



Van Veterinary Journal

<http://vfdergi.yyu.edu.tr>



ISSN: 2149-3359

Original Article

Detection of Virulence Properties *Escherichia coli* Originated From Poultry by Phenotypic and Molecular Methods

Zafer CANTEKİN¹ Müjgan İZGÜR²

¹ Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Hatay, Turkey

² Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Ankara, Turkey

Received: 26.01.2015

Accepted: 19.02.2015

SUMMARY

In this study, virulence factors important for extra-intestinal infections such as serum resistance, aerobactin iron uptake systems, some adhesins (type 1 fimbria, P fimbria, S fimbria, afimbrial adhesins), haemolysis and cytotoxic necrotizing factor 1 in 200 *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis, were investigated by both phenotypic methods and molecular methods. Strains were detected to be negative in haemolysin synthesis tests performed with sheep blood agar, and they were negative in molecular tests investigating the haemolysin gene. All strains grew on iron deficient medium and 88% of these were found to harbor iucD gene encoding aerobactin. Heat-labile toxin was detected in 40% of the isolates in the toxin analyses performed in Vero cells; however, cytotoxic necrotizing factor 1 could not be determined in the strains with phenotypic and molecular tests. Haemagglutination activity was determined in 90% of strains in haemagglutination tests performed with human O group erythrocytes and erythrocytes derived from different animals. Twenty six percent of these strains were found to have MRHA activity. *FimH* gene encoding type 1 fimbria, *papEF* gene encoding P fimbria, were detected respectively in 88% and 26% of the strains, and 14% of all isolates were also found to harbor the *papC* gene also encoding the P fimbria. However, *sfa* and *afa* genes encoding S fimbria and afimbrial adhesins, respectively, could not be detected in the study. Serum resistance was phenotypically determined in all strains in the tests performed with sera derived from different animals and *traT* gene encoding serum resistance were detected in 90% of strains by PCR. In the study, serum resistance, aerobactin iron uptake systems and the existence of fimbrial adhesins were determined as the most important virulence factors of avian pathogenic *E. coli* isolates.

Key Words: *Escherichia coli*, Poultry, Virulence Properties

ÖZET

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

Bu çalışmada, kolibasilozisli kanatlı hayvanlardan izole edilen 200 adet *Escherichia (E.) coli* suşunda, özellikle ekstra-intestinal infeksiyonlar için önemli olan virülens faktörlerinden serum direnci, aerobaktin demir elde etme sistemleri, çeşitli adezinler (Tip 1 fimbriyal, P fimbriyal, S fimbriyal ve afimbrial adezinler), hemoliz ve sitotoksik nekrotizan faktör 1 gibi virülens özellikleri fenotipik yöntemlerle ve moleküler olarak araştırıldı. Çalışmada, suşlar koyun kanlı agar kullanılarak yapılan testle hemoliz üretimi ve moleküler olarak hemoliz özelliğini kodlayan gen yönünden negatif bulundu. Suşların tamamının demir kısıtlayıcı besiyerinde ürettiği ve bu suşların %88'inin aerobaktin özelliğini kodlayan *iucD* genine sahip oldukları saptandı. Vero hücre kültürleri kullanılarak yapılan toksin analizlerinde suşların %40'ında ısıya duyarlı toksin belirlenirken suşların hiç birinde fenotipik ve moleküler olarak sitotoksik nekrotizan faktör 1 belirlenmedi. İnsan O grubu ve değişik hayvanlara ait eritrositler kullanılarak yapılan hemagglutinasyon testi ile suşların %90'ında hemagglutinasyon aktivitesi saptandı ve bunların %26'sı mannoz resistans hemagglutinasyon özelliğinde olduğu belirlendi. Tip 1 fimbriyalı kodlayan *FimH* geni suşların %88'inde, P fimbriyalı kodlayan *PapEF* geni %26'sında bulundu ve bu izolatların %14'ü aynı zamanda *PapC* genini de bulundurduğu saptandı. Ancak, suşlarda S fimbriyal ve afimbrial adezinleri kodlayan *Sfa* ve *Afa* genleri belirlenemedi. Değişik hayvanlara ait serumlarla yapılan testte suşların tamamında serum direnci fenotipik olarak saptandı ve serum direncinden sorumlu *TraT* geni suşların %90'ında PCR ile belirlendi. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, kanatlı orijinli *E. coli* suşlarında en önemli virülens özelliklerinin aerobaktin demir elde etme sistemleri, fimbrial adezinler ve serum direnci olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, Kanatlı hayvanlar, Virülens özellikleri

