

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



**BROYLER'LERDE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*
İZOLATLARININ MOLEKÜLER TİPLENDİRME İLE
PREVALANSININ VE ÖNEMLİ VİRÜLENS ÖZELLİKLERİN
ARAŞTIRILMASI VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ
TESPİTİ**

Doktora Tezi

Evrin GENÇ

Danışman

Prof. Dr. Oktay GENÇ

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.20.024 proje numarası ve TÜBİTAK 222O846 nolu projesi ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Evrin GENÇ tarafından, Prof. Dr. Oktay GENÇ danışmanlığında hazırlanan “BROYLER’LERDE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* İZOLATLARININ MOLEKÜLER TİPLENDİRME İLE PREVALANSININ VE ÖNEMLİ VİRÜLENS ÖZELLİKLERİN ARAŞTIRILMASI VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ TESPİTİ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 26.7.2023 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. Salih OTLU Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Ahmet ÜNVER Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Özgür ÇADIRCI Ondokuz Mayıs Üniversitesi Besin hijyeni ve Teknolojisi Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Timur GÜLHAN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Oktay GENÇ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ 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 ☒

13/6/2023
Evrin GENÇ

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : BROYLER'LERDE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* İZOLATLARININ MOLEKÜLER TİPLENDİRME İLE PREVALANSININ VE ÖNEMLİ VİRÜLENS ÖZELLİKLERİN ARAŞTIRILMASI VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ TESPİTİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 13.06.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 5

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

13 /6 / 2023
Prof. Dr. Oktay GENÇ

ÖZET

BROYLER’LERDE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* İZOLATLARININ MOLEKÜLER TİPLENDİRME İLE PREVALANSININ VE ÖNEMLİ VİRÜLENS ÖZELLİKLERİN ARAŞTIRILMASI VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ TESPİTİ

Evrin GENÇ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı
Doktora, Temmuz/2023
Danışman: Prof. Dr. Oktay GENÇ

Antibiyotik büyütme faktörlerinin yasaklanmasından sonra, hem *Clostridium perfringens*’in neden olduğu hastalıkların ortaya çıkması hem de çoklu dirençli patojenlerin görülme sıklığının artmış olması hastalığın takibini ve bu amaçla araştırmaların yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle bu çalışmada, broyler’lerde *C. perfringens*’in sağlık ve hastalık olgularının takibi ve *C. perfringens* izolatlarının tanımlanarak virülens potansiyelinin araştırılması, prevalansın ve antimikrobiyal direnç durumunun ortaya konulması amaçlandı.

Araştırmada, 60 (%26.9) *C. perfringens* suşu PZR ile tanımlandı. Suşların toksinotiplendirmesinde sadece *cpa* geni tespit edilerek tüm suşlar tip A olarak belirlendi. 60 Tip A suşu içerisinde, 13 suşun *tpeL*, 12 suşun *cpe*, 3’ünün ise *cpb2* geni taşıdığı saptandı. *C. perfringens* için kullanılan antibiyotiklerin antibiyogram sonuçlarının yorumlanmasında henüz uluslararası kabul gören bir değerlendirme kriteri oluşturulamamıştır. Bu sebeple disk difüzyon test sonuçları penisilin G inhibisyon zonu referans alınarak, MİK sonuçları ise EUCAST, CLSI ve her iki kılavuzda yer almayan ancak araştırmacılar tarafından önerilen sınır değerler ve yorumlama kriterlerine göre değerlendirildi. Disk difüzyon testinde, penisiline dirençli 2 suş bulundu ve değerlendirilmeye alınmadı. Suşların tümü aminoglikozidlere, %77.6’sı linkomisine, %55.2’si eritromisine, %53.4’ü norfloksasine, %48.3’ü tetrasikline dirençli bulundu. Suşların %74.1 (43/58)’inde çoklu antibiyotik direnci belirlendi. Penisiline dirençli suşlar dahil olmak üzere 22 suşun agar dilüsyon MİK test sonuçları en yaygın kullanılan 7 antibiyotik için değerlendirildi. MİK sonuçlarına göre suşların tümü gentamisine, %68.2’si linkomisine, %45.5’i eritromisine, %40.9’u tetrasikline, %36.4’ü enrofloksasine, %9.1’i penisiline, % 4.5’i ampisiline dirençli bulundu. Agar dilüsyon yöntemine göre bu suşların % 55(11/20)’inin disk difüzyon yöntemine göre %75(15/20)’inin çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu belirlendi.

Bu araştırmada sadece tip A kaynaklı suşlar izole edilerek *tpeL*, *cpe* ve *cpb2* virülens genleri tespit edildi. Bu durum sağlıklı piliç mikroflorasına ait bilgiler ile uyushmaktadır. Bununla birlikte, çoklu antibiyotik dirençlilik sonuçları, *C. perfringens* antibiyotik direnç gelişiminin izlenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Anahtar Sözcükler: Antibiyogram, Antibiyotik direnci, *C. perfringens*, Toksin tiplendirilmesi, Virülens

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PREVALENCE AND IMPORTANT VIRULENCE CHARACTERISTICS OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ISOLATES IN BROILERS BY MOLECULAR TYPING AND DETERMINATION OF THEIR ANTIBIOTIC SENSITIVITY

Evrin GENÇ
Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Veterinary Microbiology
Ph.D., July/2023
Supervisor: Prof. Dr. Oktay GENÇ

After the prohibition of antibiotic-growth-factors, the emergence of *Clostridium perfringens*-related diseases and the growing prevalence of multi-drug-resistant pathogens highlight the necessity of researches in this area. Hence, this study aimed to identify *C. perfringens* isolates, assess their virulence potential, prevalence and determine their antimicrobial resistance status.

In this study, 60(26.9%) *C. perfringens* strains were identified by PCR, determined as type A (n=60) and confirmed by the *cpa* gene, and 13, 12, 3 strains carried the *tpeL*, *cpe*, *cpb2* genes, respectively. Internationally accepted criteria haven't yet been totally established in the interpretation of the antibiogram results for *C. perfringens*. Therefore, the evaluation of disk diffusion test was done based on inhibition-zone of penicillin-G as a reference, in comparison to MIC results performed according to EUCAST, CLSI, and the breakpoints and the criteria presented by the researchers, for those not included in both guidelines. In the disk diffusion test, 2 strains resistant to penicillin were found and weren't included in the evaluation. All of the strains were resistant to aminoglycosides, 77.6% to lincomycin, 55.2% to erythromycin, 53.4% to norfloxacin, 48.3% to tetracycline. MDR was found in 74.1%(43/58) of the strains. The agar dilution MIC test results of 22 strains, including penicillin-resistant strains, were evaluated for 7 most commonly used antibiotics. According to MIC results, all the strains were resistant respectively to gentamicin, 68.2% to lincomycin, 45.5% to erythromycin, 40.9% to tetracycline, 36.4% to enrofloxacin, 9.1% to penicillin, 4.5% to ampicillin. MDR was determined in 55%(11/20) of these strains according to the agar dilution method and 75% (15/20) according to the disc diffusion method.

In this study, only type A strains were isolated and *tpeL*, *cpe*, *cpb2* virulence genes were determined. This is consistent with the data on healthy-chicken microflora. In addition, the results of MDR suggest the necessity of monitoring *C. perfringens* antibiotic-resistance.

Keywords: Antibiogram, Antibiotic resistance, *C. perfringens*, Toxinotyping
Virulence

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile yol gösterici olan, tez çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen, bütün süreçte fikirlerime önem verip beni cesaretlendiren, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Oktay GENÇ'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüreklendirici sözleriyle bana akademik yolda yürüme şevki kazandıran, ilgi ve desteğiyle yanımda olan, tecrübelerinden faydalandığım kıymetli hocam Doç. Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ'a, Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Timur GÜLHAN, Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ ve Prof. Dr. Arzu FINDIK'a,

Mikrobiyoloji Anabilim dalı laboratuvar altyapısının oluşturulmasında önemli katkıları olan değerli hocam rahmetli Prof. Dr. Nevzat YURDUSEV'e teşekkürü bir borç bilir, şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamı destekleyen PYO.VET.1904.20.024 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi'ne ve 2220846 nolu proje ile TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen, haklarını asla ödeyemeyeceğim annem Ayşe GENÇ, babam İbrahim GENÇ'e ve varlıklarıyla hayatıma neşe katan destekçilerim, kardeşlerim Barış GENÇ, Serhat GENÇ ve Deniz GENÇ'e sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunuyorum.

Evrin GENÇ

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	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tarihçe	2
2.2. Taksonomi ve Etiyoloji	2
2.3. <i>C. perfringens</i> 'in Virülens Özellikleri ve Patogenezi	4
2.4. Bakteri Toksinleri	6
2.4.1. Alfa Toksin (CPA veya PLC)	7
2.4.2. Beta Toksin (CPB)	8
2.4.3. Epsilon Toksin (ETX)	8
2.4.4. Iota Toksin (ITX)	9
2.4.5. <i>C. perfringens</i> Enterotoksin (CPE)	9
2.4.6. Beta2 Toksin (CPB2)	10
2.4.7. Nekrotik Enteritis Benzeri Toksin (NetB)	10
2.4.8. <i>C. perfringens</i> Large Toksin (TpeL)	11
2.4.9. Kollajen Adezyon Protein (CNA)	12
2.5. <i>C. perfringens</i> Enfeksiyonların Patogenezi	12
2.6. <i>C. perfringens</i> Enfeksiyonunun Epidemiyolojisi	14
2.7. <i>C. perfringens</i> Enfeksiyonlarında Klinik Bulgular	15
2.8. <i>C. perfringens</i> Enfeksiyonlarında Teşhis	15
2.8.1. Klinik Teşhis ve Ayırıcı Tanı	15
2.8.2. Laboratuvar Teşhisi	16
2.9. Antimikrobiyal Maddeler	18
2.9.1. Antimikrobiyal Maddeler ve Etki Mekanizmaları	18
2.9.2. Antimikrobiyal Maddelere İn vitro Duyarlılık Yöntemleri	20
2.10. Antibiyotik Büyütme Faktörleri	22
2.11. Korunma ve Kontrol	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1. Örneklerin Toplanması	27
3.2. <i>C. perfringens</i> İzolasyonu	27
3.3. DNA Ekstraksiyonu	27
3.4. Bakteriyel Referans Suşlar	27
3.5. Suşların Moleküler İdentifikasyonu	27
3.6. <i>C. perfringens</i> Suşlarının Toksin Tip ve Virülens Genlerinin Tespiti	29
3.7. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	30
3.7.1. Disk Difüzyon Testi	30
3.7.2. Agar Dilüsyon Testi	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
4.1. <i>C. perfringens</i> İzolasyonu	34
4.2. <i>C. perfringens</i> Suşlarının Toksin Tip ve Virülens Genlerinin Tespiti	37
4.3. <i>C. perfringens</i> Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılık Test Sonuçları	41
5. SONUÇ	52
KAYNAKÇA	54
ÖZ GEÇMİŞ	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ABF	: Antibiyotik Büyütme Faktörü
ADT	: Antibiyotik Duyarlılık Testi
AMR	: Antimikrobiyal Direnç
bp	: Baz Çifti
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotрифosfat
ECOFF	: Epidemiyolojik Eşik Değer
fAFLP	: Fluorescent amplified fragment length polymorphism
FDA	: Food and Drug Administration
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
kDa	: Kilodalton
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
MDR	: Çoklu ilaç direnci
MİK	: Minimum İnhibitor Konsantrasyon
MLST	: Multi-Locus Sequence Typing
MLVA	: Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis
NE	: Nekrotik Enterit
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	: Ribozomal RNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>C. perfringens</i> 'in mikroskopik görüntüsü.....	3
Şekil 2.2. <i>C. perfringens</i> 'in virülens gen aktivasyonu ve toksin üretiminin VirS-VirR sistemi ile düzenlenmesi.....	6
Şekil 2.3. <i>C. perfringens</i> 'in besi yerinde makroskopik görüntüsü.....	17
Şekil 2.4. Gram yöntemi ile boyanmış <i>C. perfringens</i>	17
Şekil 4.1. <i>C. perfringens</i> 'in kültürel özellikleri	35
Şekil 4.2. <i>Clostridium spp.</i> ve <i>C. perfringens</i> 'in multipleks PZR ile saptanması.....	36
Şekil 4.3. <i>C. perfringens</i> 'in multipleks PZR ile tiplendirmesi.....	39
Şekil 4.4. <i>cpe</i> , <i>tpeL</i> ve <i>cpb2</i> genleri pozitif <i>C. perfringens</i> DNA'larının agaroz jel görüntüsü	39
Şekil 4.5. Penisilin dirençli suşların disk difüzyon görüntüsü	43
Şekil 4.6. Penisilin dirençli suşların agar dilüsyon görüntüsü	45
Şekil 4.7. Suşların üreme kontrolleri	45

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>C. perfringens</i> 'in major toksinleri ve tiplerine göre sınıflandırılması	3
Tablo 2.2. <i>C. perfringens</i> suşları tarafından salgılanan toksinler, genetik konumları ve aktiviteleri.....	4
Tablo 2.3. <i>C. perfringens</i> tipleri, toksintipleri ve neden olduğu enfeksiyonlar ve hayvan türleri	7
Tablo 2.4. Antimikrobiyal ajanlar ve etki mekanizması	19
Tablo 2.5. Yaygın kullanılan antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları.....	21
Tablo 3.1. 16S rRNA ve cpa genlerinin çoğaltılması için kullanılan primerlere ait diziler	28
Tablo 3.2. Multipleks PZR karışımında yer alan tamponlar ve konsantrasyonları.....	28
Tablo 3.3. Clostridium cins ve tür tespiti için PZR koşulları.....	29
Tablo 3.4. <i>C. perfringens</i> PZR amplifikasyon ürünlerinin; büyüklükleri, hedef toksin genleri, oligonükleotid primer dizileri.....	29
Tablo 3.5. <i>C. perfringens</i> virülens genlerin tespitinde kullanılan PZR koşulları.....	30
Tablo 3.6. Çalışmada kullanılan antibiyotikler, çözücüler ile dilüsyon sıvısı	32
Tablo 3.7. Antibiyotiklerin çalışma dilüsyon aralıkları	32
Tablo 3.8. MİK sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan referanslar	33
Tablo 4.1. <i>C. perfringens</i> 'in fenotipik izolasyonu ve genotipik identifikasyonu	35
Tablo 4.2. <i>C. perfringens</i> suşlarında tpeL, cpe ve cpb2 virülens genlerin dağılımı.....	40
Tablo 4.3. <i>C. perfringens</i> suşlarının virülens gen sonuçları	41
Tablo 4.4. <i>C. perfringens</i> suşlarının disk difüzyon testi ile antimikrobiyal duyarlılık sonuçları	43
Tablo 4.5. <i>C. perfringens</i> referans suşunun ve saha suşlarının penisilin duyarlılıkları	44
Tablo 4.6. <i>C. perfringens</i> suşlarının agar dilüsyon yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri (µg/ml).....	46
Tablo 4.7. MİK değerleri belirlenen <i>C. perfringens</i> suşlarının disk difüzyon yöntemine göre duyarlılık durumları.....	46
Tablo 4.8. <i>C. perfringens</i> suşlarının agar dilüsyon yöntemi ile tespit edilen MİK değerlerinin disk difüzyon test sonuçları ile karşılaştırılması	47

1. GİRİŞ

Clostridium cinsi bakteriler, insanların yanı sıra hayvanların sindirim kanalında ve dışkılarında, toprak, deniz sedimentleri, lağım, ayrılmış ve paslanmış ürünler gibi birçok farklı ortamlarda bulunan anaerobik, spor oluşturan, çubuk şekilli ve Gram pozitif yapılardır (Uzal et al., 2018). Bu cins, yıllık milyar dolarlık kayıplara neden olan ölümcül hastalıklardan sorumlu potansiyel egzotoksinleri üreten patojenleri içermektedir. Bazı patojenik *Clostridium* türleri, mikrobiyomun bir parçası olarak olumsuz etkiler ortaya çıkarmaksızın konakçıda yaşamlarını sürdürebilmektedir. *Clostridium* türleri, spor veya toksin (ler)i içeren kontamine yiyeceklerin alınması, derin yaralar, laserasyonlar veya yanıklar ile vücuda girer. *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) aynı zamanda insan ve hayvanların majör bir patojenidir. Yirmi adet toksini ile kuvvetli bir cephanelik olarak rol oynar (Rood et al., 2018).

