stevens, M.P. (2008). Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology*. 37(4), 355-366.
- Dziva, F., Vlisidou, I., Crepin, V.F., Wallis, T.S., Frankel, G. and Stevens, M.P. (2007). Vaccination of calves with EspA, a key colonisation factor of *Escherichia coli* O157:H7, induces antigen-specific humoral responses but does not confer protection against intestinal colonisation. *Veterinary Microbiology*. 123(1-3), 254-261.
- Economou, V. and Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*. 8, 49-61.
- Ekiri, A.B., Landblom, D.G., Doetkott, D.K. and Olet, S. (2014). Isolation and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serogroups O26, O45, O103, O111, O113, O121, O145, and O157 Shed from Range and Feedlot Cattle from Postweaning to Slaughter. *Journal of Food Protection*. 77(7), 1052-1061.
- Ellis, J.A., Hassard, L.E., Cortese, V.S. and Morley, P.S. (1996). Effects of perinatal vaccination on humoral and cellular immune responses in cows and young calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 208(3), 393-400.

- El-Razik, K. A., Abdelrahman, K. A., Ahmed, Y. F., Gomaa, A. M. and Eldebaky, H. A. (2010). Direct Identification of Major Pathogens of the Bubaline Subclinical Mastitis in Egypt using PCR. *Journal of American Science*. 6 (10), 652–660.
- El-Seedy, F.R., Abed, A.H., Yanni, H.A. and Abd El-Rahman S.A.A. (2016). Prevalence of *Salmonella* and *E. coli* in neonatal diarrheic calves. *Journal of Basic and Applied Sciences*. 5(1), 45-51.
- Elsinghorst, E.A. and Kopecko, D.J. (1992). Molecular cloning of epithelial cell invasion determinants from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 60(6), 2409-2417.
- Engelen, F., Thiry, D., Devleeschauwer, B., Heyndrickx, M., Mainil, J., De Zutter, L. and Cox, E. (2021). Pathogenic potential of *Escherichia coli* O157 and O26 isolated from young Belgian dairy calves by recto-anal mucosal swab culturing. *Journal of Applied Microbiology*. 131(2), 964-972.
- Escherich, T. and Bettelheim, K.S. (1988). The Intestinal Bacteria of the Neonate and Breast-Fed Infant. *Reviews of Infectious Diseases*. 10(6), 1220-1225.
- Esslemont, R.J. and Kossaibati, M.A. (1997). Culling in 50 dairy herds in England. *Veterinary Record*. 140(2), 36-39.
- Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kiessling, S., Alt, K., Antão, E.M., Laternus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Böhnke, U., Steinrück, H., Philipp, H.C. and Wieler, L.H. (2007). Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they?. *International Journal of Medical Microbiology*. 297(3), 163-176.
- Fashae, K., Engelmann, I., Monecke, S., Braun, S. and Ehricht, R. (2021). Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in wild birds and cattle, Ibadan, Nigeria. *BMC Veterinary Research*. 17(1), 33.
- Fayer, R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*. 124(1), 90-97.
- Fayer, R., Santin, M. and Trout, J.M. (2009). *Cryptosporidium* in cattle: from observing to understanding. *CABI Publishing, Wallingford*. 12-24.
- Fekete, P.Z., Gerardin, J., Jacquemin, E., Mainil, J.G. and Nagy, B. (2002). Replicon typing of F18 fimbriae encoding plasmids of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* strains from porcine postweaning diarrhoea and oedema disease. *Veterinary Microbiology*. 85(3), 275-284.
- Ferens, W.A. and Hovde, C.J. (2011). *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease*. 8(4), 465-487.
- Fernández-Villa, D., Aguilar, M.R. and Rojo, L. (2019). Folic Acid Antagonists: Antimicrobial and Immunomodulating Mechanisms and Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(20), 4996.
- Fernández-Villa, D., Gómez-Lavín, J.M., Abradelo, C., San Román, J. and Rojo, L. (2018). Tissue Engineering Therapies Based on Folic Acid and Other Vitamin B Derivatives. Functional Mechanisms and Current Applications in Regenerative Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(12), 4068.
- Feuerstein, A., Scuda, N., Klose, C., Hoffmann, A., Melchner, A., Boll, K., Rettinger, A., Fell, S., Straubinger, R.K. and Riehm, J.M. (2021). Antimicrobial Resistance, Serologic and Molecular Characterization of *E. coli* Isolated from Calves with Severe or Fatal Enteritis in Bavaria, Germany. *Antibiotics (Basel)*. 11(1), 23.

- Fleckenstein, J.M., Holland, J.T. and Hasty, D.L. (2002). Interaction of an outer membrane protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Infection and Immunity*. 70(3), 1530-1537.
- Fleckenstein, J.M., Lindler, L.E., Elsinghorst, E.A. and Dale, J.B. (2000). Identification of a gene within a pathogenicity island of enterotoxigenic *Escherichia coli* H10407 required for maximal secretion of the heat-labile enterotoxin. *Infection and Immunity*. 68(5), 2766-2774.
- Fleming, A. (2001). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. *Bulletin of the World Health Organization*. 79(8), 780-790.
- Foreman, D.T., Martinez, Y., Coombs, G., Torres, A. and Kupersztoch, Y.M. (1995). TolC and DsbA are needed for the secretion of STB, a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 18(2), 237-245.
- Fossler, C.P., Wells, S.J., Kaneene, J.B., Ruegg, P.L., Warnick, L.D., Bender, J.B., Eberly, L.E., Godden, S.M. and Halbert, L.W. (2005). Herd-level factors associated with isolation of *Salmonella* in a multi-state study of conventional and organic dairy farms II. *Salmonella* shedding in calves. *Preventive Veterinary Medicine*. 70(3-4), 279-291.
- Foster, D.M. and Smith, G.W. (2009). Pathophysiology of diarrhea in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 25(1), 13-36.
- Fowler, B. (2001). The folate cycle and disease in humans. *Kidney International Supplements*. 78, 221-229.
- Fraser, M.E., Fujinaga, M., Cherney, M.M., Melton-Celsa, A.R., Twiddy, E.M., O'Brien, A.D. and James, M.N. (2004). Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Biological Chemistry*. 279(26), 27511-27517.
- Fujihara, S., Arikawa, K., Aota, T., Tanaka, H., Nakamura, H., Wada, T., Hase, A. and Nishikawa, Y. (2009). Prevalence and properties of diarrheagenic *Escherichia coli* among healthy individuals in Osaka City, Japan. *Japanese The Journal of Infectious Diseases*. 62(4), 318-323.
- Fujii, Y., Hayashi, M., Hitotsubashi, S., Fuke, Y., Yamanaka, H. and Okamoto, K. (1991). Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Journal of Bacteriology*. 173(17), 5516-5522.
- Fujii, Y., Kondo, Y. and Okamoto, K. (1995). Involvement of prostaglandin E2 synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *FEMS Microbiology Letters*. 130(2-3), 259-265.
- Gajdács, M. and Albericio, F. (2019). Antibiotic Resistance: From the Bench to Patients. *Antibiotics (Basel)*. 8(3), 129.
- Gansheroff, L.J. and O'Brien, A.D. (2000). *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle presented for slaughter in the U.S.: higher prevalence rates than previously estimated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(7), 2959-2961.
- García-Meniño, I., García, V., Mora, A., Díaz-Jiménez, D., Flament-Simon, S.C., Alonso, M.P., Blanco, J.E., Blanco, M. and Blanco, J. (2018). Swine Enteric Colibacillosis in Spain: Pathogenic Potential of mcr-1 ST10 and ST131 *E. coli* Isolates. *Frontiers in Microbiology*. 9, 2659.
- Gaytán, M.O., Martínez-Santos, V.I., Soto, E. and González-Pedrajo, B. (2016). Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 6, 129.

- Ghanbarpour, R. and Oswald, E. (2009). Characteristics and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from septicemic calves in southeast of Iran. *Tropical Animal Health and Production*. 41(7), 1091-1099.
- Gharieb, R., Fawzi, E. and Elsohaby, I. (2019). Antibigram, virulotyping and genetic diversity of *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars isolated from diarrheic calves and calf handlers. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 67, 101367.
- Ghunaim, H., Abu-Madi, M.A. and Kariyawasam, S. (2014). Advances in vaccination against avian pathogenic *Escherichia coli* respiratory disease: potentials and limitations. *Veterinary Microbiology*. 172(1-2), 13-22.
- Girón, J.A., Ho, A.S. and Schoolnik, G.K. (1991). An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*. 254(5032), 710-713.
- Golkar, Z., Bagasra, O. and Pace, D.G. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 8(2), 129-136.
- Gomez, D.E. and Weese, J.S. (2017). Viral enteritis in calves. *The Canadian Veterinary Journal*. 58(12), 1267-1274.
- Goncalves, C., Berthiaume, F., Mourez, M. and Dubreuil, J.D. (2008). *Escherichia coli* STb toxin binding to sulfatide and its inhibition by carragenan. *FEMS Microbiology Letters*. 281(1), 30-35.
- Gonzales, L., Ali, Z.B., Nygren, E., Wang, Z., Karlsson, S., Zhu, B., Quiding-Jarbrink, M. and Sjoling, A. (2013). Alkaline pH is a signal for optimal production and secretion of the heat labile toxin, LT in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Plos One*. 8(9), e74069.
- González Pasayo, R.A., Sanz, M.E., Padola, N.L. and Moreira, A.R. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves in Argentina. *Open Veterinary Journal*. 9(1), 65-73.
- González, R.N., Cullor, J.S., Jasper, D.E., Farver, T.B., Bushnell, R.B. and Oliver, M.N. (1989). Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 53(3), 301-305.
- Gould, L.H., Demma, L., Jones, T.F., Hurd, S., Vugia, D.J., Smith, K., Shiferaw, B., Segler, S., Palmer, A., Zansky, S., Griffin, P.M. (2009). Hemolytic uremic syndrome and death in persons with *Escherichia coli* O157:H7 infection, foodborne diseases active surveillance network sites, 2000-2006. *Clinical Infectious Diseases*. 49(10), 1480-1485.
- Gow, S.P. and Waldner, C.L. (2009). Antimicrobial resistance and virulence factors stx1, stx2, and eae in generic *Escherichia coli* isolates from calves in western Canadian cow-calf herds. *Microbial drug resistance*. 15(1), 61-67.
- Gow, S.P., Waldner, C.L., Harel, J. and Boerlin P. (2008). Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic *Escherichia coli* isolates from cow-calf herds in western Canada. *Applied and Environmental Microbiology*. 4(12), 3658-3666.
- Gökmen, M., İlhan, Z., Tavşanlı, H., Önen, A., Ektik N. ve Begüm Göçmez E. (2022). Prevalence and molecular characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in animal source foods and green leafy vegetables. *Food Science Technology International*. doi: 10.1177/10820132221125104.
- Green, D.W. (2002). The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 6(1), 1-19.
- Grenni, P., Ancona, V. and Barra Caracciolo, A. (2017). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*. 136, 25-39.