GİRİŞ

Escherichia coli, sıcakkanlı canlıların normal gastrointestinal florasının bir üyesi olmasına rağmen özellikle intestinal infeksiyonların yanı sıra üriner sistem infeksiyonları, sepsisemi ve meningitis gibi ekstraintestinal infeksiyonlara (Ekstra-intestinal *E. coli*) da neden olmaktadır (Orskov ve Orskov 1985). Ekstra-intestinal *E. coli*'lerin bağırsak dışı ortamda yaşayabilmesi ve infeksiyon oluşturma için bazı özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Virülens faktörleri olarak adlandırılan bu özellikler; adezinler (Tip-1 Fimbrialar, P fimbrialar, S fimbrialar, afimbrial adezinler, curli fimbrialar, ısıya duyarlı hemaglutininler), serumun bakterisidal etkilerine karşı dirençlilik, demir elde etme sistemi (aerobaktin), toksinler ve hemolizin'dir (La Ragione ve Woodward 2002).

Ölen kanatlıların iç organlarından *E. coli* izolasyonu ilk defa 1894 yılında rapor edilmiştir ve günümüzde *E. coli* infeksiyonları, kanatlı hayvanlarda en sık rapor edilen hastalıklardan biridir. Ayrıca *E. coli* infeksiyonları kanatlı endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olurlar (Yogarathnam 1995). Kanatlı hayvanlarda infeksiyon oluşturan *E. coli* izolatları *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) olarak adlandırılan bir bölümü "Kolibasillozis Sendromları" ile ilişkilidir. Bu sendromlar ile ilişkili klinik görünüm ve lezyonlar farklı şekillerde karşımıza çıkar (sarı kesesi infeksiyonu, koliseptisemi, kronik solunum hastalığı, salpingitis, derinin kronik yangısı, şişkin baş sendromu, osteomyelitis) (Barnes ve Gross 1997).

Fimbrialar konak dokularına bağlanarak etkenin kolonizasyonunu sağlarlar. Fimbriaların eritrositlere bağlanma özelliklerinden yararlanılarak varlıkları *in-vitro* testlerle belirlenebilir. Hemaglutinasyon özelliğinin, ortamda D-mannoz varlığında kaybolup kaybolmamasına göre fimbrialar mannoz sensitif (tip 1 fimbria) ve mannoz resistans (P fimbria, S fimbria ve afimbrial adezinler) adezinler olarak sınıflandırılabilirler. Bunlara ek olarak curli fimbria adı verilen ince, halka şeklinde kıvrılmış, saç benzeri yüzeysel uzantılarda ekstra intestinal *E. coli*'lerde belirlenen önemli adezinlerdendir (Dho-Moulin ve Fairbrother 1999; Winn ve ark. 2006).

Serumun bakterisidal etkisine karşı direncin özellikle ekstra intestinal *E. coli* olmak üzere sepsisemik izolatların en önemli virülens özelliklerinden birisi olduğu ve serum direnci ile etkenin virülensi arasında yakın bir ilişki olduğunu vurgulanmıştır (Ellis ve ark.1988; Dho-Moulin ve Fairbrother 1999; Delicato ve ark. 2003).

Düşük demir varlığının bakterilerin üremesini sınırladığı bilinmektedir (Payne, 1988). İnvazif karakterde olan birçok bakterinin, düşük demirli ortamda üreyebilmek için yüksek afiniteli demir bağlayıcı sistemler (areroaktin) geliştirdiği belirlenmiştir (Lafont ve ark.1987; Dho-Moulin ve Fairbrother 1999).

Ekstra intestinal *E. coli* izolatlarında ve APEC'de yapılan çalışmalarda ısıya duyarlı toksin (LT) ve ısıya dayanıklı toksin (ST) belirlenmiştir (Tsuji ve ark. 1990; Emery ve ark. 1992; Fantinatti ve ark. 1994). Özellikle memelilerde ekstra-intestinal infeksiyonlardan izole edilen *E. coli*'lerde sitotoksik nekrotizan faktör 1 önemli bir virülens özelliğidir (Blanco ve ark. 1990).

E. coli'lerin patogenezesinde hemolizin'in eritrositleri parçalayarak etkenlerin demir ihtiyacını sağlamasında önemli bir virülens özelliği olduğu düşünülür (Orskov ve Orskov 1985). Hemolizin üretiminden yoksun bırakılan

mutantlarda virülensin azaldığı belirlenmiştir (Reingold ve ark. 1999).