Mikroflora etkenleri arasında yer alan *C. perfringens* sahip olduğu virülens faktörleri ile konağına zarar vermeden kommensal olarak yaşamını sürdürür. Ürettiği toksinler minimal düzeyde olduğundan az miktardaki toksinler normal şartlarda peristaltik hareketler ile dışarı atılır. Ancak yemdeki ani değişiklikler ile bakteri sayısı arttığında toksin eliminasyon hızı üretim hızından geri kalır ve böylece toksemi oluşur. Bu sebeple toksinlere karşı uygulamalar enterotokseminin ve toksine bağlı oluşan lezyonların önlenmesinde önemlidir. Bu sebeple korunma, predominant *C. perfringens* suşlarının virülens gen potansiyelinin aydınlığa kavuşturulması ile mümkündür.

Hayvanların sindirim sisteminde bulunan etkenler dışkı ile gıdalara ve çevreye bulaşarak veya antibiyotik dirençli suşların aktarılması ile insanlarda önemli gıda zehirlenmelerine neden olabilmektedir (Brynstad et al., 2001). Bu sebeple antibiyotik kullanımını dışlayan mikroflora yapısının korunmasına yönelik prebiyotik, probiyotik, organik asit ve faj çalışmaları sürdürülmektedir (Granstad et al., 2020; Bae et al., 2021). Bu uygulamaların yanında 2006 yılından itibaren patojenleri öldürmek amacıyla kullanılan antibiyotik katkı maddelerinin terk edilmesi sonucu *C. perfringens* enfeksiyonlarında antibiyotik direnç gelişimi bildirilmektedir (Li et al., 2020; Yadav et al., 2017). Bu tez projesi ile gerek sağlıklı gerekse ishallerde *C. perfringens* tip prevalansının belirlenerek, virülens potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışma ile ayrıca *C. perfringens* izolatlarının antibiyotik dirençliliğinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

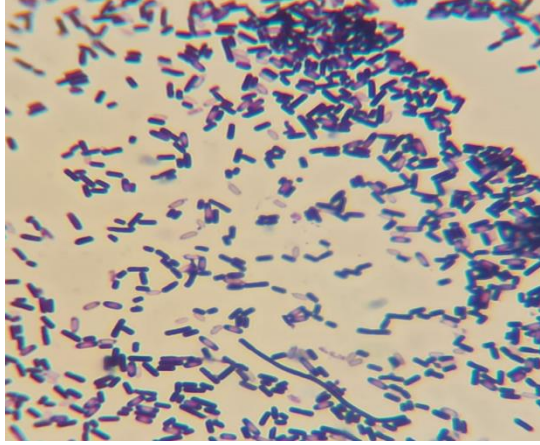
2.1. Tarihçe

C. perfringens, ilk kez 1892’de William Welch ve George Nuttall tarafından 38 yaşında kanser/tüberküloz hastasının ölümünden sekiz saat sonra yapılan nekropsiden izole edilmiştir. Önceleri *Bacillus aerogenes capsulatus*, *Bacillus perfringens*, *Bacillus welchii* veya *Clostridium welchii* olarak tanımlanmıştır. Daha sonra Latince’de "patlama" anlamına gelen perfringens kelimesi kullanılarak "*Clostridium perfringens*" olarak adlandırılmıştır (Lucey and Hutchins, 2004; Stiles et al., 2013).

C. perfringens, kümes hayvanlarında ilk kez 1930 yılında Avustralya’da Siyah Orpingron yarkalarının bağırsak lezyonlarından izole edilmiştir (M’Sadeq et al., 2015). Tavuklara etken verilerek hastalık oluşturulmuş ve bakterilerin bağırsak mukozasını enfekte ettiğinin görülmesi üzerine "altı gün hastalığı" olarak adlandırılmıştır (Johansson and Sarles, 1948). Ancak 1961 yılında İngiltere’de Parish tarafından bu terim "nekrotik enterit" olarak ifade edilmiş ve daha sonra bu tanımlama kullanılmıştır (M’Sadeq et al., 2015).

2.2. Taksonomi ve Etiyoloji

C. perfringens, Clostridia sınıfındaki Clostridiales takımının Clostridiaceae familyasındaki Clostridium cinsi içerisinde yer almaktadır. *C. perfringens*, toprakta, hayvanların ve insanların bağırsaklarında doğal olarak yer alan Gram pozitif, kapsüllü, anaerobik spor oluşturan hareketsiz bir bakteridir (Shojadoost et al., 2012; To et al., 2017). Optimum üreme 12-50°C sıcaklık aralığında ve pH 6.0 ile 7.0 arasında gerçekleşir. *C. perfringens*’in generasyon süresi 8-10 dakika olup bol miktarda gaz üretimi gerçekleştirir. Clostridia, aerobik koşullar altında gelişemez ve oksijene maruz kaldığında ölür. Olumsuz çevre koşullarına uzun süre maruz kaldığında endospor oluşturur. Sporlar, santral veya subterminal yer alır (Şekil 2.1) (Hafez, 2011).



Şekil 2.1. *C. perfringens*'in mikroskopik görüntüsü (Tez çalışmasından)

C. perfringens hayvanların ve insanların gastrointestinal florası (bağırsak mikroflorasında) yanısıra toprak, kanalizasyon, dışkı, altlık ve folluk gibi materyallerde de bulunur. Etken, sağlıklı tavukların bağırsak içeriğinde, 10^2 - 10^4 CFU/g iken hastalık durumunda yaklaşık 10^7 - 10^9 CFU/g'a yükselir (Calik et al., 2019; Cooper et al., 2013).

C. perfringens, ürettiği alfa (CPA veya PLC), beta (CPB), epsilon (CPE), iota (ITX), enterit B-benzeri toksin (NetB) ve enterotoksin (CPE) toksinlerine göre yedi toksinojenik tipe (A, B, C, D, E, F, G) ayrılmıştır (Tablo 2.1) (Rood et al., 2018).

Tablo 2.1. *C. perfringens*'in major toksinleri ve tiplerine göre sınıflandırılması (Rood et al., 2018)

TİP	TOKSİN ÜRETİMİ					
	Alfa (CPA veya PLC)	Beta (CPB)	Epsilon (ETX)	Iota (ITX)	CPE (CPE)	NetB (NetB)
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	+/-	-
D	+	-	+	-	+/-	-
E	+	-	-	+	+/-	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

'+' işareti, o toksinin üretimini gösterirken, '-', toksin üretiminin olmadığını göstermektedir.

Etlik civcivlerde *C. perfringens* kaynaklı enteritler genellikle 2 ile 6 haftalıkken ortaya çıkar. Etlik civcivlerde nekrotik enterite (NE), çoğunlukla NetB-pozitif *C. perfringens* tip G suşları neden olur ancak bazı araştırmacılar NE'nin NetB-negatif *C. perfringens* tip A suşları ile de oluşabildiğini ileri sürmektedirler. Sağlıklı broylerlere kıyasla, hastalıklı kümes hayvanlarından elde edilen *C. perfringens* izolatlarında *netB* geni taşıma prevalansı daha fazladır (Keyburn et al., 2008; Rood et al., 2018).

2.3. *C. perfringens*'in Virülens Özellikleri ve Patogenezi

C. perfringens suşlarının patofizyolojisinde temel virülens faktörleri olabilecek 20 den fazla tanımlanmış toksin veya enzim bildirilmektedir (Tablo 2.2) (Rood et al., 2018). *C. perfringens*'in toksin ve enzimleri, (1) Hücre membranına zarar veren enzimler, (2) por oluşturan toksinler, (3) hücre içi toksinler ve (4) hidrolitik enzimler olarak dört gruba ayrılırlar (Revitt-Mills et al., 2015; Rood et al., 2018).

Tablo 2.2. *C. perfringens* suşları tarafından salgılanan toksinler, genetik konumları ve aktiviteleri (Revitt-Mills et al., 2015; Rood et al., 2018)

Toksin/enzim	Gen	Aktivite	Gen lokasyonu
Alfa-toksin	<i>plc</i> veya <i>cpa</i>	Fosfolipaz C, hemolitik, dermonekrotik, miyonekrotik ve sifingomyelinaz	Kromozom
Beta-toksin	<i>cpb</i>	Por oluşturan toksin	Plazmid
Epsilon toksin	<i>etx</i>	Por oluşturan toksin	Plazmid
Iota-toksin	<i>iap/ibp</i>	Aktin-spesifik ADP ribozil transferaz	Plazmid
Enterotoksin	<i>cpe</i>	Por oluşturan toksin	Kromozom veya Plazmid
Teta-toksin veya perfringolizin O	<i>pfoA</i>	Por oluşturan toksin	Kromozom
Beta2-toksin	<i>cpb2</i>	Geçici por oluşturan toksin	Plazmid
TpeL	<i>tpeL</i>	Ras-spesifik monoglukoziltransferaz	Plazmid
NetB	<i>netB</i>	Por oluşturan toksin	Plazmid
BecA, BecB	<i>becA/B</i>	Aktin-spesifik ADP riboziltransferaz	Plazmid
NetE, NetG	<i>netE/ G</i>	Geçici por oluşturan toksin	Plazmid
NetF	<i>netF</i>	Por oluşturan toksin	Plazmid
NanI ,NanJ, NanH	<i>nanI</i>	Sialidaz	Kromozom
Kappa-toksin	<i>coIA</i>	Kollagenaz	Kromozom
Mu-toksin	<i>nagH</i>	Hyaluronidaz	Kromozom
Lambda-toksin	<i>lam</i>	Proteaz	Plazmid
alfa-clostripain	<i>ccp</i>	Sistein Proteaz	Kromozom
Delta-toksin	<i>cpd</i>	Por oluşturan toksin	Plazmid

Tablo 2.2. (devam). *C. perfringens* suşları tarafından salgılanan toksinler, genetik konumları ve aktiviteleri (Revitt-Mills et al., 2015; Rood et al., 2018)

Toksin/enzim	Gen	Aktivite	Gen lokasyonu
CPILE (<i>C.perfringens</i> ioata like enterotoksin)	<i>cpile</i>	Aktin-spesifik ADP riboziltransferaz	-

C. perfringens, bağırsak kolonizasyonu ve patogenezi ile bağlantılı olan toksin, antimikrobiyal direnç (AMR) ve kollajen adhesin genleri dahil olmak üzere virülensle ilgili genleri kodlar (Kiu and Hall, 2018). Ancak bu toksinlerin hastalığın patogenezindeki rolleri epidemiyolojik ve klinik-patolojik olguların incelenmesi ile mümkündür. Nekrotik enteritis vakalarından izole edilen *C. perfringens* suşlarının virülens genleri sağlıklı piliçlerden izole edilenler ile karşılıklı araştırılmaktadır. Patogenezdeki rolleri tam olarak bilinmeyen *netB* ve *tpeL* genleri en çok araştırılan genlerdir. Broylerlerde, *C. perfringens* Tip A, Tip C ve Tip G suşları hastalık oluşturmaktadır (Rood et al., 2018; Uzal et al., 2014). *C. perfringens* Tip A, Tip C ve Tip G suşlarının hastalığın şiddetini artırmada etkili beta2 toksini (*cpb2*), TpeL (*tpeL*), enterotoksin (*cpe*), adezin kodlayıcı (*cnaA*) gibi çeşitli toksinlerin bir veya daha fazlasını ürettiği bildirilmiştir (Gu et al., 2019; Lepp et al., 2013; Rood et al., 2018; Wade et al., 2015). Birçok toksijenik patojenin aksine, *C. perfringens* üremenin erken aşamasında (erken ile orta logaritmik faz) çeşitli toksinler üretir. *C. perfringens*'te virülens gen aktivasyonu ve toksin üretimi iki bileşenli düzenleyici sistemler (VirR/VirS), quorum sensing ve/veya sporülasyonla ilgili alternatif sigma faktörleri ile düzenlenir (Gohari et al., 2021). İki bileşenli sinyal iletim sistemi olan VirR/VirS, *C. perfringens*'in alfa (*plc*), teta (*pfoA*), kappa, NetB toksin ve ayrıca hyalüronidaz, sialidaz gibi enzim ve proteinlerin ekspresyonunu düzenler (Şekil 2.2) (Fathima et al., 2022; Gohari et al., 2021; Shimizu et al., 2002).

C. perfringens suşlarının neden olduğu çoğu hastalık, bakterinin bir veya daha çok toksininin sinerjik etkisi ile meydana gelmektedir. Tablo 2.3’de *C. perfringens* toksintipleri ve neden olduğu enfeksiyonlar belirtilmiştir (Zaragoza et al., 2019).