- Gruenheid, S., DeVinney, R., Bladt, F., Goosney, D., Gelkop, S., Gish, G.D., Pawson, T. and Finlay, B.B. (2001). Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nature Cell Biology*. 3(9), 856-859.
- Guabiraba, R. and Schouler, C. (2015). Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiology Letters*. 362(15). doi: 10.1093/femsle/fnv118.
- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Helmuth, R., Guth, B.E.C. and Beutin, L. (2006). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* O111 isolates. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57(6), 1210-1214.
- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S. and Helmuth, R. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52, 489-492.
- Gupta, V., Roy, A. and Joshi, C.G. (2013). Multiplex PCR for virulence associated genes in *E. coli* isolates from calf diarrhoea. *Indian Journal of Comparative Microbiology*. 34(2), 19-23.
- Gurjar, A.A., Klaessig, S., Salmon, S.A., Yancey, R.J., Jr. and Schukken, Y.H. (2013). Evaluation of an alternative dosing regimen of a J-5 mastitis vaccine against intramammary *Escherichia coli* challenge in nonlactating late-gestation dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 96(8), 5053-5063.
- Güler, L., Gündüz, K. ve Ok, U. (2008). Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from calves in Turkey. *Zoonoses Public Health*. 55(5), 249-257.
- Gülhan, T. (2003). Sağlıklı Görünen Hayvanların Dışkılarından İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarının Biyokimyasal, Enterotoksijenik ve Verotoksijenik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Yüüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 14(1), 102-109.
- Gülhan, T., Boynukara, B. ve Alişarlı, M. (2009a). Typing of Verotoxigenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Animal and Human Sources. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 15(2), 181-184.
- Gülhan, T., İlhan, Z., Aksakal, A. ve Solmaz, H. (2009b). Detection of Heat-stabile and Heat-labile Enterotoxins of *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy Animals. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 8(10), 2058-2062.
- Güngör, Ö. ve Baştan, A. (2004). Gebe ineklerde uygulanan aşılardan kolostrum ve buzağda IgG konsantrasyonu üzerine etkileri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 50, 7-11.
- Haas, L.F. (1999). Papyrus of Ebers and Smith. *Journal of Neurology, Neurosurgery Psychiatry*. 67(5), 578.
- Habets, A., Engelen, F., Duprez, J.N., Devleeschauwer, B., Heyndrickx, M., De Zutter, L., Thiry, D., Cox, E. and Mainil, J. (2020). Identification of Shigatoxigenic and Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotypes in Healthy Young Dairy Calves in Belgium by Recto-Anal Mucosal Swabbing. *Veterinary Science*. 7(4), 167-177.
- Hakim, A.S., Omara, S.T., Syame, S.M. and Fouad, E.A. (2017). Serotyping, antibiotic susceptibility, and virulence genes screening of *Escherichia coli* isolates obtained from diarrheic buffalo calves in Egyptian farms. *Veterinary World*. 10(7), 769-773.
- Hammermueller, J., Kruth, S., Prescott, J. and Gyles, C. (1995). Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 59(4), 265-270.

- Handl, C.E., Harel, J., Flock, J.I. and Dubreuil, J.D. (1993). High yield of active STb enterotoxin from a fusion protein (MBP-STb) expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 4(4), 275-281.
- Hang, B.P.T., Wredle, E., Börjesson, S., Svennersten Sjaunja, K., Dicksved, J. and Duse, A. (2019). High level of multidrug-resistant *Escherichia coli* in young dairy calves in southern Vietnam. *Tropical Animal Health and Production*. 51(6), 1405-1411.
- Haque, M.A., Hossain, M.T., Islam, M.S., Islam, M.Z., Islam, P., Shaha, S.N., Sikder, M.H. and Rafiq, K. (2022). Isolation of multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from sulfonamide-treated diarrheic calves. *Veterinary World*. 15(12), 2870-2876.
- Harnett, N.M. and Gyles, C.L. (1985). Enterotoxin plasmids in bovine and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* of O groups 9, 20, 64 and 101. *Canadian journal of comparative medicine*. 49(1), 79-87.
- Hart, A., Nowicki, B.J., Reisner, B., Pawelczyk, E., Goluszko, P., Urvil, P., Anderson, G. and Nowicki, S. (2001). Ampicillin-resistant *Escherichia coli* in gestational pyelonephritis: increased occurrence and association with the colonization factor Dr adhesin. *The Journal of Infectious Diseases*. 183(10), 1526-1529.
- Harville, B.A. and Dreyfus, L.A. (1995). Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2 in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infection and Immunity*. 63(3), 745-750.
- Hasan, M., Hussein, M. and Yousif, A.A. (2018). Confirmatory Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Diarrheic and Non-Diarrheic Calves by using Real Time PCR with Studying the Antimicrobial Susceptibility of these Bacteria. *Journal of Global Pharma Technology*. 10, 90-96.
- Hashish, E.A., Zhang, C., Ruan, X., Knudsen, D.E., Chase, C.C., Isaacson, R.E., Zhou, G. and Zhang, W. (2013). A multiepitope fusion antigen elicits neutralizing antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* and homologous bovine viral diarrhea virus in vitro. *Clinical and Vaccine Immunology*. 20(7), 1076-1083.
- Hasson, S., Al-busaidi, J.K. and Sallam, T.A. (2015). The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5(5), 344-353.
- Hegde, A., Bhat, G.K. and Mallya, S. (2009). Effect of stress on production of heat labile enterotoxin by *Escherichia coli*. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 27(4), 325-328.
- Heine, J., Pohlenz, J.F., Moon, H.W. and Woode, G.N. (1984). Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *The Journal of Infectious Diseases*. 150(5), 768-775.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. 68(4), 692-744.
- Hicks, S., Candy, D.C. and Phillips, A.D. (1996). Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infection and Immunity*. 64(11), 4751-4760.
- Hidaka, Y., Ohmori, K., Wada, A., Ozaki, H., Ito, H., Hirayama, T., Takeda, Y. and Shimonishi, Y. (1991). Synthesis and biological properties of carba-analogs of heat-stable enterotoxin (ST) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 176(3), 958-965.
- Hill, A.W. (1991). Vaccination of cows with rough *Escherichia coli* mutants fails to protect against experimental intramammary bacterial challenge. *Veterinary Research Community*. 15(1), 7-16.

- Hitotsubashi, S., Fujii, Y., Yamanaka, H. and Okamoto, K. (1992). Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infection and Immunity*. 60(11), 4468-4474.
- Hof, H. (2017). Candidurie! Was nun?. *Der Urologe*. 56(2), 172-179.
- Hogan, J. and Smith, K.L. (2003). Coliform mastitis. *Veterinary Research*. 34(5), 507-519.
- Hogan, J.S., Smith, K.L., Todhunter, D.A. and Schoenberger, P.S. (1992). Field trial to determine efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine. *Journal of Dairy Science*. 75(1), 78-84.
- Hogan, J.S., Weiss, W.P., Smith, K.L., Todhunter, D.A., Schoenberger, P.S. and Sordillo, L.M. (1995). Effects of an *Escherichia coli* J5 vaccine on mild clinical coliform mastitis. *Journal of Dairy Science*. 78(2), 285-290.
- Hu, S.T., Yang, M.K., Spandau, D.F. and Lee, C.H. (1987). Characterization of the terminal sequences flanking the transposon that carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene. *Gene*. 55(2-3), 157-167.
- Huang, J., Duan, Q. and Zhang, W. (2018). Significance of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Heat-Labile Toxin (LT) Enzymatic Subunit Epitopes in LT Enterotoxicity and Immunogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 84(15), e00849-18.
- Hug, M.J., Tamada, T. and Bridges, R.J. (2003). CFTR and bicarbonate secretion by [correction of to] epithelial cells. *News in Physiological Sciences*. 18, 38-42.
- Hull, R.A., Gill, R.E., Hsu, P., Minshew, B.H. and Falkow, S. (1981). Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infection and Immunity*. 33(3), 933-938.
- Hur, J., Jeon, B.W., Kim, Y.J., Oh, I.G. and Lee, J.H. (2013). *Escherichia coli* isolates from calf diarrhea in Korea and their virulent genetic characteristics. *Veterinary Medicine and Science*. 75(4), 519-522.
- Hur, J., Kim, C., Eo, S., Park, S.Y. and Lee, J. (2015). Salmonella ghosts expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* k88ab, k88ac, k99, and fasa fimbrial antigens induce robust immune responses in a mouse model. *The Veterinary Quarterly*. 35, 1-8.
- Hutchings, M.I., Truman, A.W. and Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*. 51, 72-80.
- Iglesias-Bartolome, R., Trenchi, A., Comin, R., Moyano, A.L., Nores, G.A. and Daniotti, J.L. (2009). Differential endocytic trafficking of neuropathy-associated antibodies to GM1 ganglioside and cholera toxin in epithelial and neural cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1788(12), 2526-2540.
- Iizumi, Y., Sagara, H., Kabe, Y., Azuma, M., Kume, K., Ogawa, M., Nagai, T., Gillespie, P.G., Sasakawa, C. and Handa, H. (2007). The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. *Cell Host & Microbe*. 2(6), 383-392.
- Itzhak, S., Jacob, B., Avraham, R. and Ben-Ami, P. (1992). Enhancement of the immune response by intradermal vaccination in cattle with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) vaccine without adjuvant. *Vaccine*. 10(4), 217-220.
- Izzo, M.M., Kirkland, P.D., Mohler, V.L., Perkins, N.R., Gunn, A.A. and House, J.K. (2011). Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Australian Veterinary Journal*. 89(5), 167-173.
- Jang, J., Hur, H.G., Sadowsky, M.J., Byappanahalli, M.N., Yan, T. and Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology*. 123(3), 570-581.