Son yıllarda gelişen moleküler teşhis ve tiplendirme *E. coli*'lerle ilgili olarak yapılan araştırmalarda sıklıkla kullanılmıştır. Özellikle virülens faktörlerini kodlayan genleri belirlemek için DNA probları ve PCR teknikleri geliştirilmiştir (La Ragione ve Woodward 2002). *E. coli* izolatlarında apatojen suşlardan farklı olarak bulunan virülens özellikleri ve ilgili genler belirlenmiş ve bu genlerin bulunma sıklıklarından yararlanılarak etkenlerin PCR ile moleküler patotiplendirmeleri yapılmıştır (Janssen ve ark. 2001; Delicato ve ark. 2003).

Özellikle antibiyotik dirençli *E. coli*'lerin ya da plazmidlerin kanatlılardan insanlara geçişinin yaygın olduğunu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak da kanatlılardan izole edilen *E. coli*'lerin virülens özelliklerini kodlayan genlerin de insan suşlarına geçebileceği vurgulanmıştır (Van den Bogaard ve ark. 2001; Smith ve ark. 2007). Bu çalışmada, kanatlı hayvanlardan izole edilen 200 adet *E. coli* suşunda, özellikle ekstra-intestinal infeksiyonlar için önemli olan virülens faktörlerinden serum direnci, aerobaktin demir elde etme sistemleri, mannoz duyarlı hemaglutinasyon (tip 1 fimbrialar) ve mannoz dirençli hemaglutinasyon (P fimbrialar, S fimbrialar ve afimbrial adezinler) özellikleri, hemoliz ve sitotoksik nekrotizan faktör 1 gibi virülens özelliklerinin fenotipik yöntemlerle araştırılması ve bu özellikleri kodlayan genlerin moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada kullanılan Suşlar ve Orijinleri

E. coli izolasyonu için materyaller 2004-2007 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na nekropsi için getirilen kanatlı hayvanlardan ve Et ve Süt Kurumu Kanatlı Kesimhanesi (Sincan)'ne kesime getirilen broiler piliçlerden alındı (Tablo 1). Kanatlı hayvanların iç organlarından Kanlı agar ve MacConkey agara ekimler yapılarak üreyen koloniler klasik biyokimyasal testler kullanılarak tanımlanıp *E. coli* olarak tanımlandı. 200 adet suş çalışma amacıyla kullanıldı ve bu amaçla testler yapılmaya kadar %20 gliserinli triptikase soy buyyon (TSB)'a aktarıldı ve -20°C'de saklandı (Quinn ve ark. 1994; Winn ve ark. 2006).

Tablo 1. İncelenen *E.coli* suşlarının orijinleri

Table 1. Origin of studied *E. coli* strains

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

Standart Suşlar

Pozitif kontrol olarak Prof. Dr. JACQUES MAINIL (Chaire de Bactériologie et de Pathologie des Maladies Bactériennes, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B-1070 Brussels, Belgium)'den sağlanan *E. coli* pPAC (*sfa*), 140 KH 89 (*hly*), 10902 (*cnf* ve *sfa*), 26968.2 (*pap*), 239 KH 89 (*cnf*), pABN1(*iucD*) ve 83 KH 90 (*afa*) suşları ve negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

Virülens Faktörlerinin Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması

İzole edilen suşların hemolizin aktivitesi %7 oranında koyun kanı içeren kanlı agar kullanılarak yapıldı (İzgür 1981; Vidotto ve ark. 1990).

İzole suşlar, demir bağlayıcı olan 2,2'-dipyridil (200µM) içeren M9 buyyona aktarılacak 37°C'de 24 saat süreyle iki kez pasajlandıktan sonra buyyon kültürlerinden alınarak 200 µM 2,2'-dipyridil içeren M9 agara ekimleri yapıldı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında M9 agarda üreme olup olmasına göre değerlendirmeler yapıldı (Stuart ve ark. 1980).

İzolatlardan elde edilen sonik ekstraktları ısı işlemi uygulanmayan ve ısı (100°C'de 5 dakika) işlemine tutulan iki seri olarak Vero hücrelerinin üzerine ilave edildi ve 37°C'de 72 saat %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Vero hücre kültürleri 24, 48 ve 72. saatlerde kontrol edildi, tesbit ve boyama işlemlerinden sonra sitotoksik nekrotizan faktör 1 yönünden incelendi (Blanco ve ark. 1990).