Tablo 2.3. *C. perfringens* tipleri, toksintipleri ve neden olduğu enfeksiyonlar ve hayvan türleri (Zaragoza et al., 2019)

Patojenik <i>C. perfringens</i> suş		
Tip	Toksin	Hastalık
A	CPA	Miyonekroz (insan ve hayvan) gastroenteritis (hayvan)
B	CPA, CPB, ETX	CPB: Nekrohemorajik enteritis (hayvan) ETX: Dizanteri (koyun) ve enterotoksemi veya yumuşak böbrek (geviş getirenler)
C	CPA, CPB	CPB: Enterit nekrotikler veya pigbel (insan) ve nekrotik enteritis, enterotoksemi (hayvan)
D	CPA, ETX	ETX: Enterotoksemi veya yumuşak böbrek (geviş getirenler) hastalığı
E	CPA, ITX	ITX: Hemorajik enteritis (geviş getirenler) ve enterotoksemi (tavşanlar) konfirmasyon gerekli
F	CPA, CPE	CPE: Gıda zehirlenmesi, antibiyotikle ilişkili ishal, sporadik ishal ve ani bebek ölüm sendromu (SIDS) (insanlar) ve gastrointestinal hastalıklar(hayvanlar)
G	CPA, NetB	NetB: Nekrotik enterit (kanatlı)
H1	CPA CPB2	Gıda zehirlenmesi, sporadik gastroenteritis (kanatlı orijinli)
H2	CPA, CPB2	Gıda zehirlenmesi, sporadik gastroenteritis (kanatlı orijinli)
I	CPA, CPB2 CPE, CPA, BEC/CPILE	Gıda zehirlenmesi, sporadik gastroenteritis (kanatlı orijinli)

Tüm toksin tipleri ile hayvanlarda hastalık oluşurken insanlarda sadece tip A (CPA), tip C (CPA ve CPB) ve tip F (CPA ve CPE) ile hastalık meydana gelmektedir (Li et al., 2013; Uzal et al., 2010).

2.4.1. Alfa Toksin (CPA veya PLC)

Tüm *C. perfringens* tipleri tarafından üretilen tek toksin olup kromozomda yer almaktadır. Toksinin, N-terminal (1–246) ve C-terminal (247–370) 2 ilmeği vardır. Aktif toksin; 370 rezidü içeren Zn bağımlı bir metalloproteaz, fosfolipaz, sfingomyelinaz, lesitinaz aktiviteli ve 42.5 kDa büyüklüktedir. Bu toksin, fosfolipaz C sfingomyelinaz enzimi ile hücre zarının fosfolipidlerini hidrolize ederek hücre ölümüne neden olur. Bu yüzden α -toksinin biyolojik aktivitesi sitolitik, hemolitik,

dermonekrotik ve öldürücü olarak tanımlanmıştır (Ferreira et al., 2016; Sakurai et al., 2004).

Alfa toksin, en yoğun olarak tip A suşları olmak üzere Tablo 2.3’de görüldüğü üzere tüm *C. perfringens* tipleri tarafından üretilir. Hem insanlarda hem de hayvanlarda travmatik orijinli enfeksiyonlara neden olur. *C. perfringens* tip A suşları genellikle çevrede ve sağlıklı broylerlerin bağırsak florasında bulunmaktadır. Ancak virülant suşlarının hasta broylerlerde çok daha yüksek α -toksin ürettiği tespit edilmiştir (Hofshagen and Stenwig, 1992). Diğer hayvanlarda Tip A suşları, kuzularda sarı kuzu hastalığı olarak bilinen enterotoksemi ile sığır, domuz, at ve keçilerde enterit ve enterotoksemiye sebep olmaktadır. İnsanlarda da gazlı gangren ve myonekroza neden olmaktadır (Revitt-Mills et al., 2015).

2.4.2. Beta Toksin (CPB)

C. perfringens beta-toksini, nekrotizan enterokolit ve enterotoksemiye neden olan bir toksindir. Ergin hayvanlar etkilenebilse de en sık genç hayvanlarda görülür (Nagahama et al., 2015). Tripsine duyarlı olan bu toksin, hem tip B hem de tip C tarafından üretilir (Tablo 2.1). Molekül ağırlığı 38 kDa olan bu toksin plazmide lokalize olmuş *cpb* geni tarafından kodlanır (Li et al., 2013). Toksinin sitolitik, dermonekrotik ve öldürücü biyolojik aktivitesi vardır; ancak etki şekli henüz tanımlanmamıştır (Petit et al., 1999). Patogenezi tam olarak anlaşılamamış olsa da ölümlerin CPB ve ETX’in kombine etkisi ile meydana geldiği şeklindedir. İnsanlar, domuzlar tip C enfeksiyonlarına duyarlıdır. Hastalık, tripsin inhibitörlerinden zengin ve zayıf hijyenik yemler ile beslenen hayvanlar ile ilişkilendirilmiştir. Bağırsakta tripsin inhibitörlerinin varlığı, CPB’nin varlığını kolaylaştırır ve toksin barsak epitel hasarına neden olarak kan dolaşımına katılır. Tip C enfeksiyonları, tüm hayvanlarda özellikle yeni doğanlarda nekrotik enteritise yol açmaktadır. Floranın yetersizliği ve kolostrum tüketiminden dolayı bağırsaktaki düşük tripsin varlığı önemli risk faktörleridir. Tip C enfeksiyonlarına bağlı ölüm oranları %50-100 arasında değişebilmektedir (Nagahama et al., 2015; Songer, 1996).

2.4.3. Epsilon Toksin (ETX)

ETX, aerolizin-benzeri por oluşturan toksin familyası *Aeromonas hydrophila* tarafından oluşturulan aerolizin, *Bacillus thuringiensis* tarafından oluşturulan parasporin-2 ve *Laetiporus sulphureus* tarafından oluşturulan por-oluşturan lektin

(LSL) ile yapısal benzerlik taşır. Bu proteinlerin primer yapıları %20 den az benzerlik göstermekle birlikte şekilleri ve β zincir yapıları yüksek düzeyde benzerlik gösterir (Alves et al., 2014). ETX, 32.981 kDa büyüklükte protoksin olarak salgılanır ve tripsin, kimotripsin gibi proteolitik enzimler tarafından aktif protein haline dönüştürülür (Knapp et al., 2009).

C. perfringens Tip D suşları koyun, keçi ve farelerde, Tip B suşları ise D tipi izolatin virülensi için esastır ancak B tipi izolatlarda da bulunabilir ve en öldürücü bakteriyel toksinlerden biri olarak kabul edilir (Uzal et al., 2010).

2.4.4. Iota Toksin (ITX)

C. perfringens iota toksini, tip E suşları tarafından üretilir ve aynı plazmidde lokalize ilave bir enterotoksin geni içerir. Bu toksin, buzağılar ve koyunlar arasında sporadik diyare salgınlara neden olur. *C. perfringens* iota toksini, 1940 yılında Bosworth tarafından tanımlanmıştır. 45 yıl sonra *C. spiroforme*'ye karşı çapraz reaksiyon gösteren antiserumdan yararlanılarak çiftli yapısı keşfedilmiştir (Dwivedi et al., 2015). Iota toksinini oluşturan iki protein belirlenmiştir. ITX, çapraz immün-elektroforezdeki hareketine göre Iota a veya Ia (yavaş hareket eden) ve Iota b Ib (hızlı hareket eden) olarak ikiye ayrılmıştır (Gibert et al., 2011). Ia enzimatik aktiviteye sahip iken Ib bağlanmada rol oynamakta ve Ia'nın molekül ağırlığı yaklaşık 47 kDa iken Ib'nin ki 74 kDa dır (Sakurai et al., 2009).

2.4.5. *C. perfringens* Enterotoksin (CPE)

C. perfringens enterotoksin (CPE), tip C, D, E ve F suşları tarafından oluşturulan ve por aktivitesine sahip 35,5 kDa'lık polipeptit yapılı bir toksindir (Czeczulin et al., 1993; Gohari et al., 2021). İnsanlarda gıda zehirlenmesi, antibiyotik bağımlı diyare (ADD), sporadik diyare (SD) ve ani infant ölüm sendromuna (SIDS) neden olmaktadır (Miyamoto et al., 2004). Gıda zehirlenmesi vakalarının %70'i kromozomal-cpe kaynaklı, gıda kaynaklı olmayan gastroenteritlerin ise plazmid-cpe (tüm vakaların %5-15'inden sorumludur) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Grant et al., 2008). Gıda kaynaklı izolatların yaklaşık %11-15.6'sı diğer *C. perfringens* izolatların ise %1-5'inde cpe geni bulunmaktadır (Abdel-Glil et al., 2021).

CPE oluşumu sporulasyon ile birlikte düzenlenir. Fazla miktarda vejetatif bakterinin alımı sonrası bağırsak lümeninde CPE salınımı sonrası sporulasyon meydana gelmektedir. Sporulasyonda oluşan enterotoksin, hücrenin tight junction

bölgesindeki klaudin reseptörlerine bağlanarak hücre membranında düzensiz Ca girişi ve onkozise neden olur ve membranda por oluşturan kompleks oluşturur. Semptomlar 24 saati geçmeden ortaya çıkar ve nadiren ölümcüldür (Freedman et al., 2016). Bazı veriler evcil ve yabani hayvanlarda gastrointestinal hastalıklarla ilişkili olduğunu gösterse de CPE'nin hayvanlardaki rolü hala net değildir (Uzal et al., 2010).

2.4.6. Beta2 Toksin (CPB2)

Beta2 toksini 28 kDa molekül ağırlığında, plazmide lokalize olan *cpb2* toksin geni tarafından kodlanan sitolitik bir toksindir (Petit et al., 1999). CPB2'nin hastalığa katkıda bulunduğuna dair kesin bir kanıt olmamasına rağmen, bu toksini içeren suşların bazı hayvan hastalıkları ile ilişkisinin hastalık gelişimine katkısı olduğu düşünülmektedir. Keşfinden sonra β 2-toksijenik *C. perfringens* suşları ishalleri atlardan, koyunlardan ve sığırlardan da izole edilmiştir (Garmory et al., 2000; Lebrun et al., 2007).

2007'de Hollanda'da yapılan bir çalışmada, araştırmacılar beta2 toksinin yumurtacı tavuklarda subklinik NE ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Allaart et al., 2012). 2019 yılında *cpb2* gen varlığı NE'li broylerlerin *C. perfringens* Tip A suşlarında %57.25, sağlıklı broylerlerde ise %7.5 civarında tespit edilmiştir (Kumar et al., 2019). İnsanlarda *cpe* genini taşıyan sporadik ve antibiyotikle ilişkili ishal oluşumundan sorumlu *C. perfringens* suşlarında tespit edilmiştir (Fisher et al., 2005).

2.4.7. Nekrotik Enteritis Benzeri Toksin (NetB)

C. perfringens tip G suşlarının, ürettiği α -toksin ve NetB toksinleri ile tavuklarda nekrotik enterite neden olduğu bilinmektedir. Ancak Keyburn vd. (2008), yaptıkları deneysel bir çalışmada, alfa toksin negatif, NetB üreten *C. perfringens* suşlarının, tavuklarda subklinik nekrotik enterit lezyonlarına neden olduğunu ve bu genin mutasyonu ile hastalığın oluşmadığını göstermiş ve *netB* toksin geninin önemini belirtmişlerdir. Koch postulatı kriterlerine göre NetB toksin tavuk hastalık modeli oluşturulmuştur (Keyburn et al., 2010).

NetB, diğer por oluşturuvcu toksinler gibi sınırlı diziye sahip olup beta toksin ile %38, delta toksin ile %40 ve *Staphylococcus aureus*'un alfa-hemolizini ile %31 civarında benzer dizilere sahiptir. Beta toksin ile benzer moleküler ağırlığa sahip 33

kDa boyutundadır (Keybrun et al., 2010; Keyburn et al., 2008). NetB, diğer birçok *C. perfringens* toksinleri ve antibiyotik direnç genleri gibi, konjugatif plazmidlerde kodlanır. NetB toksin geni, 85 kb'lik bir plazmid üzerinde bulunan 42 kb'lik bir patojenite lokusunda (NELoc-1) bulunur. Ayrıca *C. perfringens*'in NE patogenezinde rol oynayan iki patojenite lokusu daha içerdiği gösterilmiştir. NELoc-3, NELoc-1 gibi plazmidde, NELoc-2 ise kromozomda bulunur (Lepp et al., 2013; Lepp et al., 2010). Bir çalışmada, NetB kodlayan suşların hem plazmidlerde hem de kromozomda olduğu gösterilmiştir (Lacey et al., 2017).

Por oluşturan diğer pek çok toksinde olduğu gibi, NetB toksini de, membranı bozarak ozmotik basınç ve hücre nekrozu ile hücre parçalanmasına yol açar. NetB toksininin alfa hemolizin gibi bir kolesterol kaynağı mevcut olduğunda arttığı bilinse de bağırsakta hücre ölümüyle ilgili rolü araştırılmamış ve hücreye bağlanmak için kullandığı reseptör hala bilinmemektedir (Rood et al., 2016).

NetB toksini içeren izolatların yüzdesi (sağlıklı ve enfekte kuşlarda) ülkeden ülkeye değişir. Hasta tavuklarda *netB* geni, Avustralya'da % 70, Avrupa'da % 58 oranlarında tespit edilmiştir (Keyburn et al., 2010; Martin and Smyth, 2009). Ancak genotipin, yani *netB* geninin varlığı kendi başına *C. perfringens*'in virülensini tahmin etmek için yetersizdir. Danimarkada yapılan bir çalışmada, araştırmacılar hastalıklı tavukların aksine sağlıklı tavuklarda yüksek oranda (% 61) *netB* geni içeren *C. perfringens* suşları bulduklarını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, hastalıklı kuşlardan elde edilen izolatların, sağlıklı kuşlardan elde edilen izolatlara göre daha yüksek oranda bu toksini in vitro ortamda ürettiğini bildirmişlerdir (Abildgaard et al., 2010).

2.4.8. *C. perfringens* Large Toksin (TpeL)

C. perfringens'in large Clostridial glikosile edici toksin (CGT) ailesi içerisinde yer almakta ve 205 kDa bir proteindir (Amimoto et al., 2007). TpeL toksininin, tavuklarda *C. perfringens* tip A'nın şiddetini arttırdığı bildirilmiştir (Coursodon et al., 2012). TpeL üretiminin zamanlaması tartışmalıdır. Bu konuda yapılan çalışmalar tpeL ekspresyonunun vejetatif üreme esnasında gerçekleştiğini gösterse de sporulasyon esnasında ekspresyonu ile ilgili bilgi de mevcuttur (Paredes-Sabja et al., 2011). Amimoto vd. (2007), yaptıkları çalışmada *C. perfringens* tip C'nin kültür filtratlarından TpeL toksinini belirlemişler ancak tip B suşlarının kültür filtratlarında tespit edememişlerdir. Ancak PZR ile 1 adet tip B suşunda tespit

edilmiştir. Araştırmacılar bu toksinin MLD'sini 62 mg/fare, sitotoksik aktivitesini ise Vero hücrelerinde $6,02 \times 10^5$ sitotoksik ünite (CU)/mg olarak belirlemişlerdir.