- Jeamsripong, S., Chase, J.A., Jay-Russell, M.T., Buchanan, R.L. and Atwill, E.R. (2019). Experimental In-Field Transfer and Survival of *Escherichia coli* from Animal Feces to Romaine Lettuce in Salinas Valley, California. *Microorganisms*. 7(10), 408.
- Jenson, A., Ghim, S.-J. and Sundberg, J. (2016). An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae (or Cow-Pox. 1798). *Experimental dermatology*. 25(3), 178-180.
- Jia, Y, Mao, W, Liu, B, Zhang, S, Cao, J and Xu, X. (2022) Study on the drug resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* isolated from calf diarrhea and the distribution of virulence genes and antimicrobial resistance genes. *Frontiers in Microbiology*. 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.992111.
- Jorgensen, J.H. and Ferraro, M.J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*. 49(11), 1749-1755.
- Kalman, D., Weiner, O.D., Goosney, D.L., Sedat, J.W., Finlay, B.B., Abo, A. and Bishop, J.M. (1999). Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nature Cell Biology*. 1(6), 389-391.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2(2), 123-140.
- Kapoor, G., Saigal, S. and Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal Anaesthesiology Clinical Pharmacology*. 33(3), 300-305.
- Kassim, A., Omuse, G., Premji, Z. and Revathi, G. (2016). Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 15, 21.
- Kathayat, D., Lokesh, D., Ranjit, S. and Rajashekara, G. (2021). Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies. *Pathogens*. 10(4), 467.
- Katz, L. and Baltz, R.H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 43(2-3) 155-176.
- Kayser, V. and Ramzan, I. (2021). Vaccines and vaccination: history and emerging issues. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 17(12), 5255-5268.
- Kehoe, M., Sellwood, R., Shipley, P. and Dougan, G. (1981). Genetic analysis of K88-mediated adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Nature*. 291(5811), 122-126.
- Kenny, B. (1999). Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Molecular Microbiology*. 31(4), 1229-1241.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A. and Finlay, B.B. (1997). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*. 91(4), 511-520.
- Keykhaei, N., Salari, S. and Rashki, A. (2021). Frequency of k99, stx1, and stx2 Virulence Factors in *Escherichia coli* isolated from Diarrheic and Clinically Healthy Suckling Calves in Sistan and Baluchistan Province, Iran. *Archives of Razi Institute*. 76(2), 283-291.
- Khachatryan, A.R., Hancock, D.D., Besser, T.E. and Call, D.R. (2004). Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(2), 752-757.

- Khan, Z.A., Siddiqui, M.F. and Park, S. (2019). Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics (Basel)*. 9(2), 49.
- Kinnula, S., Hemminki, K., Kotilainen, H., Ruotsalainen, E., Tarkka, E., Salmenlinna, S., Hallanvuori, S., Leinonen, E., Jukka, O. and Rimhanen-Finne, R. (2018). Outbreak of multiple strains of non-O157 Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* associated with rocket salad, Finland, autumn 2016. *Eurosurveillance*. 23(35), 1700666.
- Kjaergaard, A.B., Carr, A.P. and Gaunt, M.C. (2016). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection in association with acute gastroenteritis in 7 dogs from Saskatchewan. *The Canadian Veterinary Journal*. 57(9), 964-968.
- Knutton, S., Shaw, R.K., Bhan, M.K., Smith, H.R., McConnell, M.M., Cheasty, T., Williams, P.H. and Baldwin, T.J. (1992). Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. *Infection and Immunity*. 60(5), 2083-2091.
- Kobayashi, N., Nishino, K., Hirata, T. and Yamaguchi, A. (2003). Membrane topology of ABC-type macrolide antibiotic exporter MacB in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*. 546(2-3), 241-246.
- Kolenda, R., Burdukiewicz, M. and Schierack, P. (2015). A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 5, 23.
- Koo, H.L., Jiang, Z.D., Brown, E., Garcia, C., Qi, H. and Dupont, H.L. (2008). Coliform contamination of vegetables obtained from popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Clinical Infectious Diseases*. 47(2), 218-221.
- Kopic, S. and Geibel, J.P. (2010). Toxin mediated diarrhea in the 21 century: the pathophysiology of intestinal ion transport in the course of ETEC, V. cholerae and rotavirus infection. *Toxins (Basel)*. 2(8), 2132-2157.
- Kot, B. (2019). Antibiotic Resistance Among Uropathogenic *Escherichia coli*. *Polish Journal of Microbiology*. 68(4), 403-415.
- Kozak, G., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R. and Jardine, C. (2009). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Swine and Wild Small Mammals in the Proximity of Swine Farms and in Natural Environments in Ontario, Canada. *Applied and environmental microbiology*. 75, 559-566.
- Krause, W.J., Cullingford, G.L., Freeman, R.H., Eber, S.L., Richardson, K.C., Fok, K.F., Currie, M.G. and Forte, L.R. (1994). Distribution of heat-stable enterotoxin/guanylin receptors in the intestinal tract of man and other mammals. *Journal of Anatomy*. 184(2), 407-417.
- Labrie, V., Harel, J. and Dubreuil, J.D. (2002). *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) in vivo internalization within rat intestinal epithelial cells. *Veterinary Research*. 33(2), 223-228.
- Lambert, P.A. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57(10), 1471-1485.
- Lange, M.E., Uwiera, R.R.E. and Inglis, G.D. (2022). Enteric *Escherichia coli* O157:H7 in Cattle, and the Use of Mice as a Model to Elucidate Key Aspects of the Host-Pathogen-Microbiota Interaction: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*. 9, 937866.
- Lasaro, M.A., Rodrigues, J.F., Mathias-Santos, C., Guth, B.E., Regua-Mangia, A., Piantino Ferreira, A.J., Takagi, M., Cabrera-Crespo, J., Sbrogio-Almeida, M.E. and de Souza Ferreira, L.C. (2006). Production and release of heat-labile toxin by wild-type human-

- derived enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 48(1), 123-131.
- Lathem, W.W., Grys, T.E., Witowski, S.E., Torres, A.G., Kaper, J.B., Tarr, P.I. and Welch, R.A. (2002). StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Molecular Microbiology*. 45(2), 277-288.
- Lee, C.H., Moseley, S.L., Moon, H.W., Whipp, S.C., Gyles, C.L. and So, M. (1983). Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin II producers. *Infection and Immunity*. 42(1), 264-268.
- Lee, D.W., Gwack, J. and Youn, S.K. (2012). Enteropathogenic *Escherichia coli* Outbreak and its Incubation Period: Is it Short or Long?. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 3(1), 43-47.
- Lee, J.B., Kim, S.K. and Yoon, J.W. (2022). Pathophysiology of enteropathogenic *Escherichia coli* during a host infection. *Journal of Veterinary Science*. 23(2), 28.
- Leimbach, A., Hacker, J. and Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 358, 3-32.
- LeJeune, J.T., Besser, T.E. and Hancock, D.D. (2001). Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(7), 3053-3057.
- Lerminiaux, N.A. and Cameron, A.D.S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*. 65(1), 34-44.
- Li, Y., Frey, E., Mackenzie, A.M. and Finlay, B.B. (2000). Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. *Infection and Immunity*. 68(9), 5090-5095.
- Lim, J.Y., Yoon, J. and Hovde, C.J. (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(1), 5-14.
- Lim, M.A., Kim, J.Y., Acharya, D., Bajgain, B.B., Park, J.H., Yoo, S.J. and Lee, K. (2020). A Diarrhoeagenic Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Infection Outbreak That Occurred among Elementary School Children in Gyeongsangbuk-Do Province of South Korea Was Associated with Consumption of Water-Contaminated Food Items. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 17(9), 3149.
- Lin, J., Hogan, J.S., Aslam, M. and Smith, K.L. (1998). Immunization of cows with ferric enterobactin receptor from coliform bacteria. *Journal of Dairy Science*. 81(8), 2151-2158.
- Lin, X.Q., O'Reilly, K.L., Storz, J., Purdy, C.W. and Loan, R.W. (2000). Antibody responses to respiratory coronavirus infections of cattle during shipping fever pathogenesis. *Archives of Virology*. 145(11), 2335-2349.
- Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A.V., Guo, X., Cao, H., Wang, Q., Reeves, P.R., Knirel, Y.A., Wang, L. and Widmalm, G. (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiology Reviews*. 44(6), 655-683.
- Liu, B., Wu, F., Li, D., Beutin, L., Chen, M., Cao, B. and Wang, L. (2009). Development of a serogroup-specific DNA microarray for identification of *Escherichia coli* strains associated with bovine septicemia and diarrhea. *Veterinary microbiology*. 142, 373-378.
- Liu, C.M., Stegger, M., Aziz, M., Johnson, T.J., Waits, K., Nordstrom, L., Gauld, L., Weaver, B., Rolland, D., Statham, S., Horwinski, J., Sariya, S., Davis, G.S., Sokurenko, E., Keim, P., Johnson, J.R. and Price, L.B. (2018). *Escherichia coli* ST131-H22 as a Foodborne Uropathogen. *mBio*. 9(4). doi: 10.1128/mBio.00470-18.

- Liu, J.K., Wei, C.H., Hou, X.L. and Yu, L.Y. (2014). Passive protection of mice pups through oral or intranasal immunization of dams with recombinant *Lactobacillus casei* vaccine against ETEC F41. *Research in Veterinary Science*. 96(2), 283-287.
- Liu, L., Hägglund, S., Hakhverdyan, M., Alenius, S., Larsen, L.E. and Belák, S. (2006). Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(3), 957-960.
- Liu, W., Yuan, C., Meng, X., Du, Y., Gao, R., Tang, J. and Shi, D. (2014). Frequency of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from suckling pigs with diarrhoea in China. *Journal of Veterinary Science* 199(2), 286-289.
- Lotfollahzadeh, S., Madadgar, O., Mohebbi M.R., Mokhber M.R.D. and Watson, G.D. (2020). Bovine coronavirus in neonatal calf diarrhoea in Iran. *Veterinary Medicine and Science*. 6(4), 686-694.
- Ludwig, A., Bauer, S., Benz, R., Bergmann, B. and Goebel, W. (1999). Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*. 31(2), 557-567.
- Lukjancenko, O., Wassenaar, T.M. and Ussery, D.W. (2010). Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microbial Ecology*. 60(4), 708-720.
- MacKenzie, W.R., Schell, W.L., Blair, K.A., Addiss, D.G., Peterson, D.E., Hoxie, N.J., Kazmierczak, J.J. and Davis, J.P. (1995). Massive outbreak of waterborne cryptosporidium infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clinical Infectious Diseases*. 21(1), 57-62.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T. and 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 Infections*. 18(3), 268-281.
- Mainga, A.O., Cenci-Goga, B.T., Malahlela, M.N., Tshuma, T., Kalake, A. and Karama, M. (2018). Occurrence and characterization of seven major Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes from healthy cattle on cow-calf operations in South Africa. *Zoonoses Public Health*. 65(7), 777-789.
- Mainil, J. (1999). Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Veterinary Research*. 30(2-3), 235-257.
- Mainil, J.G., Jacquemin, E., Pohl, P., Kaeckenbeeck, A. and Benz, I. (2002). DNA sequences coding for the F18 fimbriae and AIDA adhesin are localised on the same plasmid in *Escherichia coli* isolates from piglets. *Veterinary Microbiology*. 86(4), 303-311.
- Majoul, I., Ferrari, D. and Soling, H.D. (1997). Reduction of protein disulfide bonds in an oxidizing environment. The disulfide bridge of cholera toxin A-subunit is reduced in the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters*. 401(2-3), 104-108.
- Mammarappallil, J.G. and Elsinghorst, E.A. (2000). Epithelial cell adherence mediated by the enterotoxigenic *Escherichia coli* tia protein. *Infection and Immunity*. 68(12), 6595-6601.
- Maravić Vlahovicek, G., Cubrilo, S., Tkaczuk, K.L. and Bujnicki, J.M. (2008). Modeling and experimental analyses reveal a two-domain structure and amino acids important for the activity of aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1784(4), 582-590.