Hemaglutinasyon aktivitesinin belirlenmesi amacıyla insan O grubu, tavşan, kobay, koyun ve tavuktan anti koagulanlı olarak alınan kanlar kullanılarak mannozsuz ve %3 mannozlu olarak %5'lik eritrosit süspansiyonları hazırlandı. Suşlar aktive edildikten sonra brain-heart infuzyon buyyonda 5 gün süreyle 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyerinde pellükül oluşumu gözlenmesi üzerine buyyon kültüründen bir damla alınarak kolonizasyon faktör antijen agar (CFA)'a ekimler yapıldı. CFA'da 37°C'de 24 saat inkübasyonu takiben üreyen birkaç koloni öze ile alınarak %3 D-mannozlu (Merck, Almanya) ve mannozsuz eritrositler ile ayrı olarak lam üzerinde hemaglutinasyona tabi tutuldu. Test sonucunda suşlar mannoz rezistans hemaglutinasyon (MRHA), mannoz sensitiv hemaglutinasyon (MSHA) ve hemaglutinasyon (HA) negatif *E. coli* suşları olarak değerlendirildi. Kullanılan eritrositlerden en az biri ile MRHA gösterenler MRHA pozitif suşlar olarak kabul edildi (Vidotto ve ark. 1990).

Aktive edilen suşlar PBS içerisinde McFarland tüp 3'e göre süspansiyon edildi ve TSA'a katılarak katı besiyeri hazırlandı. Bu agar içine açılan küçük yuvacıklara tavuk, insan, sığır ve tavşan serumları 40 µl miktarında eklenerek 4°C'de 4 saat bekletildikten sonra 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında serum ilave edilen kuyucukların etrafında üreme olması, bu suşların serum dirençli olduğunu gösterdi (Sanchez ve ark. 1984).

Tablo 2. Çalışmada kullanılan primerlerin özellikleri

Table 2. Properties of primers used in the study

Primer	Sekans	Pozisyon	Ürün Uzunluğu	Kaynak Makale
Pap1	5'- GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG -3'	<i>papC</i>	328 bp	Yamamoto ve ark. 1995
Pap2	5'- ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA -3'			
Pap3	5'- GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT -3'	<i>papE-F</i>	336 bp	Yamamoto ve ark. 1995
Pap4	5'- AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA -3'			
Sfa1	5'- CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC -3'	<i>sfaD-E</i>	410 bp	Yamamoto ve ark. 1995
Sfa2	5'- CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA -3'			
Afa1	5'- GCTGGCAGCAAACCTGATAACTCTC -3'	<i>afaB-C</i>	750 bp	Yamamoto ve ark. 1995
Afa2	5'- CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG -3'			
Hly1	5'- AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT -3'	<i>hlyA</i>	1177 bp	Yamamoto ve ark. 1995
Hly2	5'- ACCATATAAGCGGTCATTCCTGCA -3'			
Aer1	5'- TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT -3'	<i>iucD</i>	602 bp	Yamamoto ve ark. 1995
Aer2	5'- AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG -3'			
Cnf1	5'- AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG -3'	<i>CNF1</i>	498 bp	Yamamoto ve ark. 1995
Cnf2	5'- CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTTATT -3'			
FimH1	5'- TGCAGAACGGATAAGCCGTGG -3'	<i>FimH</i>	508 bp	Johnson ve Stell 2000.
FimH2	5'- GCAGTCACCTGCCCTCCGTGG -3'			
TraT1	5'- GATGGCTGAACCGTGGTTATG -3'	<i>TraT</i>	307 bp	Kaipainen ve ark. 2002
TraT2	5'- CACACGGGTCTGGTATTTATGC -3'			

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Aktive edilen suşların 18 saatlik Luria Bertani (LB) buyyon kültürlerinden DNA ekstraksiyonu yapıldı (Sambrook ve Russell 2002). Ektrakte edilen DNA'lar kalıp olarak kullanılarak, alfa-hemoliz (*hlyA*), demir sidereforlarının varlığı (*iucD*), sitotoksik nekrotizan faktör 1 (*cnf 1*), tip 1 fimbria (*fimH*), P fimbria (*papEF* ve *papC*), S fimbria (*sfa*), afimbrial adhezinler (*afa*) ve serum direnci (*traT*) gibi virülens özelliklerini kodlayan genlere spesifik primer setleri kullanılarak kaynak litaratüre göre PCR işlemi yapıldı (Tablo 2). Amplifikasyon sonrasında ürünlerin değerlendirilmesi için agoroz jel elektroforez yapıldı. Amplifikasyon ürünleri 160 voltta 70 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu ve bilgisayarlı UV transillüminatör kutusu içine yerleştirilerek görüntülendi (Sambrook ve Russell, 2002).