Son olarak, tip B ve C suşlarının neden olduğu hastalıklar sırasında bağırsaklarda üretildiği tahmin edilen TpeL'nin, tripsin uygulaması sonrası sitotoksitesi azalan bir toksin olduğu tanımlanmıştır. Bu bulgu, beta toksin gibi TpeL'nin hastalık, diyet veya yaşa bağlı olarak tripsin seviyeleri azalmış konakçılarda tip B ve C enfeksiyonlarında potansiyelini bildirmiştir (Chen and McClane, 2015).

Plazmid orijinli olan TpeL, treonin 35'te Ras proteinlerinin N-asetilglukozaminilasyonuna neden olarak GTPazları etkisiz hale getirerek yangı ve hücre ölümüne yol açan sayısız sinyal yolağını indükler (Guttenberg et al., 2012). Nekrotik enteritli tavuklardan *tpeL* negatif *netB* pozitif tip G suşlarının izolasyonu, TpeL'in nekrotik enteritteki rolü hakkında spekülasyonlara yol açmıştır (Chalmers et al., 2008). Ancak daha sonraki çalışmalar, *tpeL* pozitif ve *netB* pozitif tip G suşlarının, *tpeL* negatif *netB* pozitif tip G suşlarından daha virulent olduğunu göstermiştir (Coursodon et al., 2012).

2.4.9. Kollajen Adezyon Protein (CNA)

Kollajen yapışma proteini (CNA) dahil olmak üzere çeşitli *C. perfringens* proteinleri, hastalığın patogenezinde adezinler olarak işlev görmektedir (Martin and Smyth, 2010). *C. perfringens*'in bağırsağa yapışması için gerekli olan VR-10B kromozomal lokusunda kodlanan ve 3 alt birimden oluşan (CnaA, FimA ve FimB) bir pilus üretilir (Prescott et al., 2016; Wade et al., 2015). *C. perfringens* suşlarının, hücre dışı matris proteinlerine yapışması hastalığın virülensiyle ilişkilendirilmiştir (Lepp et al., 2021). Lepp vd. (2013), *cnaA* geninin, hem sağlıklı hem de NE'li tavuklarda, Wade vd. (2015), ise kollajen adhezin kodlayan geni taşıyan genin NE'li virulent suşlarda varlığını bildirmişlerdir.

2.5. *C. perfringens* Enfeksiyonların Patogenezi

C. perfringens, normalde tavukların sağlıklı bağırsak florasında bulunan fırsatçı bir patojen olup sağlıklı bir bağırsakta, düşük seviyelerde enzim ve toksin salgılar. Bağırsakta epitel hücreleri tarafından salgılanan çeşitli antimikrobiyal moleküller içeren mukus mäsinden zengin olup patojenlerin kolonizasyonunu engeller. Ancak bağırsak mukozasının hasar görmesi, bağırsakta düşük pH seviyesi,

koksidiya ile ko-enfeksiyon durumlarında, suda çözünen sindirimi zor kolay fermente olabilen karbonhidrat ve protein içeriği yüksek yemler, yoğun antimikrobiyallerin kullanımı, bağırsak motilitesinin ve mikrobiyatasının bozulmasına ve *C. perfringens*'in çoğalmasına yol açar (Prescott et al., 2016).

Mukoza üzerine lokalize olan patojen sahip olduğu hidrolaz enzimleri ile mükünleri yıkımlar ve mikro koloniler oluşturur. Özellikle *Eimeria* gibi predispozan faktörler, T hücre aracılı bir yangısal yanıtı uyararak, konakçı bağırsak epitel hücrelerinde artan mukojenez ve doku hasarı ile esansiyel amino asitlerin salınımına sebep olur (Collier et al., 2008). Serbest kalan mükünler ve esansiyel amino asitler sayesinde hastalık oluşturabilecek eşik yoğunluğa ulaşıldığında (yaklaşık 10^7 - 10^9 CFU/g dışkıda) Agr-benzeri quorum sensing algılama sistemi veya VirS-VirR iki bileşenli düzenleyici sistemini kullanarak patojenin adezyonunda rol oynayan virülens gen lokusunda yer alan NELoc-1'i aktive ederek CPA ve NetB toksinlerin ekspresyonunu sağlar (Keyburn et al., 2008; Prescott et al., 2016; Yu et al., 2017). *C. perfringens* tarafından salgılanan NetB gibi por oluşturucu toksinleri takiben proteolitik ve kollajenolitik enzimler ile hücreler arası bağlara zarar vererek bağırsak epitelinin yıkımına neden olur. Patojen tarafından salgılanan α -toksin ve TpeL gibi doku yıkımlayıcı toksinler de *C. perfringens*'in çevre dokulara yayılımına ve besinlerin malabsorpsiyonu ile ilişkili hafif mukozal hasara yol açabilir (Prescott et al., 2016). Ayrıca Agr quorum sensing sistemi, α toksin ve perfringolizinin salgıları ile submukozada biyofilm oluşturur. Biyofilmler, bakterinin yüzeye yapışmasını, konakçı savunmasından ve antibiyotiklerden koruyan polimerler oluştur (Vidal et al., 2015). *C. perfringens* enterotoksin (CPE) bağırsak bütünlüğünü sağlayan tight junctions proteinlerine (özellikle claudin-3 ve claudin-4) bağlanır ve yaklaşık 90 kDa büyüklüğünde "küçük kompleks"ler oluşturur. Bu küçük kompleksler bir araya gelerek hücre zarında kalsiyum yapılarını bozarak por oluşumuna yol açar ve hücre ölümüne neden olur (Freedman et al., 2016). Nekrotik enteritin büyük lezyonları tipik olarak jejunum ve ileum ile sınırlıdır ancak duodenum ve sekumda da oluşabilir. Nekropside barsak gazla dolu, parçalanmış gibi sarı veya sarı-turuncu psödomembran ile kaplı olup bu görüntü 'kirli Türk havlusu' olarak tanımlanır (Broussard et al., 1986). *C. perfringens*, dolaşım sistemine ve safra yollarına geçerek kolanjiyohepatit ve hepatitise neden olarak ölüme neden olur (Van Immerseel et al., 2004).

2.6. *C. perfringens* Enfeksiyonunun Epidemiyolojisi

C. perfringens hayvanların ve insanların normal gastrointestinal florasında ayrıca toprak, kanalizasyon, dışkı, altlık ve folluk gibi materyallerde bulunur. Özellikle tavuk bir *C. perfringens* rezervuarıdır. Flora etkeni iken, ürettiği toksinler ile virulent hale geçer ve insanlarda ve hayvanlarda hastalıklara neden olur (Uzal et al., 2014). Etkenin vertikal bulaş şekli nadir olup genellikle yatay bulaş söz konusudur. *C. perfringens*, etlik piliçlerin bağırsak mikroflorasının yaklaşık %75-95'ini oluşturmaktadır (Svobodova et al., 2007). Kümes hayvanlarında normal bağırsak mikroflorasında yer alan *C. perfringens* genellikle sağlıklı tavukların bağırsak içeriğinde 10^5 cfu / g'den az bulunur (Calik et al., 2019).

Yüksek miktarda hayvansal yan ürün (örn. balık unu), buğday, arpa, yulaf veya çavdar, kuşları nekrotik enterite yatkın hale getirir. Aşırı bakteri üremesini ve toksin üretimini teşvik eden veya yemin ince bağırsakta geçiş hızını yavaşlatan herhangi bir faktör nekrotik enterite neden olabilir. Yüksek enerjili, protein açısından zengin, buğday veya arpa bazlı yemlerle beslenen kuşların NE'si, mısıra dayalı yemlerle beslenen kuşlardan 10 kat daha fazla oranda gözlenmektedir (Cooper and Songer, 2009). Aflatoksin ve/veya koksidiya varlığı da (Hamouda et al., 2011) NE için predispozan faktör olarak işlev görür. Özellikle *Eimeria spp.* ile enfeksiyonda *C. perfringens* bakterilerinin veya bunların toksinlerinin enterositlerine erişimini kolaylaştırır (Moore, 2016). Altlıkta yetiştirilen 2 ila 5 haftalık etlik civcivlerde doğal NE salgınları bildirilmiştir. Bu salgınlarda ölüm oranı günde %1'e toplamda ise %10-40'a ulaşabilmiştir (Shaaban et al., 2017). Küresel tavukçuluk endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olan hastalığın 2015 yılında 6 milyar dolarlık tahmini maliyetle dünya broyler sürülerinin %37.3'ünü etkilediği bildirilmektedir (Yang et al., 2018).

Kontamine tavuk ürünleri, *C. perfringens* gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olmakta ve potansiyel bir halk sağlığı patojeni olarak değerlendirilmektedir. İnsanlarda gıda kaynaklı salgınlarda *Campylobacter* ve *Salmonella* gibi diğer bazı patojenlerden sonra en sık izole edilen hatta ABD'de gıda zehirlenmesinin en yaygın ikinci bakteriyel patojenidir (Grass et al., 2013; Uzal et al., 2014).

2.7. *C. perfringens* Enfeksiyonlarında Klinik Bulgular

C. perfringens enfeksiyonları maternal antikor titrelerinin düştüğü 2 haftalık yaştan sonuna ve immün sistemin olgunluğa erişiminden önce 3-4 haftalık yaşta yaygın olarak görülmektedir (Cooper et al., 2013). Klinik belirtiler arasında depresyon, dehidratasyonu ishal, tüylerin kabarması ve yem tüketiminin azalması yer almaktadır. Kümes hayvanlarında *C. perfringens* enfeksiyonları, akut veya subklinik olarak ortaya çıkmaktadır. Akut formda, etlik piliç yetiştiriliğinin son haftalarında artan mortalite belirgindir. Subklinik formda ise bağırsak mukozasında hasar sonucunda yemin sindiriminin ve emiliminin azalmasından dolayı ağırlık artışı ve yemin verime dönüşüm oranı azalır. Ayrıca, tavuklarda hepatit, kolanjiohepatit ve enteritler gözlenir (Van Immerseel et al., 2004; Timbermont et al., 2011). Vertikal bulaşmadan dolayı yumurtadan yeni çıkmış civcivlerde klostridyum kaynaklı hepatitler ve enteritler meydana gelebilmektedir. Bu durum, *C. perfringens*'in kümes hayvanlarından gıda zinciri yoluyla insanlara bulaş riskini oluşturur. Hastalık bir sürüde genellikle 5-14 gün devam eder ve ölüm oranı %2-50'dir (Shojadoost et al., 2012). NE'nin klinik formu yüksek düzeyde mortaliteye neden olsa da NE'nin subklinik formunda herhangi bir klinik belirti göstermeden varlığını sürdürebildiği için klinik formdan ekonomik olarak daha önemlidir (Dahiya et al., 2006).

2.8. *C. perfringens* Enfeksiyonlarında Teşhis

2.8.1. Klinik Teşhis ve Ayırıcı Tanı

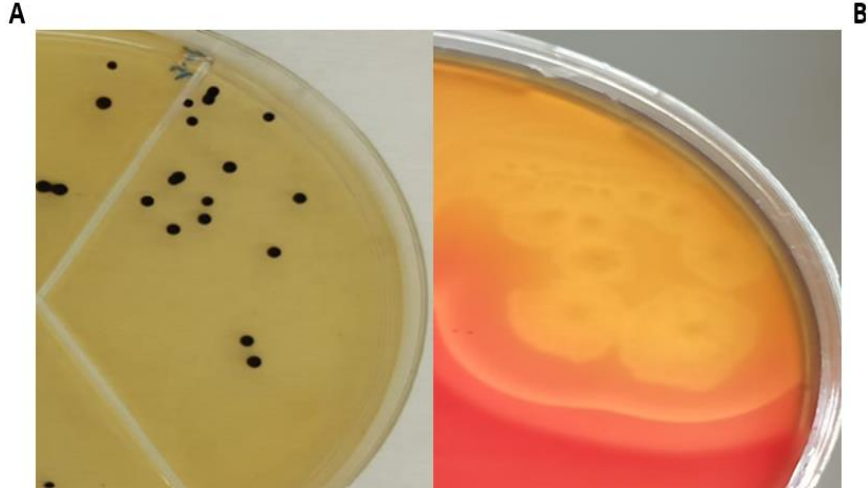
NE, etlik piliçlerde 2-6 haftalık yaşta yaygın olarak görülmektedir. Hastalık, 12-16 haftalık kafeste yetiştirilen yarkalar yanı sıra 3-6 aylık yumurtacı piliçleri de etkilemektedir (Cooper et al., 2013; To et al., 2017). Sağlıklı bir kanatlının dışkıında *C. perfringens* yaklaşık 10^2 - 10^4 CFU/g iken, hastalık durumunda 10^7 - 10^9 CFU/g'a yükselmektedir (Calik et al., 2019). NE, broylerlerde klinik veya subklinik biçimde ortaya çıkar (Wu et al., 2010). Şiddetli klinik formlarda sürüde ölüm oranındaki artış tek ve ilk bulgu olabilirken, tüylerin kabarması, depresyon, ishal, bir araya toplanma, iştahsızlık, sternal yatma semptomları da meydana gelmektedir (To et al., 2017). Patolojik olarak, klinik formlarda ince bağırsakta nekrotik odaklar gözlenir ve en şiddetli vakalarda mukozanın yaygın nekrozu ortaya çıkar (Van Immerseel et al., 2009). NE'nin kanatlı üretimi üzerinde en büyük ekonomik etkisi subklinik formda gözlenir. Bu form ince bağırsak mukozasında meydana gelen kronik hasar nedeniyle yem alımının azalması ile yem-verim tüketim dönüşüm oranının artmasıyla düşük

performans ve kilo kaybıyla kendini gösterir (Shojadoost et al., 2012; Van Immerseel et al., 2009).

Ayırıcı tanıda Nekrotik enterit, *Eimeria brunetti*'nin neden olduğu lezyonlardan ve ülseratif enteritten ayırt edilmelidir. Komplike olmayan olgularda, koksidiyoz nadiren nekrotik enterit ile ortaya çıkar. *Clostridium colinum*'a bağlı ülseratif enterit, genellikle ince bağırsağın (ileum) distal kısmından sekuma kadar fokal lezyonlar oluşturur ve hemen hemen her zaman hepatik nekroza yol açar (Porter, 1998).