- Martins, F.H., Kumar, A., Abe, C.M., Carvalho, E., Nishiyama-Jr, M., Xing, C., Sperandio, V. and Elias, W.P. (2020). EspFu-Mediated Actin Assembly Enhances Enteropathogenic *Escherichia coli* Adherence and Activates Host Cell Inflammatory Signaling Pathways. *mBio*. 11(2). doi: 10.1128/mBio.00617-20.
- Martorelli, L., Garimano, N., Fiorentino, G.A., Vilte, D.A., Garbaccio, S.G., Barth, S.A., Menge, C., Ibarra, C., Palermo, M.S. and Cataldi, A. (2018). Efficacy of a recombinant Intimin, EspB and Shiga toxin 2B vaccine in calves experimentally challenged with *Escherichia coli* O157:H7. *Vaccine*. 36(27), 3949-3959.
- Maule, A. (2000). Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. *Society for Applied Microbiology*. 29, 71-78.
- McNeilly, T.N., Mitchell, M.C., Corbishley, A., Nath, M., Simmonds, H., McAteer, S.P., Mahajan, A., Low, J.C., Smith, D.G., Huntley, J.F., Gally, D.F. (2015). Optimizing the Protection of Cattle against *Escherichia coli* O157:H7 Colonization through Immunization with Different Combinations of H7 Flagellin, Tir, Intimin-531 or EspA. *PLoS One*. 10(5). e0128391.
- McNeilly, T.N., Mitchell, M.C., Nisbet, A.J., McAteer, S., Erridge, C., Inglis, N.F., Smith, D.G., Low, J.C., Gally, D.L., Huntley, J.F., Mahajan, A. (2010b). IgA and IgG antibody responses following systemic immunization of cattle with native H7 flagellin differ in epitope recognition and capacity to neutralise TLR5 signalling. *Vaccine*. 28(5), 1412-1421.
- McNeilly, T.N., Mitchell, M.C., Rosser, T., McAteer, S., Low, J.C., Smith, D.G., Huntley, J.F., Mahajan, A., Gally, D.L. (2010a). Immunization of cattle with a combination of purified intimin-531, EspA and Tir significantly reduces shedding of *Escherichia coli* O157:H7 following oral challenge. *Vaccine*. 28(5), 1422-1428.
- McNeilly, T.N., Naylor, S.W., Mahajan, A., Mitchell, M.C., McAteer, S., Deane, D., Smith, D.G., Low, J.C., Gally, D.L., Huntley, J.F. (2008). *Escherichia coli* O157:H7 colonization in cattle following systemic and mucosal immunization with purified H7 flagellin. *Infection and Immunity*. 76(6), 2594-2602.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. and Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*. 5(5), 607-625.
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V. and Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics and Development*. 15(6), 589-594.
- Mellata, M. (2013). Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathogens and Disease*. 10(11), 916-932.
- Menard L.P. and Dubreuil, J.D. (2002). Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(1), 43-60.
- Menard, L.P., Lussier, J.G., Lepine, F., Paiva de Sousa, C. and Dubreuil, J.D. (2004). Expression, purification, and biochemical characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1. *Protein Expression and Purification*. 33(2), 223-231.
- Merritt, E.A., Pronk, S.E., Sixma, T.K., Kalk, K.H., van Zanten, B.A. and Hol, W.G. (1994). Structure of partially-activated *E. coli* heat-labile enterotoxin (LT) at 2.6 Å resolution. *FEBS Letters*. 337(1), 88-92.
- Mirhoseini, A., Amani, J. and Nazarian, S. (2018). Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. *Microbial Pathogenesis*. 117, 162-169.

- Mirsepasi-Lauridsen, H.C., Vallance, B.A., Krogfelt, K.A. and Petersen, A.M. (2019). *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 32(2). doi: 10.1128/CMR.00060-18.
- Mitsuoka, T. and Hayakawa, K. (1973). The fecal flora in man. I. Composition of the fecal flora of various age groups. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*. 223(2), 333-342.
- Moffatt, J.H., Harper, M. and Boyce, J.D. (2019). Mechanisms of Polymyxin Resistance. *Advances in experimental medicine and biology*. 1145, 55-71.
- Mohr, K.I. (2016). History of Antibiotics Research. *Current topics in microbiology and immunology*. 398, 237-272.
- Momtaz, H., Farzan, R., Rahimi, E., Safarpour Dehkordi, F. and Souod, N. (2012). Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ruminant and donkey raw milk samples and traditional dairy products in Iran. *ScientificWorldJournal*. 2012, 231-342.
- Mooi, F.R., de Graaf, F.K. and van Embden, J.D. (1979). Cloning, mapping and expression of the genetic determinant that encodes for the K88ab antigen. *Nucleic acids research*. 6(3), 849-865.
- Mooi, F.R., Harms, N., Bakker, D. and de Graaf, F.K. (1981). Organization and expression of genes involved in the production of the K88ab antigen. *Infection and Immunity*. 32(3), 1155-1163.
- Moon, H.W. and Bunn, T.O. (1993). Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. *Vaccine*. 11(2), 213-200.
- Moreno, A.C., Ferreira, L.G. and Martinez, M.B. (2009). Enteroinvasive *Escherichia coli* vs. *Shigella flexneri*: how different patterns of gene expression affect virulence. *FEMS Microbiology Letters*. 301(2), 156-163.
- Morimoto, K., Shimizu, M., Kurose, T., Nakatani, K., Akita, S., Shinozuka, Y. and Isobe, N. (2011). Efficacy of enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine for bovine clinical mastitis. *The Journal of dairy research*. 78(2), 149-153.
- Mosier, D.A. and Oberst, R.D. (2000). Cryptosporidiosis. A global challenge. *Annals of the New York Academy of Sciences journal*. 9(16), 102-111.
- Munita, J.M. and Arias, C.A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. 4(2). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Naderi, Z., Ghanbarpour, R. and Sami, M. (2016). Antimicrobial Resistance Characteristics and Phylogenetic Groups of *Escherichia coli* Isolated From Diarrheic Calves in Southeast of Iran. *Journal of Enteric Pathogens*. 4(4), 21-27.
- Nagy B. (1980). Vaccination of cows with a K99 extract to protect newborn calves against experimental enterotoxic colibacillosis. *Infection and Immunity*. 27(1), 21-24.
- Nagy, B. and Fekete, P.Z. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of medical microbiology*. 295(6-7), 443-454.
- Nair, G.B. and Takeda, Y. (1998). The heat-stable enterotoxins. *Microbial Pathogenesis*. 24(2), 123-131.
- Nataro, J., Steiner, T. and Guerrant, R. (1998). Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*. 4, 251-261.
- Nataro, J.P. and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(1), 142-201.

- Nataro, J.P., Deng, Y., Cookson, S., Cravioto, A., Savarino, S.J., Guers, L.D., Levine, M.M. and Tacket, C.O. (1995). Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *The Journal of Infectious Diseases*. 171(2), 465-468.
- Nataro, J.P., Deng, Y., Maneval, D.R., German, A.L., Martin, W.C. and Levine, M.M. (1992). Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infection and Immunity*. 60(6), 2297-2304.
- Nataro, J.P., Mai, V., Johnson, J., Blackwelder, W.C., Heimer, R., Tirrell, S., Edberg, S.C., Braden, C.R., Glenn Morris, J., Jr. and Hirshon, J.M. (2006). Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clinical Infectious Diseases*. 43(4), 402-407.
- Nawar, H.F., Berenson, C.S., Hajishengallis, G., Takematsu, H., Mandell, L., Clare, R.L. and Connell, T.D. (2010). Binding to gangliosides containing N-acetylneuraminic acid is sufficient to mediate the immunomodulatory properties of the nontoxic mucosal adjuvant LT-IIb(T13I). *Clinical and Vaccine Immunology*. 17(6), 969-978.
- Neu, H.C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science*. 257(5073), 1064-1073.
- Ngeleka, M., Godson, D., Vanier, G., Desmarais, G., Wojnarowicz, C., Sayi, S., Huang, Y., Movasseggi, R. and Fairbrother, J.M. (2019). Frequency of *Escherichia coli* virotypes in calf diarrhea and intestinal morphologic changes associated with these virotypes or other diarrheagenic pathogens. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 31(4), 611-615.
- Ngeleka, M., Pritchard, J., Appleyard, G., Middleton, D.M. and Fairbrother, J.M. (2003). Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 15(3), 242-252.
- Nicolaou, K.C. and Rigol, S. (2018). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of Antibiotics*. 71(2), 153-184.
- Niewerth, U., Frey, A., Voss, T., Le Bouguenec, C., Baljer, G., Franke, S. and Schmidt, M.A. (2001). The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 8(1), 143-149.
- Nikaido, H. (2000). Crossing the envelope: how cephalosporins reach their targets. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 6(3), 22-26.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(4), 593-656.
- Nuhay, Ç. Ve Gülhan, T. (2017). Samsun İli ve İlçelerinde Yetiştirilen Anadolu Mandallarının Dışkı Örneklerinde *Escherichia coli* O157:H7'nin Tespiti. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 28(1), 39-45.
- Ochi, S., Shimizu, T., Ohtani, K., Ichinose, Y., Arimitsu, H., Tsukamoto, K., Kato, M. and Tsuji, T. (2009). Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. 16(5), 299-309.
- Ochman, H. and Selander, R.K. (1984). Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *Journal of Bacteriology*. 157(2), 690-693.
- Ochoa, T.J. and Contreras, C.A. (2011). Enteropathogenic *escherichia coli* infection in children. *Current opinion in infectious diseases*. 24(5), 478-483.