BULGULAR

Virülens Faktörlerine Yönelik Fenotipik Bulgular

E. coli suşlarının çift katlı kanlı agarda incelenmesi sonucunda, incelenen suşların hiçbirinde hemolitik aktivite saptanamadı. Çalışılan suşların tamamının (%100), yapılan analizler sonucunda demiri bağlayan 2,2'-dipyridil içeren besiyerinde ürediği görüldü. Vero hücre

kültürleri kullanılarak yapılan toksin analizlerinde, sitotoksik nekrotizan faktör 1'in spesifik sitopatojenik etkileri olan multi nükleasyon ve yuvarlaklaşma saptanamadı. Serum direnci testlerinde suşların tamamının serumu karşı dirençli olduğu belirlendi. Hemaglutinasyon analizlerinde çalışılan suşların 180 (%90)'inde hemaglutinasyon aktivitesi saptandı (Tablo 3).

Virülens Faktörlerine Yönelik PCR Bulguları

Hemoliz özelliğini kodlayan *hly* geni ve sitotoksik nekrotizan faktör 1 kodlayan *cnf 1* geninin varlığını belirlemek amacıyla yapılan PCR işlemi sonrasında, suşların tamamı bu genler açısından negatif bulundu. Aerobaktin özelliğini kodlayan *iucD* geni suşların 176 (%88)'sında *iucD* geni saptandı. Serum direncinin varlığının belirlenmesi amacıyla yapılan PCR işlemi sonucunda suşların 180 (%90) adedinde *traT* geninin varlığı belirlendi. Çalışılan suşların 48 (%24)'inde *fimH* ve *papEF* geni birlikte saptanırken, 128 (%64) suşta sadece *fimH* geni ve 4 (%2) suşta *papEF* geni saptandı. Afimbrial adezinleri kodlayan *afa* geni ve S fimbriaları kodlayan *sfa* geni belirlenemedi. Fenotipik olarak hemaglutinasyon belirlenen suşların tamamında bu genlerin varlığı da belirlendi. Çalışılan özellikler yönünden yapılan fenotipik ve moleküler analizlerin sonuçları Tablo 4' de gösterildi.

Tablo 3. İncelenen *E.coli* suşlarında virülens özelliklerinin fenotipik bulguları

Table 3. Phenotypic results of virulence properties in studied *E. coli* strains

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

Tablo 4. Virülens özelliklerine ait karşılaştırmalı fenotipik ve moleküler bulgular

Table 4. Comparison phenotypical and molecular results of virulence properties

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

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma kapsamında kanatlı hayvanlardan izole edilen 200 adet *E. coli* suşunda, özellikle ekstra-intestinal

enfeksiyonlar için önemli olan virülens özellikleri fenotipik ve moleküler yöntemlerle araştırıldı.

Blanco ve ark. (1997) ve Da Silveira ve ark. (2002) tavuklardan izole edilen *E. coli* suşlarında hemolizin varlığını bildirmelerine rağmen, Vidotto ve ark. (1990) ve Knöbl ve ark. (2001) fenotipik olarak hemoliz özelliğinin APEC izolatlarının hiçbirinde belirlemediklerini bildirmişlerdir. Ayrıca çeşitli moleküler çalışmalarda izolatların tamamının *hly* geni yönünden negatif olduğu bildirilmiştir (Janssen ve ark. 2001; Knöbl ve ark. 2001; Delicato ve ark. 2003). Benzer şekilde, yapılan bu çalışmada da kanatlılardan izole edilen *E. coli* suşları hem fenotipik hem de moleküler testlerle hemoliz özelliği yönünden negatif bulunmuştur.

Kanatlı izolatu *E. coli*'lerde Vero hücre kültürlerinde, Fantinatti ve ark. (1994) suşların %17.6'sında, Blanco ve ark. (1997) ise %7'sinde toksik aktivite belirlemişler, ancak Knöbl ve ark. (2001) ve Da Silveira ve ark. (2002) tavuk izolatlarında görülen bu toksik aktivitenin sitotoksik nekrotizan faktör 1 olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca

moleküler çalışmalarda APEC'lerde *cnf 1* geni saptanmadığı bildirilmiştir (Ngeleka ve ark. 1996; Knöbl ve ark. 2001; Delicato ve ark. 2003). Benzer şekilde bu çalışmada da hastalıklı kanatlılardan izole edilen *E. coli* suşları hem fenotipik hem de moleküler analizler ile sitotoksik nekrotizan faktör 1 yönünden negatif bulunmuştur.