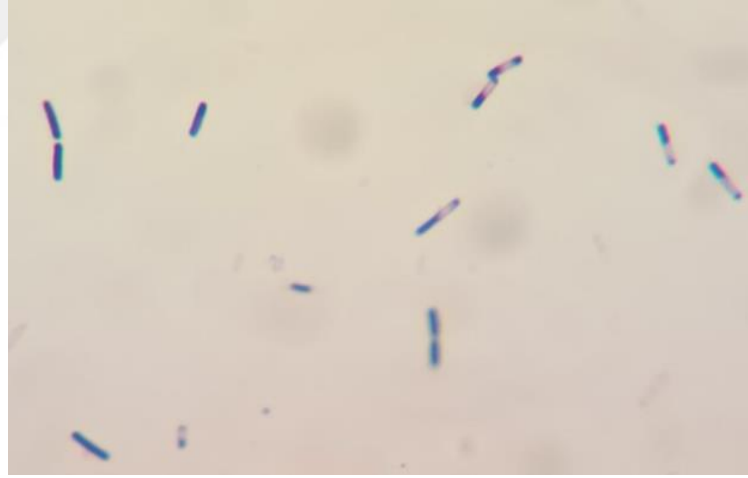
2.8.2. Laboratuvar Teşhisi

C. perfringens'in laboratuvar tanısında metabolik özelliklere dayalı biyokimyasal testler, toksin-antijen tabanlı serolojik testler ve nükleik asit bazlı moleküler testler kullanılmaktadır. İzolasyon zamanı olsa da bakterinin tanımlanması ve çeşitli aktivitelerinin belirlenmesi için altın standart olarak kabul edilen kültür yöntemi yaygın kullanılmaya devam etmektedir (Kiu and Hall, 2018). *C. perfringens*'in kültür yöntemiyle üretimi için önce zenginleştirme işlemi yapılmaktadır. Bu amaçla, thioglycollate buyyon, Cooked Meat Medium (CMM) besi yeri, Brain Heart Infusion (BHI) buyyon, Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) agar ve *Perfringens* agar kullanılmaktadır (Kiu and Hall, 2018; Mwangi et al., 2019). İlk aşamada her bir örnek Brain Heart Infusion (BHI) buyyon içerisine ekilerek üzerlerine parafin kaplanmakta ve Anaerocult A kitleri ile 37°C'de 20-24 saat anaerobik atmosferde inkübasyona bırakılmaktadır. İnkübasyon sonrası üreyen kültürlerden, D-sikloserin ve yumurta sarılı Triptoz Sülfite Sikloserin (TSC) agar üzerine ekimler yapılır ve üzeri ikinci bir TSC agar (yumurta sarısı ilave edilmemiş) ile kaplanarak anaerobik koşullar altında 37°C'de 20-24 saat inkübe edilir. TSC agar üzerinde sülfidlerin indirgenmesi sonucunda tipik siyah koloniler gözlenir. Bu kolonilerden %5'lik koyun kanlı agara ekimler yapılarak aynı şartlarda inkübasyona bırakılır ve tipik çift zonlu hemolitik koloniler izlenir (Şekil 2.3) (Mwangi et al., 2019).



Şekil 2.3. *C. perfringens*'in besi yerinde makroskobik görüntüsü (Tez çalışmasından)
 A: TSC agarda siyah koloniler
 B: % 5'lik koyun kanlı agardaki çift zonlu hemoliz görüntüsü

Şüpheli kolonilerden Gram boyama yapılarak, boyama sonucunda vejetatif formda; Gram pozitif, küt uçlu, düz kenarlı çubuk (basil) şeklinde, sporlu formda ise basilde santral veya subterminal spor lokalizasyonu izlenir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Gram yöntemi ile boyanmış *C. perfringens* (Tez çalışmasından)

Bakteri hareketsiz, indol ve katalaz negatif olup izolatların çoğu laktoz, glikoz, maltozu fermente jelatini hidrolize eder ve nitrata indirger (Hafez, 2011). Ancak biyokimyasal testler farklı *C. perfringens* türlerini ayırt etmede yetersizdir. Klasik tekniklerle karşılaştırıldığında PZR, bakterinin identifikasyonunda daha hızlı, daha güvenilir sonuç verir. Cins ve tür düzeyinde tanımlama için 16S rRNA ve alfa toksin tespitine dayalı PZR testi, MALDI-TOF, real-time PZR yöntemleri kullanılır (Kiu and Hall, 2018). Bir çalışmada, kültür yöntemi ile real time PZR arasında yüksek düzeyde korelasyon belirlenmiş ve real time PZR'nin daha doğru ve kesin sonuç

verdiği bildirilmiştir (Wu et al., 2011). *C. perfringens*'in tiplendirmesi, toksin ve patogeneizde rol oynayan virülens faktörlerini kodlayan genlere dayalı tanımlamaları PZR uygulamaları ile yapılmaktadır (Baums et al., 2004). Serolojik testlerle hem toksin tespiti hem de anti-alfa, anti beta, anti-epsilon ve anti-NetB gibi antikor tespitleri yapılabilmektedir (Cooper et al., 2013; Lee et al., 2011). Sağlıklı ve NE'li tavukların *C. perfringens* izolatları arasındaki genomik varyasyonun araştırılmasında, patojen ve apatojen suşların virülens özelliklerinin (*cpa*, *netB*, *tpeL*, antibiyotik direnç genleri, housekeeping genler gibi) karakterizasyonunda; PZR testlerine ilave PFGE, MLST, MLVA, fAFLP ve tüm genom sekans analizi gibi ileri moleküler yöntemler kullanılmaktadır (Lacey et al., 2016; Kiu and Hall, 2018).

2.9. Antimikrobiyal Maddeler

2.9.1. Antimikrobiyal Maddeler ve Etki Mekanizmaları

Antibiyotikler, kümes hayvanlarında terapötik, profilaktik ve subterapötik (büyümeyi teşvik etme) amaçlar için kullanılır (Mund et al., 2017). Bu antimikrobiyal ajanlar, enfeksiyonların yayılımından sorumlu mikroorganizmalarda DNA replikasyonunu, Ribo-nükleik asit (RNA) ve protein sentezini, hücre bölünmesini, farklılaşmasını, gelişimini, folik asit metabolizmasını, hücre zarı ve hücre duvarı sentezini engeller (Kohanski et. al., 2010). Gelişmekte olan ülkelerde antibiyotik kullanımı çok daha yaygındır. Kanatlı yemlerinde tedavi (terapötik) için kullanılan başlıca antibiyotikler aminoglikozitler (gentamisin, neomisin, spektinomisin ve streptomisin), β -laktamlar (penisilin ve amoksisilin), sülfonamidler ve tetrasiklinlerdir. Kümes hayvanlarında profilaktik ve subterapötik amaçla kullanılan antibiyotikler arasında glikolipidler (bambermisin), polipeptitler (basitrasin), iyonoforlar (salinomisin), streptogramin (virginiamisin) ve ortosomisin (avilamisin) bulunur (Mak et al., 2022). Kümes hayvanlarında *C. perfringens* kaynaklı enfeksiyonların azaltılmasında ve önlenmesinde en sık kullanılan antibiyotikler tetrasiklin, gentamisin, neomisin, streptomisin, spektinomisin, tilozin, eritromisin, virginiamisin, seftiofur, basitrasin, linkomisin, penisilin, trimethoprim-sulfadiazine, florokinolonlar ve/veya kinolon bileşikleri ve antikoksidialyalarasındır (Landoni and Albarellos, 2015; Mund et al., 2017). Ayrıca Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 2020 yılına kıyasla 2021'de tavuklarda kullanılan antibiyotik sınıf ve yüzdeliklerine göre, % 11 aminoglikozid, % 10 tetrasiklin, % 7 makrolid, %6 linkozamid satışının arttığını bildirmiştir (FDA, 2022). Çalışmada da kullanılan

antimikrobiyal ajanlar, türevleri, etki şekilleri ve etki mekanizması Tablo 2.4.'de verilmiştir.

Tablo 2.4. Antimikrobiyal ajanlar ve etki mekanizması (Mund et al., 2017)

Antibiyotikler (Türevleri)	Etki şekli / Etki mekanizması
Kinolonlar/Florokinolonlar -Enrofloksasin -Norfloksasin	Bakterisidal / bakteriyel DNA replikasyon inhibitörü *Topoizomeraaz inhibitörü
Beta Laktamlar -Penisilin G -Ampisilin -Amoksiklavulanik asit -seftiofur	Bakterisidal / bakteriyel hücre duvarı sentezini önler, hücre duvarı bütünlüğünü bozar, *transpeptidaz inhibitörü
Poliipeptidler -Basitrasin	Bakterisidal / hücre duvarı sentezi inhibitörü
Aminoglikozidler -Streptomisin -Gentamisin - Neomisin	Bakterisidal/ protein sentezi inhibitörü *30S ribozomal alt birim ile bağlanma, genetik kodun yanlış okunması ve ardından bakteriyel translasyonun kesintiye uğraması
Tetrasiklinler -Tetrasiklin - Doksisisiklin	Bakteriyostatik / protein sentezi inhibitörü *Bakterilerin 30S ribozomal alt birimini inhibe eder
Linkozamidler -Linkomisin	Bakteriyostatik / protein sentezi inhibitörü *Bakterilerin 50S ribozomal alt birimini inhibe eder
Makrolidler -Eritromisin	Bakteriyostatik / protein sentezi inhibitörü *Bakterilerin 50S ribozomal alt birimini inhibe eder
fenikoller -Kloramfenikol	Bakteriyostatik / protein sentezi inhibitörü *Bakterilerin 50S ribozomal alt birimini inhibe eder
Streptogramin -virginiamisin	Bakteriyostatik / protein sentezi inhibitörü *Bakterilerin 50S ribozomal alt birimini inhibe eder

Kinolon grubu ilaçlar (enrofloksasin, norfloksasin), bakterisid etkili olup replikasyon, rekombinasyon ve transkripsiyon aşamalarında önemli olan DNA giraz (topoizomeraaz II) enzimini inhibe ederek DNA sentezini engeller. Bakteriyel DNA giraz enzimi, *gyrA* geni tarafından kodlanan A ve *gyrB* geni tarafından kodlanan B olmak üzere iki adettir. Antimikrobiyal ajanlar, özellikle A alt bölümüne bağlanarak bakterilerin ölümüne neden olur (Drlica et al., 2008).

Tüm beta-laktam antibiyotikler; bakterilerde, hücre duvarı sentezinden sorumlu penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bağlanarak yani peptidaz (transpeptidaz,

karboksipeptidaz ve endopeptidaz) enzimlerini inhibe ederek etki gösterirler. Ancak beta-laktam antibiyotikler bakterilerin hücre duvarında bulunan peptidoglikan komponentlerine penetre olarak etkili olurlar. Bu aşamada peptidoglikan zincirin uzaması transpeptidasyon aşamasında durdurulur ve böylece hücre duvarı sentezi engellenir. Beta laktam antibiyotikler; penisilinler (penisilin G, ampisilin), sefalosporinler (seftiofur), beta laktam/beta laktamaz inhibitörleri (amoksisilin klavulonik asit) diğer beta laktamlar (karbapenemler, monobaktamlar) şeklinde sınıflandırılırlar (Lakshmi et al., 2014). Hücre duvarı sentezi inhibitörlerinden bir diğeri de polipeptid grubu antibiyotiklerden biri olan basitrasindir. Basitrasın, *Bacillus subtilis* ve *B. licheniformis* tarafından üretilen ve lipit pirofosfatın fosforilasyonunu engelleyerek bakteri hücre duvarı sentezini bozan bakterisidal etkili bir antibiyotiktir (Butaye et al., 2003).

Aminoglikozitler, tetrasiklinler, kloramfenikoller, streptogramin, makrolid grubu antibiyotikler protein sentezini inhibe eden antimikrobiyal ajanlardır. Bu ajanlar, Ribozomun 50S ve 30S alt birimine bağlanan antimikrobiyaller olarak da sınıflandırılırlar (Nissen et al., 2000). 50S inhibitörleri bakteriyostatik etkili olup makrolidler (eritromisin), fenikoller (kloramfenikol), streptogramin (virginiamisin) ve linkozamidler (linkomisin)'den oluşmaktadır (Butaye et al., 2003; Goetting et al., 2011). Bu ajanlar, 50S ribozomal alt üniteye bağlanarak peptidil transferaz etkisini dolayısıyla da protein translasyonunun başlatılmasını veya peptidil tRNA'ların translokasyonunu engelleyerek protein sentezini inhibe ederler. 30S ribozomal alt üniteye etkili olan aminoglikozidler (gentamisin, neomisin, streptomisin) bakterisidal etkili olup, 30S ribozoma geri dönüşümsüz bağlanarak protein sentezi sırasında ya mRNA'nın translasyonu engeller ya da mRNA'nın yanlış okunmasına neden olarak etki gösterirler (Vakulenko and Mobashery, 2003), Tetrasiklinler (tetrasiklin, doksisisiklin) ise bakteriyostatik etkili olup tRNA ile mRNA arasındaki kodon antikodon etkileşimini bozarak aminoasil tRNA'ların ribozoma bağlanmasını engelleyerek protein sentezini önlerler (Zakeri and Wright, 2008).

2.9.2. Antimikrobiyal Maddelere İn vitro Duyarlılık Yöntemleri

Anaerobik bakterilerin, antimikrobiyal duyarlılık testleri, besiyeri, inokulum yoğunluğu, besiyerine katılan supplement, atmosfer, sıcaklık ve inkübasyon süresi dahil olmak üzere kullanılan yöntem ve çalışılan bakteri cinsine bağlı olarak değişmektedir (Nagy et al., 2018). Anaerobik bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık

tespitinde, agar dilüsyon, broth mikrodilüsyon, gradient test ve disk difüzyon yöntemleri kullanılmaktadır (Wexler, 1991). Yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları Tablo 2.5'de sunulmuştur.

Tablo 2.5. Yaygın kullanılan antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları (Nagy et al., 2018).