- Ochoa, T.J., Barletta, F., Contreras, C. and Mercado, E. (2008). New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102(9), 852-856.
- OIE. (2021). OIE List of Antimicrobials of Veterinary Importance. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/oie-list-antimicrobials.pdf> [Erişim Nisan 20, 2023].
- Okamoto, K. and Takahara, M. (1990). Synthesis of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STp as a pre-pro form and role of the pro sequence in secretion. *Journal of Bacteriology*. 172(9), 5260-5265.
- Okamoto, K., Baba, T., Yamanaka, H., Akashi, N. and Fujii, Y. (1995). Disulfide bond formation and secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Journal of Bacteriology*. 177(16), 4579-4586.
- Okamoto, K., Yukitake, J., Kawamoto, Y. and Miyama, A. (1987). Substitutions of cysteine residues of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin by oligonucleotide-directed mutagenesis. *Infection and Immunity*. 55(9), 2121-2125.
- Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., García, S., Cid, D., de la Fuente, R. (1999). In Vitro Activities of Cephalosporins and Quinolones against *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrheic Dairy Calves. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43(3), 510-513.
- Orskov, I., Orskov, F., Sojka, W.J. and Leach, J.M. (1961). Simultaneous occurrence of *E. coli* B and Lantigens in strains from diseased swine. Influence of cultivation temperature. Two new *E. coli* Kantigens: K 87 and K 88. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 53, 404-422.
- Oscarsson, J., Mizunoe, Y., Li L., Lai, X.H., Wieslander, A. and Uhlin, B.E. (1999). Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 32(6), 1226-1238.
- Osman, K.M., Mustafa, A.M., Elhariri, M. and Abdelhamed, G.S. (2013). The distribution of *Escherichia coli* serovars, virulence genes, gene association and combinations and virulence genes encoding serotypes in pathogenic *E. coli* recovered from diarrhoeic calves, sheep and goat. *Transboundary and emerging diseases*. 60(1), 69-78.
- Pabst, W.L., Altwegg, M., Kind, C., Mirjanic, S., Hardegger, D. and Nadal, D. (2003). Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* among children with and without diarrhea in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(6), 2289-2293.
- Paciorek J. (2002). Virulence properties of *Escherichia coli* faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serogroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhoea. *Journal of medical microbiology*. 51(7), 548-571.
- Pallasch, T.J. (1986). Antibiotics: past, present, and future. *CDA Journal*. 14(5), 65-68.
- Pallvarnanathasamy, D., Saravanan, S. and Perianayagasamy, A. (2010). Disease management by vaccination using *Escherichia coli* antigens. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 4, 119-122.
- Paredes-Paredes, M., Okhuysen, P.C., Flores, J., Mohamed, J.A., Padda, R.S., Gonzalez-Estrada, A., Haley, C.A., Carlin, L.G., Nair, P. and DuPont, H.L. (2011). Seasonality of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in the US students acquiring diarrhea in Mexico. *Journal of travel medicine*. 18(2), 121-125.
- Parish, A. and Holliday, K. (2012). Long-term care acquired urinary tract infections' antibiotic resistance patterns and empiric therapy: a pilot study. *Geriatric Nursing*. 33(6), 473-478.

- Parma, A.E., Sanz, M.E., Blanco, J.E., Blanco, J., Vinas, M.R., Blanco, M., Padola, N.L. and Etcheverria, A.I. (2000). Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. *European journal of epidemiology*. 16(8), 757-762.
- Patel, S.K., Dotson, J., Allen, K.P. and Fleckenstein, J.M. (2004). Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 72(3), 1786-1794.
- Pawlowski, S.W., Warren, C.A. and Guerrant, R. (2009). Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterology*. 136(6), 1874-1886.
- Pearce, M.C., Jenkins, C., Vali, L., Smith, A.W., Knight, H.I., Cheasty, T., Smith, H.R., Gunn, G.J., Woolhouse, M.E., Amyes, S.G. and Frankel, G. (2004). Temporal shedding patterns and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, O145, and O157 in a cohort of beef calves and their dams. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(3), 1708-1716.
- Pereira, R.V., Siler, J.D., Ng, J.C., Davis, M.A. and Warnick, L.D. (2014). Effect of preweaned dairy calf housing system on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science*. 97(12), 7633-7643.
- Pérez-Pérez, F.J. and Hanson, N.D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(6), 2153-2162.
- Perna, A., Hay, E., Contieri, M., De Luca, A., Guerra, G. and Lucariello, A. (2020). Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC): Cause or consequence of inflammation, dysbiosis, and rupture of cellular joints in patients with IBD?. *Journal of cellular physiology*. 235(6), 5041-5049.
- Perna, N.T., Mayhew, G.F., Posfai, G., Elliott, S., Sonnenberg, M.S., Kaper, J.B. and Blattner, F.R. (1998). Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*. 66(8), 3810-3817.
- Peterson, E. and Kaur, P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 9, 2928.
- Pham, T.Q., Goluszko, P., Popov, V., Nowicki, S. and Nowicki, B.J. (1997). Molecular cloning and characterization of Dr-II, a nonfimbrial adhesin-I-like adhesin isolated from gestational pyelonephritis-associated *Escherichia coli* that binds to decay-accelerating factor. *Infection and Immunity*. 65(10), 4309-4318.
- Picco, N.Y., Alustiza, F.E., Bellingeri, R.V., Grosso, M.C., Motta, C.E., Larriestra, A.J., Vissio, C., Tiranti, K.I., Terzolo, H.R., Moreira, A.R. and Vivas A.B. (2015). Molecular screening of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from dairy neonatal calves in Cordoba province, Argentina. *Revista Argentina de microbiología*. 47(2), 95-102.
- Picco, N.Y., Alustiza, F.E., Bellingeri, R.V., Grosso, M.C., Motta, C.E., Larriestra, A.J., Vissio, C., Tiranti, K.I., Terzolo, H.R., Moreira, A.R. and Vivas, A.B. (2015). Molecular screening of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from dairy neonatal calves in Cordoba province, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 47(2), 95-102.
- Picken, R.N., Mazaitis, A.J., Maas, W.K., Rey, M. and Heyneker, H. (1983). Nucleotide sequence of the gene for heat-stable enterotoxin II of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 42(1), 269-275.
- Pienaar, J.A., Singh, A. and Barnard, T.G. (2019). Acid-happy: Survival and recovery of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in simulated gastric fluid. *Microbial Pathogenesis*. 128, 396-404.

- Potter, A.A., Klashinsky, S., Li Y., Frey, E., Townsend, H., Rogan, D., Erickson, G., Hinkley, S., Klopfenstein, T., Moxley, R.A., Smith, D.R and Finlay, B.B. (2004). Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine*. 22(3-4), 362-369.
- Poulsen, L.K., Lan, F., Kristensen, C.S., Hobolth, P., Molin, S. and Krogfelt, K.A. (1994). Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization. *Infection and Immunity*. 62(11), 5191-5194.
- Pourtaghi, H. and Sodagari, H.R. (2016). Antimicrobial Resistance of Enteroxigenic and Non-Enteroxigenic *Escherichia coli* Isolated From Diarrheic Calves in Iran. *International Journal of Enteric Pathogens*. 4 (2). doi: 10.17795/ijep34557.
- Prieto, A., López-Novo, C., Díaz, P.; Díaz-Cao, J.M., López-Lorenzo, G., Antón, C., Remesar, S., García-Dios, D., López, C., Panadero, R., Díez-Baños, P., Morrondo, P. and Fernández, G. (2022) Antimicrobial Susceptibility of Enterotoxigenic *Escherichia coli* from Diarrhoeic Neonatal Calves in Spain. *Animals*. 12(3), 264.
- Puligundla, P. and Lim, S. (2022). Biocontrol Approaches against *Escherichia coli* O157:H7 in Foods. *Foods*. 11(5), 756.
- Ramboarina, S., Fernandes, P.J., Daniell, S., Islam, S., Simpson, P., Frankel, G., Booy, F., Donnenberg, M.S. and Matthews, S. (2005). Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*. 280(48), 40252-40260.
- Rasheed, J.K., Guzman-Verduzco, L.M. and Kupersztach, Y.M. (1990). Two precursors of the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: evidence of extracellular processing. *Molecular Microbiology*. 4(2), 265-273.
- Rausch, D., Ruan, X., Nandre, R., Duan, Q., Hashish, E., Casey, T.A. and Zhang, W. (2017). Antibodies derived from a toxoid MEFA (multiepitope fusion antigen) show neutralizing activities against heat-labile toxin (LT), heat-stable toxins (STa, STb), and Shiga toxin 2e (Stx2e) of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Veterinary Microbiology*. 202, 79-89.
- Razzaque, M., Bedair, M. and Al-Mutawa, S. (2009). Economic Impact Of Calf Mortality On Dairy Farms In Kuwait. *Pakistan Veterinary Journal*. 29(3), 97-101.
- Reygaert, W.C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*. 4(3), 482-501.
- Rhouma, M., Fairbrother, J.M., Beaudry, F. and Letellier, A. (2017). Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta veterinaria Scandinavica*. 59(1), 31.
- Ribeiro da Cunha, B., Fonseca, L.P. and Calado, C.R.C. (2019). Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go? *Antibiotics (Basel)*. 8(2), 45.
- Riedel, S. (2005). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proceedings / Baylor University Medical Center*. 18(1), 21-25.
- Rigobelo, E.C., Gamez, H.J., Marin, J.M., Macedo, C., Ambrosin, J.A. and Ávila, F.A. (2006). Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 58 (3), 305-310.
- Robins-Browne, R.M. (1987). Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Reviews of infectious diseases*. 9(1), 28-53.
- Rodighiero, C., Aman, A.T., Kenny, M.J., Moss, J., Lencer, W.I. and Hirst, T.R. (1999). Structural basis for the differential toxicity of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Construction of hybrid toxins identifies the A2-domain as the