Çeşitli araştırmalarda APEC izolatlarının tamamının demir kısıtlayıcı besiyerinde üredikleri tespit edilmiştir (Linggood ve ark. 1987; Vidotto ve ark. 1990; Knöbl ve ark. 2001). Da Silveira ve ark. (2002), demir kısıtlayıcı içeren besiyerinde, sağlıklı kanatlılardan izole edilen *E. coli*'lerin %16.6'sının ürediğini, hastalıklı kanatlılardan izole edilenlerin ise tümünün demir kısıtlayıcı içeren besiyerinde ürediğini saptamışlardır. Moleküler çalışmalarda ise *iucD* genini Janssen ve ark. (2001), APEC izolatlarının %88.7'sinde, Knöbl ve ark. (2001) ise suşların %75'inde saptamışlardır. Delicato ve ark. (2003), sağlıklı kanatlılardan izole edilen *E. coli*'lerde bu geni %12 düzeyinde belirlerken, APEC suşlarının %63'ünde saptamışlardır. Yapılan bu çalışmada ise, hastalıklı kanatlı hayvanlardan izole edilen *E. coli* suşlarının tamamı demir kısıtlayıcı besiyerlerinde üremiş ancak aerobaktin geninin (*iucD*) varlığı suşların %88'inde belirlenmiştir. Bu oran, diğer çalışmalarla uyumlu olup aerobaktin demir elde etme sisteminin, APEC'ler için önemli bir virülens özelliği olduğunu gösteren çalışmaları desteklemektedir.

Hastalıklı kanatlılardan izole edilen *E. coli*'lerde yapılan çeşitli çalışmalarda suşların tamamında serum direnci belirlenmiş ve bu özelliğin APEC'lerde virülensi artırdığı bildirilmiştir (Binns ve ark. 1982; Vidotto ve ark. 1990 Knöbl ve ark. 2001). Karşılaştırmalı bir çalışmada, Pfaff-McDonough ve ark. (2000), kolibasillosis izolatlarının %78.7'sinde, dışkı izolatlarının ise %18.7 oranında serum direncini kodlayan genlerin varlığını belirlemişlerdir.. Ngeleka ve ark. (1996) ise, 39 adet APEC izolatının %72'sinde *traT* geninin varlığını saptamıştır. Bu çalışmada izolatların tamamının fenotipik olarak serum karşı dirençli olduğu ve serum direncinden sorumlu *traT* geni izolatların %90'ında belirlendi. Bu oran diğer çalışmalara göre yüksektir. Bu durum farklı çalışmalarda serum direncinden sorumlu farklı gen bölgelerinin çalışılmasından ya da çalışmalar arasındaki bölgesel farklılıklardan kaynaklanabilir.

Arda ve ark. (1987), koliseptisemili piliçlerden izole edilen *E. coli* suşlarının %90'nında hemaglutinasyon aktivitesi belirlemişler ve bu izolatların %35'lik kısmının MRHA yaptığını bulmuşlardır. Vidotto ve ark. (1990), kolibasillosisli tavuklardan izole edilen 45 adet *E. coli* suşunun %58'inin hemaglutinasyon yaptığını ancak çalışmalarında MRHA belirleyemediklerini bildirmişlerdir. Bunun aksine Knöbl ve ark. (2001), çalıştıkları tüm izolatların hemaglutinasyon yaptığını ve bunların tamamının MRHA özelliğinde olduğunu bulmuşlardır. Ancak, Da Silveira ve ark. (2002), hastalıklı kanatlılardan izole edilen *E. coli* suşlarının tamamının hemaglutinasyon aktivitesine sahip olduklarını ve bunların %12'sinin mannoz dirençli karakterde olduklarını belirlemişlerdir. Bu tez kapsamındaki çalışmada suşların %90'ında hemaglutinasyon aktivitesi belirlenmiş ve bunların %26'sında MRHA saptanmıştır. Bu bulgular diğer çalışmalarla benzer niteliktedir ve fimbriaların APEC'in önemli bir virülens özelliği olduğunu düşündürmüştür.