Yöntem	Artıları	Eksileri
Agar dilüsyon	*Referans standart yöntem *çok sayıda izolat aynı anda incelenebilir	* Yoğun emek *Zaman alıcı *Sınırlı konstrasyonda antimikrobiyal ajan incelenebilir *Rutin testler amacıyla çoğu laboratuvar için pratik değildir
Broth mikrodilüsyon	*Ticari formları mevcuttur. *Bir mikropleytde çok sayıda antibiyotik araştırılabilir. *nispeten ucuz.	*Ticari olarak sabit antibiyotikler ve dilüsyonları mevcut *Ticari ürünlerinde sınırlı sayıda izolatla çalışma *sadece <i>Bacteroides fragilis</i> grubu için uygun *Orta yoğunlukta emek
Gradient test	*Kolay, basit antibiyotiklere karşı heterodirenci tespit edebilir	*Pahalı *Performansla ilgili endişeler
Disk difüzyon	*Ucuz, kolay, hızlı yorumlanabilir *EUCAST, belirli antimikrobiyal ajanlarda beş önemli anaerobik türün (<i>Bacteroides spp</i>, <i>Prevotella spp.</i>, <i>Fusobacterium necrophorum</i>, <i>Clostridium perfringens</i> ve <i>Cutibacterium acnes</i>) ADT'si için bir disk difüzyon yöntemi geliştirmiştir.	*Doğrulanmış bir yöntem değil * MİK tespit edilemez *hızlı gelişen anaerobik türler çalışılabilir *EUCAST da belirtildiği üzere sınırlı sayıda antimikrobiyallere karşı geliştirmiştir.

C. perfringens'in, ADT sonuçlarının değerlendirilmesine ilişkin sınır değer (breakpoint) bilgileri çok kısıtlı olduğundan değerlendirme minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) veya disk difüzyon bölge çaplarına göre epidemiyolojik eşik değerler (ECOFF) oluşturularak belirlenebilmektedir (CLSI, 2018; EUCAST, 2023; Kowalska-Krochmal and Dudek-Wicher, 2021). MİK, in vitro koşullar altında inkübasyon süresi sonunda bir test süşunun gözle görülebilir üremesini engelleyen antibakteriyel maddenin en düşük konsantrasyonu olarak ifade edilir (CLSI, 2007). MİK'leri belirlemede agar dilüsyon testi bütün anaeroplara için en güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesine karşın; uygulanması zor, zahmetli, uzun zaman gerektiren ve iş gücü fazla olan bir yöntemdir. Broth mikrodilüsyon yöntemi ise

yalnızca *Bacteriodes fragilis* ve *Parabacteriodes spp.* için önerilmektedir (CLSI, 2007). Bununla birlikte gradyan şeritler değişen kalitede olabileceğinden dolayı güvenilir olmayan sonuçlar elde edilebileceği üzerinde durulmaktadır. *C. pefringens*'in disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesinde ise Amerika Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI), Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (EUCAST) ve diğer ulusal antimikrobiyal test komitelerinin yönergelerinde sınır değer verileri yetersiz olduğu için *S. aureus* ve *E. coli* referans alınarak değerlendirme yapılmaktadır (Anju et al., 2021, Tresha et al., 2021, Arif et al., 2022). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda, penisilin standart antibiyotik olarak kullanılmış ve her bir antibiyotiğin inhibisyon çapı, penisilinin inhibisyon zonu ile karşılaştırarak inhibisyon yüzdeleri belirlenmiştir (Haider et al., 2022; Mohiuddin et al., 2020). İnhibisyon yüzdeleri %40 ve altı dirençli, üzeri duyarlı olarak tanımlanarak, %40-%60, %60-%70 ve %70'ini sırasıyla orta derecede duyarlı, iyi duyarlı ve önemli derecede duyarlı olarak kategorize edilmiştir. EUCAST, *C. perfringens*'in de içinde olduğu bazı anaeroplara için sınırlı sayıda (Benzilpenisilin, Piperasillin-tazobaktam, Meropenem, Vankomisin, Klindamisin ve Metronidazol) antibiyotiklerle disk difüzyon yöntemini optimize etmişlerdir (EUCAST, 2023).

2.10. Antibiyotik Büyütme Faktörleri

1953'lü yıllarda terapötik amaçla kullanılan antibiyotiklerin bazılarının büyümeyi ve verimliliği artırdığı keşfedilmiştir. O zamandan sonra tüm antibiyotiklerin kullanımına izin verilmiş ve birçok antibiyotik çiftlik hayvanlarında büyüme destekleyicileri olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, antibiyotiklerin terapötik olarak ve büyümeyi desteklemek için kullanılmasının, insan ve hayvan kaynaklı bakterilerde, özellikle Gram negatif bakterilerde (*Salmonella spp.* ve *Escherichia coli*) artan bir direnç sorununa yol açabileceğine dair tartışmalar başlamış ve bu konu ile ilgili Avrupa'da "Swann raporu" yayınlanmıştır (Butaye et al., 2003). Birleşik Krallık'ta, Swann Raporu, büyümeyi desteklemek için antibiyotik kullanımının çiftlik hayvanlarının yetiştirilmesinde önemli bir ekonomik fark yaratsa da insanlarda veya hayvanlarda terapötik ajan olarak antibiyotiklerin sınırlandırılması gerektiği öne sürülmüştür.

İsveç, 1986'da iyonofor antibiyotikler hariç büyümeyi teşvik için tüm antibiyotikleri yasaklayan ilk ülke olmuştur (Grave et al., 2006). Hayvanlarda

yalnızca büyümeyi desteklemek için kullanılan bir antibiyotik olan avoparsin, insan hastane preparatı vankomisin ile çapraz direnç ve teikoplanin ile kısmi çapraz direnç gösterdiğinden bu enfeksiyonlar ciddi bir sorun haline gelmiştir (Huycke et al., 1998). Avoparsin, kullanımının glikopeptidlere dirençli enterokokların gelişimini sağladığına dair endişelerden dolayı bu preparat 1995 yılında hem Danimarka'da hem de Norveç'te yasaklanmıştır. Aynı yıl Danimarka'da hayvan yemlerinde virginamisin kullanımı yasaklanmıştır (Grave et al., 2006). 1997'de Avrupa Birliği avoparsin, ardasin, eritromisin, vankomisin ve teikoplanin, 1999'da basitrasin, virginamisin, tilosin, spiramisin, olakuindoks, karbodoksun kullanımını yasaklamıştır (Butaye et al., 2003).

1 Ocak 2006 tarihi itibarı ile Avrupa Birliği Komitesi; avilamisin, flavofosfolipol, monensin sodyum, salinomisin sodyum da dahil antibiyotik büyütme faktörlerini tümüyle yasaklamıştır (Castanon, 2007). Ülkemizde de 21 Ocak 2006 tarihinden itibaren antibiyotik büyütme faktörlerinin tümünün yem takviyesi olarak kullanımı yasaklanmıştır (Tuncer, 2007).

Yemlerde subterapotik antibiyotik kullanımının yasaklanmasından sonra, birçok Avrupa Birliği ülkesi ve ABD NE, gangrenöz dermatit, botulizm ve kolanjiyohepatit gibi diğer hastalıkların insidansının arttığını bildirmiştir (Shane, 2004; Van Immerseel et al., 2004).

2.11. Korunma ve Kontrol

Kümes hayvanları çiftliklerinde, başta *C. perfringens* olmak üzere diğer patojen kaynaklı hastalıkların önlenmesi veya kontrol altına alınması, biyogüvenlik, sanitasyon, sürü yönetimi, antimikrobiyal kullanım ve predispozan faktörlerin önlenmesi gibi temel prensipleri içermektedir. Çiftliklerde günümüzde, ortamlardaki mikrobiyal yükü ve patojen seviyelerini azaltmak için antikoksidiyatlar, antimikrobiyaller, temizlik, dezenfeksiyon, altlık ve havalandırma uygulamaları yapılmaktadır (Abd El-Hack et al., 2021).

Uzun yıllar büyüme, performans ve verimliliği artırmak ve hayvanları patojenik enterik mikroorganizmaların olumsuz etkilerinden korumak için çiftlik hayvanları ve kanatlı hayvanların yemlerine antibiyotikler katılmıştır (Dahiya et al., 2006; Dibner and Richards, 2005). Hayvan yemlerinde büyüme faktörü olarak antibiyotiklerin sürekli, düzensiz ve aşırı kullanımı antibiyotiklere direnç sorununu

yaratmıştır (Benno et al., 1988; Tansuphasiri et al., 2005; Watkins et al., 1997). Bakterilerde artan antimikrobiyal direncin (AMR) önlenmesi için, ülkemizde ve tüm Avrupa ülkelerinde 2006 yılından itibaren antibiyotiklerin yem takviyesi olarak kullanımı yasaklanmıştır (Castanon, 2007; Tuncer, 2007). Ancak antibiyotik Büyütme Faktörlerinin (ABF) yasaklanmasından sonra etlik piliçlerde enterik hastalıklar yeniden ortaya çıkmış ve antimikrobiyal ajanlar piliçlerde tedavi için yoğun bir şekilde kullanılmaya devam etmiştir. Hem beşeri hem de veteriner hekimlikte antibiyotiklerin sürekli ve yaygın kullanımı, *C. perfringens* suşları için direnç riskini beraberinde getirmiştir (Akhi et al., 2015; Arif et al., 2022; Li et al., 2020; Yadav et al., 2017).

Yemlerde ABF'lerin kullanımının kısıtlanmasından sonra NE'yi kontrol amacıyla antibiyotik olmayan katkı maddelerine (probiyotikler, prebiyotikler, fitobiyotikler, organik asitler, immunglobulinler, bakteriyofajlar) olan ilgi artmıştır (Alizadeh et al., 2021; Fathima et al., 2022; Grandstad et al., 2020).

Probiyotikler; patojenik ve toksijenik olmayan, mide asidi ve safra tuzlarına dirençli, patojenik bakteriyel kolonizasyonu engelleyen, antibiyotiklere duyarlı faydalı bakterilerdir (Fatima et al., 2022). Probiyotikler; spor oluşturmeyen bakteriler (*Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*) ve spor formu (*Bacillus spp.*) bakterilerden oluşmaktadır (Granstad et al., 2020). Kümes hayvanlarında probiyotik takviyesinin enterik patojenlerin kolonizasyonunu azalttığı, *C. perfringens*' e karşı IgA seviyesini artırdığı ve sekumda *C. perfringens* sayısını azalttığı rapor edilmiştir (Shanmugasundaram et al., 2020).

Prebiyotikler, konakçı sağlığına faydalı bağırsak mikroorganizmalarının çoğalmasını ve/veya aktivitesini sağlayan fermente edilmiş yem bileşenleridir (Fathima et al. 2022; Granstad et al., 2020). Bir yem maddesinin prebiyotik olarak kabul edilebilmesi için memeli enzimleri ve mide asitleri tarafından hidrolize ve üst gastrointestinal kanalda absorpsiyona dirençli olması, bağırsak mikrobiyotası tarafından fermente edilebilir olması, bağırsak mikrobiyotasının uyarımını sağlayıp yararlı olması, bağırsak mukozal bağışıklık sisteminin uyarılması, patojen kolonizasyonunun engellenmesi gerekir (Gadde et al., 2017). Kanatlı endüstrisinde en sık kullanılan prebiyotiklerden bazıları mannoooligosakkaritler (MOS), frukto-oligosakkaritler (FOS), inülin ve arabinoksilanlardır. Diyetle FOS ve MOS takviyesinin yararlı bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliğini arttırdığı ve piliçlerin

ileumunda *E. coli* ve *C. perfringens*'i azalttığı bildirilmiştir (Kim et al., 2011). Fitobiyotikler, bitki kaynaklı biyoaktif bileşikler olup uçucu yağlar, oleoresinler, tanenler, saponinler flavonoidler gibi bitki ve baharatlardır (Granstad et al., 2020). Fitobiyotik takviyesi bağırsak lezyonlarını, oosit dökülmesini, canlı ağırlık kaybını giderdiği ve NE durumunda proinflatuar sitokinlerin salgılanmasını azalttığı bildirilmiştir (Lee et al., 2018).

Kümes hayvanı yemlerinde antibiyotik büyüme destekleyicilerine alternatif olarak kısa zincirli yağ asitleri, orta zincirli yağ asitleri ve laktik asit, sitrik asit gibi organik asitler koruyucu olarak kullanılmaktadır. Bu maddelerin yemlerin sindirilebilirliği, NE'de mukozal atrofi ve enterosit nekrozunu azaltması, civcivlerde patojenik bakterilerin çoğalmasını önlemesi ve bağırsak mikrobiyotasına etkileri yönünde olumlu katkıları belirlenmiştir (Pham et al., 2020).

Tavuk yumurta sarısından elde edilen antikorların ve hiperimmünize edilmiş tavuk yumurta sarısı tozu *C. perfringens*'in kolonizasyonunu azalttığı belirtilmiş ve anti-clostridial IgY'nin ağız yoluyla uygulamasının, enfekte kanatlılarda performans artışına katkılar sağladığı bildirilmiştir (Abadeen et al., 2021).

Antibiyotiklere potansiyel bir alternatif olarak bakteriyofaj etkisi de değerlendirilmiştir. Tavuklarda polivalan bakteriyofaj kokteyli (INT-401) uygulamasının, NE'de kilo alımını ve yemden yararlanma oranını artırdığı ve ölüm oranını %92 oranında azalttığı gösterilmiştir (Miller et al., 2010). Benzer şekilde, *C. perfringens* podovirüs faj uygulamasının, enfekte tavuklarda *C. perfringens*'in genel patolojisini, mortalitesini ve sekal yükünü azalttığı bildirilmiştir (Hosny et al., 2021).

Korunma amacıyla diğer bir seçenek olarak aşılama, insanlarda ve çiftlik hayvanlarında bakteriyel ve viral hastalıkların yaygınlığını önlenmesinde etkili bir stratejidir. *C. perfringens*'in neden olduğu enfeksiyonlarından korunma virülens faktörlerine yönelik önlemlere bağlıdır. Bu nedenle en uygun yaklaşım, ya multivalent aşı kullanımı ya da aşı ajanı olarak virulent etkene ait protein antijenlerin kullanımı ile mümkün olmaktadır (Zeng et al., 2011). Broylerlerde NE'ye karşı aşı geliştirme çalışmaları azdır. Etçi tavuklarda NE salgınları 2-3 haftalık dönemde başlayabildiğinden, hastalığın önlenmesi için daha erken dönemde aşılama gereklidir. İki haftalık damızlık tavuklar rNetB, toksoid veya rNetB ve toksoid kombinasyonu ile aşılandığında yavruların bağışık kılındığı hatta ikinci challenge'da en yüksek koruma elde edildiği bildirilmiştir (Keyburn et al., 2013a). Thompson vd.