- determinant of differential toxicity. *The Journal of biological chemistry*. 274(7), 3962-3969.
- Romanowska, J., Reuter, N. and Trylska, J. (2013). Comparing aminoglycoside binding sites in bacterial ribosomal RNA and aminoglycoside modifying enzymes. *Proteins*. 81(1), 63-80.
- Roth, J.A. (2011). Veterinary Vaccines and Their Importance to Animal Health and Public Health. *Procedia in vaccinology*. 5, 127-136.
- Rousset, E., Harel, J. and Dubreuil, J.D. (1998). Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. *Infection and Immunity*. 66(12), 5650-5658.
- Russo, D., Capolupo, L., Loomba, J.S., Sticco, L. and D'Angelo, G. (2018). Glycosphingolipid metabolism in cell fate specification. *Journal of cell science*. 131(24). doi: 10.1242/jcs.219204.
- Russo, T.A. and Johnson, J.R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and infection*. 5(5), 449-456.
- Ryu, J.H., Kim, S., Park, J. and Choi, K.S. (2020). Characterization of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from pre-weaned calves in the Republic of Korea. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 62(1), 45-52.
- Salah, H.M., Ali, H.M. and Abdulrahman, Y.A. (2019). Confirmatory Detection of *Escherichia coli* O157: H7 in Diarrhoeic and Non-Diarrhoeic Calves by using real time PCR with Studying the Antimicrobial Susceptibility of these bacteria. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 12 (1), 245-250.
- Salaheen, S., Kim, S.W., Cao, H., Wolfgang, D.R., Hovingh, E., Karns, J.S., Haley, B.J. and Van Kessel, J.A.S. (2019). Antimicrobial Resistance Among *Escherichia coli* Isolated from Veal Calf Operations in Pennsylvania. *Foodborne Pathogens and Disease*. 16(1), 74-80.
- Sancak, S. ve Gülhan, T. (2021). Gebe Sığırlarda İnaktif *Escherichia coli* Aşısının Kolostrum ve Buzağı Kan Serumlarındaki IgG Seviyelerine Etkileri. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*. 6(3), 318-324.
- Sarantuya, J., Nishi, J., Wakimoto, N., Erdene, S., Nataro, J.P., Sheikh, J., Iwashita, M., Manago, K., Tokuda, K., Yoshinaga, M., Miyata, K. and Kawano, Y. (2004). Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(1), 133-139.
- Sato, K., Bartlett, P.C. and Saeed, M.A. (2005). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from dairy farms using organic versus conventional production methods. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 226(4), 589-594.
- Savarino, S.J., Fasano, A., Robertson, D.C., Levine, M.M. (1991). Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *The Journal of clinical investigation*. 87(4), 1450-1455.
- Savarino, S.J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B.M., Levine, M.M., Guandalini, S. and Guerry, P. (1993). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90(7), 3093-3097.
- Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M.K., Levine, M.M. and Fasano, A. (1996). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable

- enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *The Journal of Infectious Diseases*. 173(4), 1019-1022.
- Scaletsky, I.C., Silva, M.L. and Trabulsi, L.R. (1984). Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infection and Immunity*. 45(2), 534-536.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L. and Griffin, P.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. 17(1), 7-15.
- Schamberger, G.P., Phillips, R.L., Jacobs, J.L. and Diez-Gonzalez, F. (2004). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed. *Applied and environmental microbiology*. 70(10), 6053-6060.
- Schlör, S., Riedl, S., Blass, J. and Reidl, J. (2000). Genetic rearrangements of the regions adjacent to genes encoding heat-labile enterotoxins (eltAB) of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Applied and environmental microbiology*. 66(1), 352-358.
- Schmidt, H., Henkel, B. and Karch, H. (1997). A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiology Letters*. 148(2), 265-272.
- Schmidt, H., Karch, H. and Beutin, L. (1994). The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiology Letters*. 117(2), 189-196.
- Schmidt, N., Barth, S.A., Frahm, J., Meyer, U., Dänicke, S., Geue, L. and Menge, C. (2018). Decreased STEC shedding by cattle following passive and active vaccination based on recombinant *Escherichia coli* Shiga toxoids. *Veterinary Research*. 49(1), 28.
- Schrack, F.N., Hockett, M.E., Saxton, A.M., Lewis, M.J., Dowlen, H.H. and Oliver, S.P. (2001). Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *Journal of Dairy Science*. 84(6), 1407-1412.
- Scotland, S.M., Day, N.P. and Rowe, B. (1983). Acquisition and maintenance of enterotoxin plasmids in wild-type strains of *Escherichia coli*. *The Journal of General Microbiology*. 129(10), 3111-3120.
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C. and Abe, A. (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(20), 11638-11643.
- Sekizaki, T., Akashi, H. and Terakado, N. (1985). Nucleotide sequences of the genes for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I of bovine, avian, and porcine origins. *American Journal of Veterinary Research*. 46(4), 909-912.
- Servin, A.L. (2005). Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 18(2), 264-292.
- Shahrani, M., Dehkordi, F.S. and Momtaz, H. (2014). Characterization of *Escherichia coli* virulence genes, pathotypes and antibiotic resistance properties in diarrheic calves in Iran. *Biological Research*. 47(1), 28.
- Shaler, C.R., Elhenawy, W. and Coombes, B.K. (2019). The Unique Lifestyle of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. 431(16), 2970-2981.
- Shams, Z., Tahamtan, Y., Pourbakhsh, A., Hosseiny, M.H., Kargar, M. and Hayati, M. (2012). Detection of enterotoxigenic K99 (F5) and F41 from fecal sample of calves by molecular and serological methods. *Comparative Clinical Pathology*. 21(4), 475-478.

- Sharma, V.K., Dean-Nystrom, E.A. and Casey, T.A. (2011). Evaluation of hha and hha sepB mutant strains of *Escherichia coli* O157:H7 as bacterins for reducing *E. coli* O157:H7 shedding in cattle. *Vaccine*. 29(31), 5078-5086.
- Sherlock, O., Vejborg, R.M. and Klemm, P. (2005). The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infection and Immunity*. 73(4), 1954-1963.
- Shulman, S.T., Friedmann, H.C. and Sims, R.H. (2007). Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician. *Clinical Infectious Diseases*. 45(8), 1025-1029.
- Sims, G.E. and Kim, S.H. (2011). Whole-genome phylogeny of *Escherichia coli*/Shigella group by feature frequency profiles (FFPs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(20), 8329-8334.
- Smelov, V., Naber, K. and Johansen, T. (2016). Improved Classification of Urinary Tract Infection: Future Considerations. *European Urology Supplements*. 15. doi.org/10.1016/J.EURSUP.2016.04.002.
- Smith H.W. and Halls S. (1968). The production of oedema disease and diarrhoea in weaned pigs by the oral administration of *Escherichia coli*: factors that influence the course of the experimental disease. *Journal of medical microbiology*. 1(1), 45-59.
- Smith H.W. and Linggood M.A. (1971). Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. *Journal of medical microbiology*. 4(4), 467-485.
- Smith, D.R., Moxley, R.A., Klopfenstein, T.J. and Erickson, G.E. (2009). A randomized longitudinal trial to test the effect of regional vaccination within a cattle feedyard on *Escherichia coli* O157:H7 rectal colonization, fecal shedding, and hide contamination. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6(7), 885-892.
- Smith, D.R., Moxley, R.A., Peterson, R.E., Klopfenstein, T.J., Erickson, G.E. and Clowser, S.L. (2008). A two-dose regimen of a vaccine against *Escherichia coli* O157:H7 type III secreted proteins reduced environmental transmission of the agent in a large-scale commercial beef feedlot clinical trial. *Foodborne Pathogens and Disease*. 5(5), 589-598.
- Smith, H.W. and Gyles, C.L. (1970). The effect of cell-free fluids prepared from cultures of human and animal enteropathogenic strains of *Escherichia coli* on ligated intestinal segments of rabbits and pigs. *Journal of medical microbiology*. 3(3), 403-409.
- Snodgrass, D.R., Nagy, L.K., Sherwood, D. and Campbell, I. (1982). Passive immunity in calf diarrhea: vaccination with K99 antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* and rotavirus. *Infection and Immunity*. 37(2), 586-591.
- Sobhy, N.M., Yousef, S.G.A., Aboubakr, H.A., Nisar, M., Nagaraja, K.V., Mor, S.K., Valeris-Chacin, R.J. and Goyal, S.M. (2020). Virulence factors and antibiograms of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves of Egyptian cattle and water buffaloes. *PLoS One*. 15(5). e0232890.
- Sojka, W.J., Wray, C., Shreeve, J. and Benson, A.J. (1977). Incidence of salmonella infection in animals in England and Wales 1968--1974. *Journal of Hygiene*. 78(1), 43-56.
- Solmaz, H., İlhan, Z., Aksakal, A. ve Taşal İ. (2009). Evaluation of R mutant *Escherichia coli* J5 bacterin vaccine against coliform mastitis in cows. *Indian Veterinary Journal*. 86, 663-664.
- Spagnolo, F., Trujillo, M. and Dennehy, J.J. (2021). Why Do Antibiotics Exist?. *mBio*. 12(6). e0196621.
- Spitzer, F., Vahjen, W., Pieper, R., Martinez-Vallespin, B. and Zentek, J. (2014). A standardised challenge model with an enterotoxigenic F4+ *Escherichia coli* strain in

- piglets assessing clinical traits and faecal shedding of *stx* and *est-II* toxin genes. *Archives of Animal Nutrition*. 68(6), 448-459.
- Srivani, M., Reddy, Y.N., Subramanyam, K.V. and Lakshman, M. (2022). Association Between Virulence Genes and Serogroups of *Escherichia coli* Isolates from Calves. *Journal of Animal Research*. 12(3), 439-446.
- Staples, M., Doyle, C.J., Graham, R.M. and Jennison, A.V. (2013). Molecular epidemiological typing of enteropathogenic *Escherichia coli* strains from Australian patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 75(3), 320-324.
- Steele, A.D., Geyer, A. and Gerdes, G.H. (2004). Rotavirus infections. *Oxford University Press Southern Africa, Cape Town*. 2nd edition.
- Steele, N.M., Swartz, T.H., Enger, K.M., Schramm, H., Cockrum, R.R., Lacy-Hulbert, S.J., White, R.R., Hogan, J. and Petersson-Wolfe, C.S. (2019). The effect of J5 bacterins on clinical, behavioral, and antibody response following an *Escherichia coli* intramammary challenge in dairy cows at peak lactation. *Journal of Dairy Science*. 102(12), 11233-11249.
- Stone, K.D., Zhang, H.Z., Carlson, L.K. and Donnenberg, M.S. (1996). A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Molecular Microbiology*. 20(2), 325-337.
- Subramaniam, G. and Girish, M. (2020). Antibiotic Resistance - A Cause for Reemergence of Infections. *Indian Journal of Pediatrics*. 87(11), 937-944.
- Sukumar, M., Rizo, J., Wall, M., Dreyfus, L.A., Kupersztoch, Y.M. and Gierasch L.M. (1995). The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. *Protein Science*. 4(9), 1718-1729.
- Syed, S.A., Abrams, G.D. and Freter, R. (1970). Efficiency of various intestinal bacteria in assuming normal functions of enteric flora after association with germ-free mice. *Infection and Immunity*. 2(4), 376-386.
- Syngal, S., Brand, R.E., Church, J.M., Giardiello, F.M., Hampel, H.L. and Burt, R.W. (2015). ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *The American Journal of Gastroenterology*. 110(2), 223-262.
- Tabasi, M., Karam, M.R., Habibi, M., Mostafavi, E. and Bouzari, S. (2016). Genotypic Characterization of Virulence Factors in *Escherichia coli* Isolated from Patients with Acute Cystitis, Pyelonephritis and Asymptomatic Bacteriuria. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 10(12), 1-7.
- Taghadosi, R., Shakibaie, M.R., Alizade, H., Hosseini-Nave, H., Askari, A. and Ghanbarpour, R. (2018). Serogroups, subtypes and virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from human, calves and goats in Kerman, Iran. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*. 11(1), 60-67.
- Takashi, K., Fujita, I. and Kobari, K. (1989). Effects of short chain fatty acids on the production of heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 50(4), 495-498.
- Takeda, T., Takeda, Y., Aimoto, S., Takao, T., Ikemura, H., Shimonishi, Y. and Miwatani, T. (1983). Neutralization of activity of two different heat-stable enterotoxins (STh and STp) of enterotoxigenic *Escherichia coli* by homologous and heterologous antisera. *FEMS Microbiology Letters*. 20(3), 357-359.
- Tavechio, A.T., Marques, L.R., Abe, C.M. and Gomes, T.A. (2004). Detection of cytotoxic necrotizing factor types 1 and 2 among fecal *Escherichia coli* isolates from Brazilian children with and without diarrhea. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99(1), 81-83.

- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. and Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 8(3), 207-217.
- Terlizzi, M., Gribaudo, G. and Maffei, M. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1566.
- Theuretzbacher, U., Bush, K., Harbarth, S., Paul, M., Rex, J.H., Tacconelli, E. and Thwaites, G.E. (2020). Critical analysis of antibacterial agents in clinical development. *Nature Reviews Microbiology*. 18(5), 286-298.
- Thiry, D., Saulmont, M., Takaki, S., De Rauw, K., Duprez, J.N., Iguchi, A., Piérard, D. and Mainil, J.G. (2017). Enteropathogenic *Escherichia coli* O80:H2 in Young Calves with Diarrhea, Belgium. *Emerging Infectious Diseases*. 23(12), 2093-2095.
- Thomas, R.R., Brooks, H.J. and O'Brien, R. (2017). Prevalence of Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* marker genes in diarrhoeic stools in a New Zealand catchment area. *Journal of Clinical Pathology*. 70(1), 81-84.
- Thomson, D.U., Loneragan, G.H., Thornton, A.B., Lechtenberg, K.F., Emery, D.A., Burkhardt, D.T. and Nagaraja, T.G. (2009). Use of a siderophore receptor and porin proteins-based vaccine to control the burden of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6(7), 871-877.
- Thornton, A.B., Thomson, D.U., Loneragan, G.H., Fox, J.T., Burkhardt, D.T., Emery, D.A. and Nagaraja, T.G. (2009). Effects of a siderophore receptor and porin proteins-based vaccination on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally inoculated cattle. *Journal of Food Protection*. 72(4), 866-869.
- Tomita, G.M., Nickerson, S.C., Owens, W.E. and Wren, B. (1998). Influence of route of vaccine administration against experimental intramammary infection caused by *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science*. 81(8), 2159-2164.
- Tomita, G.M., Ray, C.H., Nickerson, S.C., Owens, W.E. and Gallo, G.F. (2000). A comparison of two commercially available *Escherichia coli* J5 vaccines against *E. coli* intramammary challenge. *Journal of Dairy Science*. 83(10), 2276-2281.
- Topal, M., Uslu, G., Arslan Topal, E.I. ve Öbek E. (2015). Antibiyotikler ve kullanım alanları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 31, 121-127.
- Torres, A.G., Zhou, X. and Kaper, J.B. (2005). Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infection and Immunity*. 73(1), 18-29.
- Trabulsi, L.R., Keller, R., Tardelli and Gomes, T.A. (2002). Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*. 8(5), 508-513.
- Turner, S.M., Scott-Tucker, A., Cooper, L.M. and Henderson, I.R. (2006). Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 263(1), 10-20.
- Tyler, J.W., Spears, H. and Nelson, R. (1992). Antigenic homology of endotoxin with a coliform mastitis vaccine strain, *Escherichia coli* O111:B4 (J5). *Journal of Dairy Science*. 75(7), 1821-1825.
- Tyson, G.H., McDermott, P.F., Li, C., Chen, Y., Tadesse, D.A., Mukherjee, S., Bodeis-Jones, S., Kabera, C., Gaines, S.A., Loneragan, G.H., Edrington, T.S., Torrence, M., Harhay, D.M. and Zhao, S. (2015). WGS accurately predicts antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 70(10), 2763-2769.
- Ud-Din, A. and Wahid, S. (2014). Relationship among *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and their differentiation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(4), 1131-1138.

- Uddin, T.M., Chakraborty, A.J., Khusro, A., Zidan, B.R.M., Mitra, S., Emran, T.B., Dhama, K., Ripon, M.K.H., Gajdacs, M., Sahibzada, M.U.K., Hossain M.J., Niranjana, K. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*. 14(12), 1750-1766.
- Umpiérrez, A., Acquistapace, S., Fernández, S., Oliver, M., Acuña, P., Reolón, E. and Zunino, P. (2016). Prevalence of *Escherichia coli* adhesion-related genes in neonatal calf diarrhea in Uruguay. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 10(5), 472-477.
- Umpiérrez, A., Bado, I., Oliver, M., Acquistapace, S., Etcheverría, A., Padola, N.L., Vignoli, R. and Zunino, P. (2017). Zoonotic Potential and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* in Neonatal Calves in Uruguay. *Microbes and Environments*. 32(3), 275-282.
- Umpiérrez, A., Ernst, D., Fernández, M., Oliver, M., Casaux, M.L., Caffarena, R.D., Schild, C., Giannitti, F., Fraga, M. and Zunino, P. (2021). Virulence genes of *Escherichia coli* in diarrheic and healthy calves. *Revista Argentina de Microbiología*. 53, 34-38.
- Valat, C., Forest, K., Auvray, F., Metayer, V., Meheut, T., Polizzi, C., Gay, E., Haenni, M., Oswald, E. and Madec, J.Y. (2014). Assessment of Adhesins as an Indicator of Pathovar-Associated Virulence Factors in Bovine *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(23), 7230-7234.
- Valente, C., Fruganti, G., Tesei, B., Ciorba, A., Cardaras, P., Floris, A. and Bordoni, E. (1988). Vaccination of pregnant cows with K99 antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* and protection by colostrum in newborn calves. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 11(3-4), 189-198.
- van Diemen, P.M., Dziva, F., Abu-Median, A., Wallis, T.S., van den Bosch, H., Dougan, G., Chanter, N., Frankel, G. and Stevens, M.P. (2007). Subunit vaccines based on intimin and Efa-1 polypeptides induce humoral immunity in cattle but do not protect against intestinal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 or O26:H. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 116(1-2), 47-58.
- Van Donkersgoed, J., Hancock, D., Rogan, D. and Potter A.A. (2005). *Escherichia coli* O157:H7 vaccine field trial in 9 feedlots in Alberta and Saskatchewan. *The Canadian veterinary journal*. 46(8), 724-728.
- Vetter, V., Denizer, G., Friedland, L.R., Krishnan, J. and Shapiro, M. (2018). Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Annals of Medicine*. 50(2), 110-120.
- Vial, P.A., Robins-Browne, R., Lior, H., Prado, V., Kaper, J.B., Nataro, J.P., Maneval, D., Elsayed, A. and Levine, M.M. (1988). Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 158(1), 70-79.
- Vieira, N., Bates, S.J., Solberg, O.D., Ponce, K., Howsmon, R., Cevallos, W., Trueba, G., Riley, L. and Eisenberg, J.N. (2007). High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coastal Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 76(3), 528-533.
- Vilte, D.A., Larzábal, M., Garbaccio, S., Gammella, M., Rabinovitz, B.C., Elizondo A.M., Cantet R.J., Delgado F., Meikle V., Cataldi A. and Mercado, E.C. (2011). Reduced faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle following systemic vaccination with γ -intimin C₂₈₀ and EspB proteins. *Vaccine*. 29(23), 3962-3968.
- Vilte, D.A., Larzábal, M., Mayr U.B., Garbaccio S., Gammella M., Rabinovitz B.C., Delgado F., Meikle V., Cantet R.J., Lubitz P., Cataldi, A. and Mercado, E.C. (2012). A systemic vaccine based on *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts (BGs) reduces the excretion of *E. coli* O157:H7 in calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 146(2), 169-176.

- Vollmer, W., Blanot, D. and de Pedro, M.A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*. 32(2), 149-167.
- Wai, S.N., Lindmark, B., Soderblom, T., Takade, A., Westermarck, M., Oscarsson, J., Jass, J., Richter-Dahlfors, A., Mizunoe, Y. and Uhlin B.E. (2003). Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*. 115(1), 25-35.
- Wang, H., Zhong, Z., Luo, Y., Cox, E. and Devriendt, B. (2019). Heat-Stable Enterotoxins of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Their Impact on Host Immunity. *Toxins (Basel)*. 11(1), 24.
- Wang, L., Zhang, S., Zheng D., Fujihara, S., Wakabayashi, A., Okahata, K., Suzuki, M., Saeki, A., Nakamura, H., Hara-Kudo, Y., Kage-Nakadai, E. and Nishikawa, Y. (2017). Prevalence of Diarrheagenic *Escherichia coli* in Foods and Fecal Specimens Obtained from Cattle, Pigs, Chickens, Asymptomatic Carriers, and Patients in Osaka and Hyogo, Japan. *Japanese The Journal of Infectious Diseases*. 70(4), 464-469.
- Watkins, R.R. and Bonomo, R.A. (2016). Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. *Infectious Disease Clinics of North America*. 30(2), 313-322.
- Watson, V.E., Jacob, M.E., Flowers, J.R., Strong, S.J., DebRoy, C. and Gookin, J.L. (2017). Association of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* with Diarrhea and Related Mortality in Kittens. *Journal of Clinical Microbiology*. 55(9), 2719-2735.
- Watts, J.L., Sweeney, M.T. and Lubbers, B.V. (2018). Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria of Veterinary Origin. *Microbiology Spectrum*. 6(2). doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0001-2017.
- Webber, M.A. and Piddock, L.J. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51(1), 9-11.
- Weiglmeier, P.R., Rosch, P. and Berkner, H. (2010). Cure and curse: *E. coli* heat-stable enterotoxin and its receptor guanylyl cyclase C. *Toxins (Basel)*. 2(9), 2213-2229.
- Wenz, J.R., Barrington, G.M., Garry, F.B., Ellis, R.P. and Magnuson, R.J. (2006). *Escherichia coli* Isolates' Serotypes, Genotypes, and Virulence Genes and Clinical Coliform Mastitis Severity. *Journal of Dairy Science*. 89(9), 3408-3412.
- Wernli, D., Hausteiner, T., Conly, J., Carmeli, Y., Kickbusch, I. and Harbarth, S. (2011). A call for action: the application of The International Health Regulations to the global threat of antimicrobial resistance. *PLoS Med*. 8(4), 1001-1022.
- Whipp, S.C. (1991). Intestinal responses to enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in non-porcine species. *American Journal of Veterinary Research*. 52(5), 734-737.
- White, D.G. and McDermott P.F. (2001). Emergence and Transfer of Antibacterial Resistance. *Journal of Dairy Science*. 84, 151-155.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. and Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(12), 6578-6583.
- Who. (2010). Statue commemorates smallpox eradication. <https://www.who.int/news/item/17-05-2010-statue-commemorates-smallpox-eradication> [Erişim Şubat 18, 2023]
- Wilson, D.J., Mallard, B.A., Burton, J.L., Schukken, Y.H. and Grohn, Y.T. (2009). Association of *Escherichia coli* J5-specific serum antibody responses with clinical mastitis outcome for J5 vaccinate and control dairy cattle. *Clinical Vaccine Immunology*. 16(2), 209-217.