Delicato ve ark. (2003), kolibasillosis olgularından izole ettikleri suşların %96,5'inde sağlıklılardan izole etkilerinin ise %92'sinde tip 1 fimbria genlerini belirlemişlerdir. Ayrıca, Janssen ve ark. (2001), tip 1 fimbriaların varlığını

suşların %97,3'ünde belirlemişler ve Knöbl ve ark. (2001) ise, çalıştıkları izolatların tamamının tip 1 fimbriaları kodlayan genleri bulundurduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada APEC izolatlarının %88 (176)'inde tip 1 fimbriaları kodlayan *fimH* geni varlığı belirlenmiş olup, bu oran diğer çalışmalarla uyumludur ve tip 1 fimbriaların APEC'in patogeneğinde önemli olduğunu bildiren araştırmacıların bulgularını desteklemektedir. Van den Bosch ve ark., (1993), değişik ülkelerden toplanan APEC izolatlarının %78'inde P fimbria kodlayan genler belirlemişlerdir. Knöbl ve ark. (2001), deve kuşlarından izole edilen *E. coli* izolatlarında suşların tamamında mannoz dirençli hemaglutinasyon saptamalarına rağmen *pap* geninin varlığını sadece yüksek patojen izolatlarda (%12.5) belirlemişlerdir. Janssen ve ark. (2001), *pap* operonunun varlığını işaret eden *papC* genini çalışılan suşların %30 kadarında belirlemişler ve *papC* bulunduran izolatların APEC'in daha virulent bir alt sınıfı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Delicato ve ark. (2003), *papC* genini APEC suşlarının %18.5'inde sağlıklı kanatlılardan izole edilen suşların ise %6'sında belirlemişlerdir. Ayrıca üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *E. coli* suşlarında belirlenen S fimbrialar (*sfa*) ve afimbrial adezinler (*afa*) (Yamamoto ve ark., 1995), APEC'lerin virülens özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda belirlenememiştir (Ngeleka ve ark. 1996; Janssen ve ark. 2001; Knöbl ve ark. 2001; Delicato ve ark. 2003). Bu çalışmada da, diğer çalışmalarla benzer şekilde kanatlı hayvanlardan izole edilen 200 adet *E. coli* suşunun hiçbirinde *sfa* ve *afa* genleri belirlenemedi.

Sonuç olarak yapılan çalışma kapsamında araştırılan özelliklerden hemoliz ve *cnf-1*' in APEC'lerde önemli birer virulens özelliği olmadığı düşünülmüştür. Buna karşın suşların büyük çoğunluğunda serum direnci/demir elde etme sistemi varlığı ve hemaglutinasyon özellikleri fenotipik testlerle suşların %90'ında, bu özellikleri kodlayan başlıca genlerin ise *traT/iucD/fimH* genlerinin suşların %88'inde birarada bulunduğu belirlenmiştir. Böylelikle bu özelliklerin APEC'in önemli virülens özellikleri olduğu düşünülmüştür. Ayrıca APEC'in virülens özelliklerine yönelik çalışmalarda tek bir özellik yerine çoklu özelliklerinin araştırılması gerektiği kanaatine varılmıştır. Moleküler testlerin fenotipik olarak pozitif belirlenen suşların tamamında belirlenememesi ilgili özellikleri birden fazla genin kodlayabileceği ve çalışmalarda bu genlerin de araştırılması gerektiği düşünülmüştür.

TEŞEKKÜR

Çalışma kapsamında kullanılan örneklerin toplanması ve çalışmanın yürütülmesindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Mehmet AKAN (A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji ABD)'a teşekkür ederiz. Bu araştırma, Ankara Üniversitesi, Bilim İnsanı Yetiştirme Projesi tarafından BİYEP, 2005K-120140-6 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Arda M, İzgür M, Akay, Ayhan H (1989). Tavuklardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının Kongo red'e bağlanma, mannoz direnci, patojenite ve antibiyotiklere duyarlılık özelliklerinin incelenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.*19, 185-198.
- Barnes JH, Gross WB (1997). Colibacillosis. In: Calnek, B.W., Barnes, J.H., Beard, C.W., Mac Dougald, R.L., Saif, Y.M. (Eds.), *Diseases of Poultry*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 131-141.
- Binns MM, Mayden J, Levine RP (1982). Further Characterization of Complement Resistance Conferred on *Escherichia coli* by the Plasmid Genes *traT* of R100 and *iss* of ColV, I-K94. *Infect Immun* 35, 654-659.