(2006), yaptıkları bir çalışmada, etlik civcivlerin, *C.perfringens*'in hem virölant hem de atenüe virulant suşlarıyla yaptıkları bir aşı uygulamasında nekrotik enterite karşı koruma sağlandığını ancak avirulant suşlarla yapılan aşılama NE'ye karşı korunma sağlanamadığını bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada, α toksin içermeyen suşlarla yapılan aşılama ile koruyucu bağışıklık sağlandığı dolayısıyla α toksin dışında diğer faktörlerin de koruyuculukta rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Aşı antijeni olarak rekombinant NetB'nin (rNetB) kullanıldığı başka bir çalışmada, broylerlerin orta şiddetli NE'ye karşı korunduğu şiddetli olgularda ise korunma sağlanamadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, bakterin, rNetB ilaveli toksoid aşısı ve rNetB içermeyen toksiod aşısı ile aşılanmanın broylerleri orta ve şiddetli NE tehdidine karşı önemli ölçüde koruduğu gösterilmiştir (Keyburn et al., 2013b). Kanatlılarda NE'ye karşı aşısı olarak ayrıca alfa, NetB ve fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz (Fba) eksprese eden *Salmonella* vektör aşıları geliştirilmiştir (Wilde et al., 2019). NetB, alfa toksin ve metalopeptidaz içeren subunit-kimerik aşının broylerlerde kısmi koruma sağladığı da bildirilmiştir (Katalani et al., 2020).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmada, 2021-2022 yılları arasında Samsun ilinde etlik piliç yetiştiriciliği yapılan 5 farklı işletmeden her biri ayrı piliçten olmak üzere 223 adet örnek toplandı. Çalışmanın materyalini, 42-45 günlük broylerlerden kesim sırasında alınan 83 adet sekum örneği ile 21-28 günlük broylerlerden alınan 140 adet kloakal svap örneği oluşturdu. Materyal içerisinde, 29 ishal olgusu mevcut olup 10'u kloakal svaplardan, 19'u sekum örneğinden ibarettir. Kloakal dışkı örnekleri Amies svaplar, sekum örnekleri ise steril kaplar içerisinde soğuk zincir altında laboratuvara getirildi.

3.2. *C. perfringens* İzolasyonu

C. perfringens izolasyon ve identifikasyonu Mwangi vd. (2019)'nın uyguladıkları yöntem modifiye edilerek gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan izolatlar %40 gliserinli Brain Heart Infusion (BHI) buyyona'da muhafaza edildi.

3.3. DNA Ekstraksiyonu

Şüpheli her bir izolatın kanlı agardaki kolonisinden DNA ekstraksiyonu kaynatma tekniğine göre yapıldı. Bu amaçla, her bir izolattan bir koloni alınarak 250 µl steril distile su ile homojenize edildi. 10.000 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant (üst sıvı) atıldı ve peletin üzerine 250 µl steril distile su eklendi. 100°C'de 10 dakika su banyosunda kaynatıldıktan sonra 10.000 g'de 10 dakika santrifüje edildi. Süpernatantların, DNA konsantrasyonları Nano-Drop spektrofotometre ile belirlendi ve genomik DNA olarak kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

3.4. Bakteriyel Referans Suşlar

Antibiyogram ve PZR kontrollerinde kullanılmak amacıyla *C. perfringens* referans ATCC 13124 suşu Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni AD öğretim üyesi Prof. Dr. Fatma Seda BİLİR ORMANCI tarafından, *C. perfringens* tip A ve tip C DNA'ları Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitü'sünden temin edildi.

3.5. Suşların Moleküler İdentifikasyonu

Fenotipik izolasyonu teyit etmek amacıyla *Clostridium* spp. için 16S rRNA ve *C. perfringens* için de *cpa* genine dayalı multipleks PZR işlemleri gerçekleştirildi. Bu

amaçla, Tablo 3.1’de belirtilen araştırmacıların belirttikleri protokoller modifiye edildi ve tüm izolatlar cins ve tür düzeyinde multipleks PZR ile incelendi. Söz konusu genlerin primer dizileri Tablo 3.1’de sunulmaktadır.

Tablo 3.1. 16S rRNA ve *cpa* genlerinin çoğaltılması için kullanılan primerlere ait diziler

Hedef Gen	Fragment uzunluğu (bp)	Baz Dizisi (5’-3’)	Kaynak
16S rRNA	722	F-AAAGGAAGATTAATACCGCATAA R-ATCTTGCGACCGTACTCCCC	Amit-Romach et al., 2004
<i>cpa</i>	900	F-AGTCTACGCTTGGGATGGAA R-TTTCCTGGGTGTCCATTTC	Baums et al., 2004

F: Forward R: Reverse

Çalışmada, her bir örnek için kullanılan PZR karışımı Tablo 3.2’de sunulduğu şekilde hazırlandı.

Tablo 3.2. Multipleks PZR karışımında yer alan tamponlar ve konsantrasyonları

PZR Karışımı	25 µl reaksiyon	Final Konsantrasyon
10X Standart Taq Tamponu	2.5	1X
25 mM MgCl ₂	1,5	1,5 mM
10 mM dNTPs (deoksinükleotidtrifosfat karışımı)	0.5	200 µM=0.2mM
20 pmol <i>cpa</i> Forward Primer	0.7	10 pmol
20 pmol <i>cpa</i> Reverse Primer	0.7	10 pmol
20 pmol 16S rRNA Forward Primer	0.5	10 pmol
20 pmol 16S rRNA Reverse Primer	0.5	10 pmol
Templeyt DNA	3-4	<1µg (10 pg-1 µg)
Taq DNA Polimeraz (5 ünite/ µl)	0.125	1.25 unite/50 µl PZR
Distile su	25 µl’ye tamamlanır	

Hazırlanan PZR karışımı, termal cycler (Biometra T personal) cihazına yerleştirildi ve Tablo 3.3’de belirtilen koşullarda çoğaltma işlemi yapıldı.

Tablo 3.3. Clostridium cins ve tür tespiti için PZR koşulları

Hedef Gen	Denatürasyon	Primerlerin bağlanması	Primer uzaması
-16S rRNA - cpa	95°C 1 dakika	57 C° 1 dakika	72 C° 1.20 dakika 35 döngü

3.6. *C. perfringens* Suşlarının Toksin Tip ve Virülens Genlerinin Tespiti

C. perfringens suşlarının tamamında *cpa*, *cpb* ve *netB* genleri Tablo 3.4’de belirtilen primerler hedef alınarak toksin tiplendirmesi yapıldı. Elde edilen *C. perfringens* suşlarının *cpb2*, *cpe*, *tpeL* ve *cnaA* virülens genleri Tablo 3.4’de belirtilen primer dizileri kullanılarak araştırıldı.

Tablo 3.4. *C. perfringens* PZR amplifikasyon ürünlerinin; büyüklükleri, hedef toksin genleri, oligonükleotid primer dizileri

Hedef Gen	Fragment uzunluğu (bp)	Baz Dizisi (5’-3’)	Kaynak
<i>cpa</i>	900	F-AGTCTACGCTTGGGATGGAA R-TTTCCTGGGTTGTCCATTTC	Baums et al., 2004
<i>cpb</i>	611	F-TCCTTTCTTGAGGGAGGATAAA R-TGAACCTCCTATTTTGTATCCCA	Baums et al., 2004
<i>netB</i>	383	F-GCTGGTGCTGGAATAAATG R-TCGCCATTGAGTAGTTTCCC	Keyburn et al., 2008
<i>cpe</i>	233	F-GGAGATGGTTGGATATTAGG R-GGACCAGCAGTTGTAGATA	Meer and Songer, 1997
<i>cpb2</i>	567	F-AGATTTTAAATATGATCCTAACC R-CAATACCCTTCACCAAATACTC	Meer ve Songer, 1997
<i>tpeL</i>	466	F-ATATAGAGTCAAGCAGTGGAG R-GGAATACCACTTGATATACCTG	Park et al., 2015
<i>cnaA</i>	220	F- GGTGGATGGGCAACATTTAC R-CCTTGCTTGGATTACACAGT	Wade et al., 2015

F: Forward, R: Reverse

Çalışmada, her bir örnek için primer final konsantrasyonu 10 pmol olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı.

Hazırlanan PZR karışımı termal cycler (Biometra T personal) cihazına yerleştirildi ve Tablo 3.5’de belirtilen koşullarda çoğaltma işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3.5. *C. perfringens* virölens genlerin tespitinde kullanılan PZR koşulları

Hedef Gen	Denatürasyon	Primerlerin bağlanması	Primer uzaması
<i>cpa</i> <i>cpb</i>	95°C 1 dakika	57 C° 1 dakika	72 C° 1.20 dakika 35 döngü
<i>cpe</i> <i>cpb2</i>	94°C 2 dakika	55 C° 1 dakika	72 C° 1 dakika 35 döngü
<i>tpeL</i>	95°C 30 saniye	60 C° 30 saniye	72 C° 30 saniye 30 döngü
<i>netB</i>	94°C 15 saniye	55 C° 15 saniye	72 C° 30 saniye 35 döngü
<i>cnaA</i>	95°C 20 saniye	50 C° 20 saniye	75 C° 40 saniye 35 döngü

Agaroz Jel ile PZR Ürünlerinin Analizi:

PZR’de çoğaltılan gen ürünlerinin belirlenmesi amacıyla agaroz jelde yürütme işlemi yapıldı. Buna göre, 1X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) tamponuna konsantrasyonu %1.5 olacak şekilde agaroz ilave edildi. Mikrodalga fırında eritildikten sonra oda ısısında bir süre ılıklaşması için beklendi. Sonrasında ethidium bromid (0.5µg/ml) ilave edilerek yatay elektroforez tankına yerleştirildi. PZR ürünlerinin jelde görüntülenmesi için 10 µl amplikona (örneğe) 2 µl boya (6x Loading boya) konularak elektroforez gerçekleştirildi. TBE tamponunda elektrik akımı altında yürütüldükten sonra transilluminator (Vilber Lourmat) cihazında ultraviyole ışığı altında görüntülenen bantlar kontrol ve DNA Ladder ile karşılaştırıldı.

3.7. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

3.7.1. Disk Difüzyon Testi

C. perfringens’in disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesinde CLSI, FDA, EUCAST ve diğer ulusal antimikrobiyal test komitelerinin yönergelerinde veriler yetersiz olduğu için tez çalışması kapsamında identifiye edilen *C. perfringens* suşlarının antibiyotik duyarlılığı Haider vd. (2022)’nin çalışması temel alınarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. Disk difüzyon testi için, gentamisin (10 µg), neomisin (30 µg), streptomisin (10 µg), ampisilin (10 µg), amoksisilin klavulanik asit (20/10 µg), penisilin (10 U), kloramfenikol (30 µg), enrofloksasin (5 µg), norfloksasin (10 µg), seftiofur (30 µg), tetrasiklin (30 µg), doksisisiklin (30 µg), linkomisin (2 µg), eritromisin (15 µg), basitrasin (10 U) ve virginamisin (15 µg) test edildi. Oksijene maruziyeti kısıtlamak

amacıyla inokulumların hazırlanması, ekim ve disklerin yerleştirilmesinde EUCAST'ın önerdiği 15'er dakika kuralı uygulandı ve anaerop ortamda 37 °C'de 24 saat inkübe edildi (EUCAST, 2023). Bu amaçla önce her bir suşun %0.9 steril fizyolojik tuzlu su ile McFarland No. 1'e göre inokulumları hazırlandı. Ardından hazırlanan inokulumdan 0.1 ml alınarak Muller Hinton agara yayma ekim yapıldı.

Sonuçların değerlendirilmesinde, 10 U penisilin standart antibiyotik olarak kullanıldı. Duyarlılık sonuçları, her bir antibiyotiğin inhibisyon çapı, penisilin G'nin inhibisyon çapı ile karşılaştırılarak Haider vd. (2022)'nin bildirdiği formüle göre yüzde inhibisyon oranları oluşturularak yorumlandı.

$$\text{Yüzde İnhibisyon (\%)} = \frac{\text{Antibiyotik inhibisyon çapı}}{\text{standart (penisilin) inhibisyon çapı}} \times 100$$

İnhibisyon yüzdeleri %40 ve altı dirençli, üzeri duyarlı olarak tanımlanarak, %40-%60, %60-%70 ve %70'ini sırasıyla orta derecede duyarlı, iyi derecede duyarlı ve önemli derecede duyarlı olarak kategorize edildi. Testte kalite kontrol suşu olarak, *C. perfringens* ATCC 13124 kullanıldı. Çoklu ilaç direnci (MDR), bir izolatın üç veya daha fazla antibiyotiğe direnci olarak ifade edildi (Magiorakos et al., 2012). Testin değerlendirme aşamasında penisilin'in dirençli olduğu suşlardan (2 adet) dolayı, suşların diğer antimikrobiyal ajanlara duyarlılıklarının değerlendirilememesi, zayıf üreme ve disklerin etrafında net olmayan zonlar tespit edildi. Belirtilen belirsizlik ve olumsuzluklar, çalışmada elde edilen çoklu dirençli suş sayısının fazlalığı, bu suşların duyarlılık profillerinin araştırılması gerektiğini gösterdi.

3.7.2. Agar Dilüsyon Testi

Disk difüzyon sonuçlarına göre penisiline dirençli suşlar başta olmak üzere toplam 22 adet *C. perfringens* suşu antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için agar dilüsyon yöntemi CLSI (M11-A7) talimatlarına göre değerlendirildi (CLSI, 2007).

Bu amaçla, en çok kullanılan ve direnç gelişimi bildirilen Penisilin G (Sigma), Linkomisin (Sigma), Eritromisin (Ruland Chemistry), Enrofloksasin (Zhejiang Guaobang Pharmaceutical), Tetrasiklin (Sigma), Gentamisin (Sigma) ve Ampisillin (Sigma) kullanıldı. Antibiyotiklerin stok çözeltileri test potansiyeli dikkate alınarak Tablo 3.6'da gösterilen çözücüler ve dilüsyon sıvıları kullanılarak hazırlandı ve konsantrasyonları aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı.

Bir antimikrobiyal maddenin test potansiyel değeri, o maddenin saflığı (genellikle HPLC), içerdiği su miktarı (Karl Fischer analizi veya kuru madde kaybı) ve tuz gibi iyon fraksiyonları ile belirlenir.

$$\text{Tartılacak antibiyotik miktarı (mg)} = \frac{\text{Hacim (mL)} \times \text{Konsantrasyon (}\mu\text{g/mL)} \times \text{Antibiyotik inhibisyon çapı}}{\text{Test potansiyeli (}\mu\text{g/mg)}}$$

Tablo 3.6. Çalışmada kullanılan antibiyotikler, çözücüler ile dilüsyon sıvısı

Antibiyotikler	Çözücü	Dilüsyon sıvısı
Penisilin G	Steril su	Steril Su
Linkomisin	Steril su	Steril Su
Eritromisin	%95 etanol	Steril Su
Tetrasiklin	Steril su	Steril Su
Enrofloksasin	0.1 M NaOH	Steril Su
Gentamisin	Steril su	Steril Su
Ampisilin	Fosfat tampon, pH 8.0, 0.1 mol/L	Fosfat tampon, pH 6.0, 0.1 mol/L

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan antimikrobiyal stok çözeltileri membran filtre (Minisart 0.2 µm) ile steril edildi.