- Wilson, D.N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 12(1), 35-48.
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. and Woods, G. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. 6th edition.
- Woolhouse, M., Waugh, C., Perry, M.R. and Nair, H. (2016). Global disease burden due to antibiotic resistance - state of the evidence. *Journal of Global Health*. 6(1), 010306.
- Wu, X.Y., Chapman, T., Trott, D.J., Bettelheim, K., Do, T.N., Driesen, S., Walker, M.J. and Chin, J. (2007). Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of commensal and enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from weaned pigs. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(1), 83-91.
- Wulfing, C. and Rappuoli, R. (1997). Efficient production of heat-labile enterotoxin mutant proteins by overexpression of dsbA in a degP-deficient *Escherichia coli* strain. *Archives of Microbiology*. 167(5), 280-283.
- Xia, P., Zou, Y., Wang, Y., Song, Y., Liu, W., Francis, D.H. and Zhu G. (2015). Receptor for the F4 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99(12), 4953-4959.
- Yadegari, Z., Brujeni, N.G., Ghorbanpour, R., Moosakhani, F. and Lotfollahzadeh, S. (2019). Molecular characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from neonatal calves diarrhea. *Veterinary Research Forum*. 10(1), 73-78.
- Yahia, A.B.H., Tayh, G., Landolsi, S., Maamar, E., Galai, N., Landoulsi, Z. and Messadi, L. (2023). First Report of OXA-48 and IMP Genes Among Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Diarrheic Calves in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*. 29(4), 150-162.
- Yamamoto, T. and Nakazawa, M. (1997). Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(1), 223-227.
- Yamamoto, T. and Taneike, I. (2000). The sequences of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Yersinia pestis* that are homologous to the enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin gene: cross-species transfer in evolution. *FEBS Letters*. 472(1), 22-26.
- Yamamoto, T., Gojobori, T. and Yokota, T. (1987). Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* O1. *Journal of Bacteriology*. 169(3), 1352-1357.
- Yamanaka, H., Fuke, Y., Hitotsubashi, S., Fujii, Y. and Okamoto, K. (1993). Functional properties of pro region of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Microbiology and Immunology*. 37(3), 195-205.
- Yano, T., Garcia, M., Leite, D.S., Pestana-de-Castro, A.F. and Shenk, M.A. (1995). Determination of the efficiency of K99-F41 fimbrial antigen vaccine in newborn calves. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 28(6), 651-654.
- Yoneyama, H. and Katsumata, R. (2006). Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 70(5), 1060-1075.
- Yoon, J.W., Lim, J.Y., Park, Y.H. and Hovde, C.J. (2005). Involvement of the *Escherichia coli* O157:H7(pO157) ecf operon and lipid A myristoyl transferase activity in bacterial survival in the bovine gastrointestinal tract and bacterial persistence in farm water troughs. *Infection and Immunity*. 73(4), 2367-2378.

- Zacchè, M.M. and Giarenis, I. (2016). Therapies in early development for the treatment of urinary tract inflammation. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 25(5), 531-540.
- Zahavi, E.E., Lieberman, J.A., Donnenberg, M.S., Nitzan, M., Baruch, K., Rosenshine, I., Turner, J.R., Melamed-Book, N., Feinstein, N., Zlotkin-Rivkin, E. and Aroeti B. (2011). Bundle-forming pilus retraction enhances enteropathogenic *Escherichia coli* infectivity. *Molecular Biology of the Cell*. 22(14), 2436-2447.
- Zajacova, Z.S., Faldyna, M., Kulich, P., Kummer, V., Maskova, J. and Alexa, P. (2013). Experimental infection of gnotobiotic piglets with *Escherichia coli* strains positive for EAST1 and AIDA. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 152(1-2), 176-182.
- Zajacova, Z.S., Konstantinova, L. and Alexa, P. (2012). Detection of virulence factors of *Escherichia coli* focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in astA positive strains. *Veterinary Microbiology*. 154(3-4), 369-375.
- Zaman, S.B., Hussain, M., Nye, R., Mehta, V., Mamun, T. and Hossain N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*. 9, 1403.
- Zhang, C., Rausch, D. and Zhang, W. (2009). Little heterogeneity among genes encoding heat-labile and heat-stable toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal pigs. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(19), 6402-6405.
- Zhang, H., Xu, Y., Zhang, Z., You, J., Yang, Y. and Li, X. (2018). Protective immunity of a Multivalent Vaccine Candidate against piglet diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in a pig model. *Vaccine*. 36(5), 723-728.
- Zhang, H.Z., Lory, S. and Donnenberg, M.S. (1994). A plasmid-encoded prepilin peptidase gene from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 176(22), 6885-6891.
- Zhang, W., Berberov, E.M., Freeling, J., He, D., Moxley, R.A. and Francis, D.H. (2006). Significance of heat-stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies. *Infection and Immunity*. 74(6), 3107-3114.
- Zheng, Y. and Cantley, L. (2019). Toward a better understanding of folate metabolism in health and disease. *The Journal of Experimental Medicine*. 216(2), 253,266.
- Zhou, H., Zhu, J. and Zhu, G. (2012). Fimbriae of animal-originated enterotoxigenic *Escherichia coli*--a review. *Acta microbiologica Sinica*. 52(6), 679-686.

ÖZ GEÇMİŞ

Serhan AKGÖZ, Karabağlar Nevvar Salih İşören Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2018 yılında mezun oldu. 2019 yılında OMÜ LEE Veterinerlik Mikrobiyolojisi Doktora programına YÖK 100/2000 projesi kapsamında doktora bursiyeri olarak başladı. 2020 yılında Kars/Akyaka İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü'nde kamu personeli olarak göreve başlayan Serhan AKGÖZ, iyi derecede İngilizce bilmektedir. Temel ilgi alanları doğa yürüyüşü ve müziktir. 07/08/2023

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-5130-7120.

Yayınlar:

1. Akgöz, S., Yaman, Ş. ve Gülhan, T. (2022). Neonatal Septisemili Buzağı Kökenli *Escherichia coli* İzolatlarında Enterotoksijenik Virülens Genlerinin Belirlenmesi. *XV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi Uluslararası Katılımlı*. 136-137. (Özet Bildiri/Poster).
2. Akgöz, S., Yaman, Ş., Kirez, K. ve Gülhan, T. (2022). Manda Orijinli Termofilik *Kampilobakter* Türlerinin Moleküler İdentifikasyonu. *XV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi Uluslararası Katılımlı*. 155. (Özet Bildiri/Poster).
3. Gülhan, T., Sezener, M.G., Akgöz, S., Ergüden, V.E, Fındık, A. ve Çiftci, A. (2020). Anadolu Mandası Dışkılarından İzole Edilen Termofilik *Campylobacter* Türlerinin 121 Moleküler Karakterizasyonu. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*. 5(1), 86-92.
4. Gülhan, T., Sezener, M.G., Akgöz, S., Ergüden, V.E, Fındık, A. ve Çiftci, A. (2020). Anadolu Mandası Dışkılarından İzole Edilen Termofilik *Campylobacter* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*. 5(1), 86-92.
5. Gülhan, T., Tütüncü, M., Güzel, M., Sezener, M.G., Çiftci, A., Kılıçoğlu, Y., Ergüden, V.E., Akgöz, S. ve Boynukara, B. (2019). Serological Investigation of Q

Fever in Anatolian Buffaloes. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*. 4(3), 338-343.

6. Sezener, M.G., Fındık, A., Ergüden, V.E., Akgöz, S., Gülhan, T. ve Çiftci, A. (2019). Mastitis İzolatı Staphylococcus aureus Suşlarında Antibiyotik Dirençliliğinin ve Bazı Virülens Genlerinin Araştırılması. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*. 4(2), 182-187.
7. Sezener, M.G., Ergüden, V.E., Fındık, A., Akgöz, S., Gülhan, T. Moçco, O.A. ve Çiftci, A. (2019). Investigation of the antibiotic resistances, biofilm formation, and genotypes of Pseudomonas aeruginosa isolates from Turkey and Romania. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 33(2), 1-6.
8. Sezener, M.G., Özcan, Ü., Akgöz, S., Ergüden, V.E., Güzel, M. ve Gülhan, T. (2019). A Case Report of Infectious Keratoconjunctivitis in Chios Sheep Farm. *I.Uluslararası Multidisipliner Çalışmalar ve Araştırmalar Kongresi*. 92-96. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:5689124)
9. Sezener, M.G., Ergüden, V.E., Fındık, A., Akgöz, S., Gülhan, T., Moçco, O.A. ve Çiftci, A. (2019). Determination of The Antibiotypical and Genotypical Relationships Between Pseudomonas aeruginosa Isolates from Turkey and Romania. *I.Uluslararası Multidisipliner Çalışmalar ve Araştırmalar Kongresi*. 176-182. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:5689222).

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar:

1. YÖK 100/2000 Doktora Projesi "AŞI"