- Blanco JE, Blanco M, Gonzalez EA, Alonso MP, Garabal JI (1990). Comparative evaluation of three tests for the detection of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors (CNF1 and CNF2) using filtrates of cultures treated with mitomycin C. *FEMS Microbiol Lett* 69, 311-316.
- Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J (1997). Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J Clin Microbiol*, 35, 2953-2957.
- Da Silveira WD, Ferreira A, Brocchi ML, Hollanda MDA, Castro FPD, Yamada AT, Lancellotti M, Da Silveira WD, De Hollanda LM, De Castro, AFP (2002). Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol*, 85, 47-53.
- Delicato ER, De Brito BG, Gaziri L J, Vidotto MC (2003). Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol*, 94, 97-103.
- Dho-Moulin M, Fairbrother JM (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res*, 30, 299-316.
- Ellis MG, Arp LH, Lamont SJ (1988). Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys. *Am J Vet Res*, 49, 2034-2037.
- Emery DA, Nagaraja KV, Shawd P, Newman JA, White DG (1992). Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis*, 36, 504-511.
- Fantinatti F, Silveira WD, Castro AF (1994). Characteristics associated with pathogenicity of avian septicemic *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol*, 41, 75-86.
- İzgür M (1981). Sağlıklı koyunlardan izole edilen *E. coli* suşlarının çeşitli özellikleri üzerinde incelemeler. Doktora Tezi. Ankara Üniv. Vet. Fak., Ankara
- Janssen T, Schwarz C, Preikschat P, Voss M, Philipp HC, Wieler LH (2001). Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int J Med Microbiol*, 291, 371-378.
- Johnson JR, Stell AL (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis*, 181, 261-272.
- Kaipainen T, Pohjanvirta T, Shpigel NY, Shwimmer A, Pyörälä S, Pelkonen S (2002). Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet Microbiol*, 85i 37-46.
- Knöbl T, Baccaro MR, Moreno AM, Gomes TAT, Vieira MAM, Ferreira CSA, Ferreira AJP (2001). Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. *Vet Microbiol*, 83: 71-80.
- La Ragione, R. M., Woodward, M. J. (2002). Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Science*, 73, 27-35.
- Lafont JP, Dho M, D'hauteville HM, Brée A, Sansonetti PJ (1987). Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 55, 193-197.
- Linggood M, Roberts M, Ford S, Parry SH, Williams PH (1987). Incidence of aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals. *J Gen Microbiol*, 133, 835-842.
- Ngeleka M, Kwaga JK, White DG, Whittam TS, Riddell C, Goodhope R, Potter AA, Allan B (1996). *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationship among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect Immun*, 64, 3118-3126.
- Ørskov I, Ørskov F (1985). *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. *J Hyg Camb*, 95, 551-575.
- Payne SM (1988). Iron and virulence in the family Enterobacteriaceae. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 16: 81-111.
- Pfaff-McDonough SJ, Horne SM, Giddings CW, Ebert JO, Doetkott C, Smith MH, Nolan LK (2000). Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis*, 44, 23-33.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR (1994). Clinical Veterinary Microbiology. Mosby-Year Book Europe Limited, Lynton House, London WC1H9LB, England. s.: 209-236.
- Reingold J, Starr N, Maurer J, Lee M D (1999). Identification of a new *Escherichia coli* She haemolysin homolog in avian *E. coli*. *Vet. Microbiol*. 66, 125-134.
- Sambrook J, Russell W (2002). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed.), Cold Spring Harbor Press, New York, NY (2002).
- Sanchez CV, McDonald JS, Packer RA (1984). Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from cows with acute mastitis. *Am J Vet Res*, 45, 1775-1777.
- Smith JL, Fratomico PM, Gunther NW (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis*, 4, 134-163.
- Stuart ST, Grenwod KT, Luke RKJ (1980). Hydroxamate-mediated transport of iron controlled by Col V plasmid. *J Bacteriol*, 143, 35-42.
- Tsuji T, Joya JE, Honda T, Miwatani T (1990). A heat-labile enterotoxin (LT) purified from chicken enterotoxigenic *Escherichia coli* is identical to porcine LT. *FEMS Microbiol Lett*, 55, 329-161.
- Van Den Bogaard AE, London N, Driessen C, Stobberingh EE (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother*, 47, 763-771.
- Van Den Bosch JF, Hendriks JHIM, Gladigau I, Willems H MC, Storm, PK, De Graff FK (1993). Identification of F11 fimbriae in chicken *Escherichia coli* strains. *Infect Immun*, 61, 800-806.
- Vidotto MC, Müller EE, De Freitas JC, Alfieri AA, Guimarães IG, Santos DS (1990). Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis*, 34, 531-538.
- Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G (2006). The Enterobacteriaceae. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins s.: 211-308.
- Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O (1995). Detection of Urovirulence Factors in *Escherichia coli* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 12, 85-90.
- Yogarathnam V (1995). Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant. *Vet Rec*, 137, 215-217.