Tablo 3.7’ de belirtilen antibiyotikler, CLSI (M11-A7) talimatlarına uygun şekilde, çalışma aralıklarına uygun olarak sulandırılarak MİK tespiti gerçekleştirildi.

Tablo 3.7. Antibiyotiklerin çalışma dilüsyon aralıkları

Antibiyotikler	Dilüsyon aralıkları (µg/ml)
Penisilin	0.03-16
Linkomisin	0.125-128
Eritromisin	0.125-128
Tetrasiklin	0.125-128
Enrofloksasin	0.125 -32
Gentamisin	16-512
Ampisilin	0.06-64

Stok antibiyotik çözeltilerinin 10X hacminde seri dilüsyonları hazırlandı. Brusella agar besi yerine CLSI (M11-A7)’de belirtilen konsantrasyonlarda hemin (5 µg/ml), vitamin K1(1 µg/ml) katıldı ve otoklavlandı. Steril edilen ve yaklaşık 50° C’ye kadar soğutulan besi yerine %5 (1ml) koyun kanı ve 1x (2 ml) antibiyotik ilave edildi ve her bir petriye (20 ml hacminde) döküldü.

Çoklu dirençli suşlar %5 koyun kanı içeren brusella agarlara ekildi ve anerobik koşullar altında 37° C’de 24 saat bekletildi. İnkubasyon sonunda her bir suşun, bakteri kolonilerinden steril FTS (%0.9) ile 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlandı. Ardından bakteri süspansiyonları steril FTS ile 1:10

oranında sulandırılarak antibiyotikli besi yerlerine 2'şer µl nokta (10^5 CFU/spot) şeklinde inoküle edildi. Her bir petriye en fazla 14 adet suş inoküle edildi. Kontrol amacıyla antibiyotik içermeyen iki besi yerine ekim yapılarak hem anaerobik hem de aerobik koşullar altında 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Kontrol olarak testte, *C. perfringens* ATCC 13124 suşu kullanıldı. İnkübasyondan sonra her bir antibiyotiğin bakteri üremesini engellediği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi. *C. perfringens*'in MİK değerlerini yorumlamak için kılavuzlar yeterli olmadığından suşların antibiyotiklere duyarlılığı; EUCAST sınır değerine göre, EUCAST rehberinde bulunmayanlar için CLSI (M11-A7), her iki kılavuzda yer almayan antimikrobiyal ajanlar için, çalışmalarda önerilen yorumlama kriterleri dikkate alınarak değerlendirildi (Tablo 3.8).

Tablo 3.8. MİK sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan referanslar

Antibiyotikler	Dirençli (R) Sınır Değerler (µg/ml)	Kaynak
Penisilin	> 0.5	EUCAST, 2023
Linkomisin	≥1	Martel et al., 2004
Eritromisin	≥16	Wei et al., 2020
Tetrasiklin	≥16	CLSI (M11-A7), 2007
Enrofloksasin	≥2	Wei et al., 2020
Gentamisin	≥16	Wei et al., 2020
Ampisilin	≥2	CLSI (M11-A7), 2007

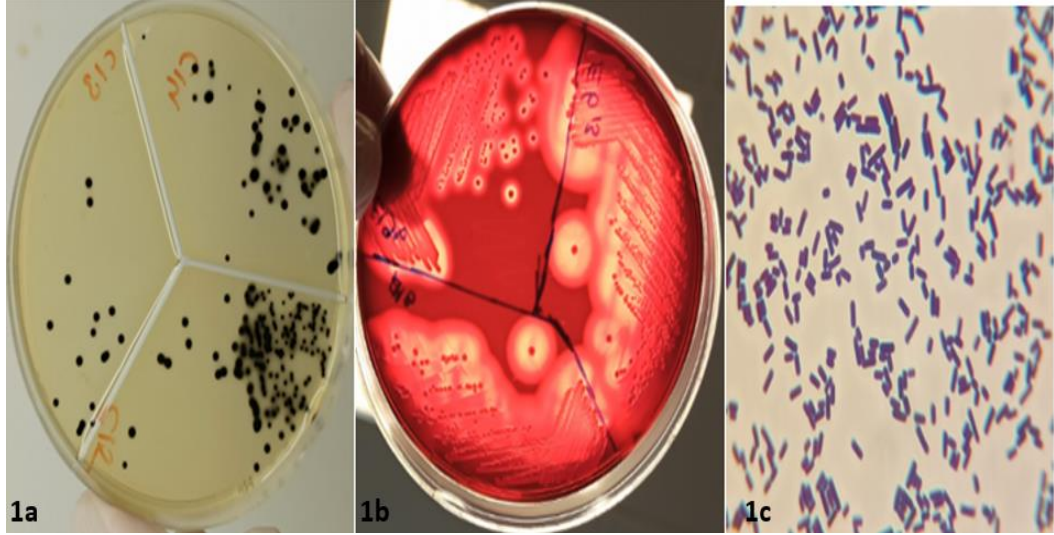
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Dünyada protein ihtiyacının karşılanması amacıyla kümes hayvanları üretiminin yaygınlaşması insanların *C. perfringens* gibi mikroflora etkenlerine maruz kalma sıklığını arttırmıştır (M'Sadeq et al., 2015; Rood et al., 2018). Etken, broylerlerde başta nekrotik enterit olmak üzere klostridyal enteritlere, hepatit ve kolanjiyohepatite sebep olmaktadır. Bu durum piliçlerde verim kaybı, artan ölüm oranı ve kümes hayvanları refahının azalması dolayısıyla kanatlı endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Dünya broyler sürülerinin 2015 yılında, 6 milyar dolarlık tahmini maliyetle %37.3'ünün *C. perfringens*'in neden olduğu kayıplardan etkilendiği bildirilmektedir (Thomas et al., 2014; Van Immerseel et al., 2004; Yang et al., 2018).

Dünyanın birçok ülkesinde ve ülkemizde broylerlerde *C. perfringens*'in önemini göstermek amacıyla çok sayıda araştırma mevcut olup, bunların bir kısmı etkenin kloakal svap ve sekum örneklerinden izolasyonu ve moleküler yöntemlerle identifikasyonuna yöneliktir (Haider et al., 2022; Kalender ve Ertaş, 2005, Karagülle, 2016; Mwangi et al., 2019).

4.1. *C. perfringens* İzolasyonu

Tez çalışmasında sağlıklı ve ishalleri piliçlerin kloakal svap ve sekum örneklerinden toplam 223 örnek değerlendirildi. Kloakal svaplarda izolasyon oranı %67.86 (95/140), sekum örneklerde ise %61.45 (51/83) olarak belirlendi. Clostridium izolasyonu amacıyla TSC agar kullanıldı ve TSC agar üzerinde siyah renkli koloniler (Şekil 4.1-1a) konvansiyonel teşhis için değerlendirilmeye alındı. Bu kolonilerden kanlı agara ekimler sonucunda, gri ve parlak görünüme sahip, içte teta toksine bağlı tam hemoliz zonu ve dışta alfa toksine bağlı kısmi hemoliz zonu ile çevrili koloniler ile tek hemoliz belirlenen koloniler *C. perfringens* izolasyonu amacıyla değerlendirildi (Şekil 4.1-1b). Gram boyama ile pozitif basillerin (Şekil 4.1-1c) ve katalaz testi ile negatif olan kolonilerin değerlendirilmesi sonucu konvansiyonel izolasyonda 146 örnek Clostridium şüpheli izolat olarak belirlendi (Tablo 4.1).



Şekil 4.1. *C. perfringens*'in kültürel özellikleri
(1a; *C. perfringens* TSC agar kültürü. 1b; Kanlı agar kültürü. 1c; 100X objektifde Gram pozitif boyanmış *C. perfringens* fotoğrafı)

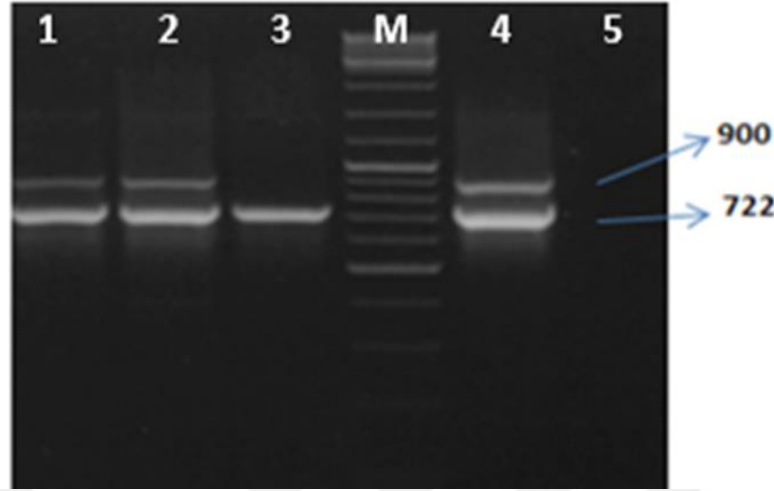
İshalli piliçlerin kloakal svap örneklerinden izole edilen izolatların tamamı %100 (6/6), sağlıklılarından izole edilenlerin %56.2 (50/89)'si; sağlıklı piliçlerin sekal örneklerinden elde edilen izolatların %52.4 (22/42)'ü, ishalli olgulara ait olanların %100 (9/9)'ü *16S rRNA* genine dayalı PZR ile *Clostridium* spp. olarak cins düzeyinde tanımlandı (Tablo 4.1). Aynı koşullarda *cpa* geni belirlenen *C. perfringens* suş sayısı kloakal svaplarda %67.86 (38/56), sekal örneklerde %70.97 (22/31), toplamda %68.97 (60/87) olarak belirlendi.

Tablo 4.1. *C. perfringens*'in fenotipik izolasyonu ve genotipik identifikasyonu

Kaynak	Örnek Sayısı/ Adet (n)	Konvansiyonel İzolasyon n (%)	<i>Clostridium</i> spp. Düzeyinde İdentifikasyon n (%)	<i>C. perfringens</i> Düzeyinde Genotipik İdentifikasyon n (%)
Kloakal svap				
Sağlıklı	130	89 (68.46)	50 (38.46)	33 (25.39)
İshalli	10	6 (60)	6 (60)	5 (50)
Toplam	140	95 (67.86)	56 (40)	38 (27.14)
Sekum				
Sağlıklı	64	42 (65.63)	22 (34.38)	17 (26.56)
İshalli	19	9 (47.37)	9 (47.37)	5 (26.32)
Toplam	83	51 (61.45)	31 (37.35)	22 (26.51)
Toplam (n)	223	146 (65.47)	87 (39.01)	60 (26.91)

n: incelenen örnek sayısı

16S rRNA ve cpa genine dayalı PZR ürünlerinin temsili görüntüsü aşağıdadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *Clostridium* spp. ve *C. perfringens* 'in multipleks PZR ile saptanması.
M: marker (100-1000 bç), Sırasıyla kuyucuk 1 ve 2 *C. perfringens* temsili örnekleri
'16S rRNA- 722 bç ve cpa -900 bç genler', 3- *Clostridium* spp, 4- *C. perfringens* Tip C
referans DNA ve 5- Negatif kontrol)

Sağlıklı ve nekrotik enteritli piliçlerde %5.8'den %100'e varan *C. perfringens* izolasyon oranları bildirilmektedir (Anju et al., 2021; Gholamiandekhordi et al., 2006; Gholamiandekhordi et al., 2009). Farklı çalışmalardan elde edilen oransal farklılıklar izolasyon yöntemine, laboratuvara getirilme ve depolama şartlarına, materyalde bulunan etken sayısı gibi birçok faktöre bağlı olarak oluşabilmektedir. Sağlıklı broylerlerin bağırsak içeriğindeki *C. perfringens* sayısı 10^3 /g olarak bulunurken subklinik ve klinik NE durumunda bu sayı 10^7 - 10^8 /g'a kadar ulaşabilmektedir (Calik et al., 2019). Nitekim aşağıda sağlıklı ve NE olgularında verilen oranlar bu durumu doğrular niteliktedir.

Sağlıklı piliçlere yönelik yapılan çalışmalarda, Anju vd. (2021), kültür ve PZR ile, 323 kloakal svap ve bağırsak örneğinden %5.88 oranında *C. perfringens* tespit etmişlerdir. Arif vd. (2022), kültür ve PZR sonucunda 150 kloakal svap örneğinin %6'sında, 47 bağırsak örneğinin %12.8'inde *C. perfringens* tespit etmişlerdir. Aynı bölgede gerçekleştirilen diğer bir çalışmada, 240 broyler kloakal svap örneğinin kültür ve PZR'si sonucu %10.4 oranında *C. perfringens* saptanmıştır (Tresha et al., 2021). Haider vd. (2022), yaptıkları bir çalışmada, 126 broyler (3-42 gün yaş) ve 8 damızlık broyler (37-50 hafta yaş) olmak üzere 42 nekrotik lezyonlu 134 bağırsak örneğini incelemişlerdir. Kültür ve PZR sonucunda %32.6 broyler, %50 damızlık

tavuk kaynaklı olmak üzere %25.4 oranında *C. perfringens* suşu elde etmişlerdir. Gholamiandekhordi vd. (2006), Avrupa’da yaptıkları çalışmada, izolasyon oranını %100 gerçekleştirmiş tür spesifik PZR ile kloakal svap (sağlıklı) ve bağırsak (NE’li) örneklerinden (duedonum, sekum, ileum, jejunum) ve karaciğer (NE’li) sırasıyla %100 (27) ve %88.9 (32/36) oranlarında *C. perfringens* saptamışlardır. Aynı araştırmacılar 2009 yılında yaptıkları diğer bir çalışmada, broyler sekum örneklerinin bakteriyolojik ve PZR ile incelenmesi sonucunda, örneklerin tamamında (%100) *C. perfringens* izole ve identifiye ettiklerini bildirmişlerdir (Gholamiandekhordi et al., 2009).

Nekrotik enteritisli broylerlerde %6.6’dan %100’e kadar oranlarda tespit yapılmıştır. Ahmed vd. (2022), 50 adet NE’li broyler bağırsak içeriğinin kültür ve PZR’si sonucunda %20 oranında, El-Helw vd. (2020), 30 NE’li broyler bağırsak örneğinden (duedonum, ileum, sekum ve kolon) kültür ve PZR yöntemleri sonucu %6.6 oranında *C. perfringens* tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Thi vd. (2021), yaptıkları bir çalışmada, 266 sağlıklı ve 265 NE’li tavuk dışkısı ile 68 NE’li bağırsak örneğinden oluşan toplam 599 örneği değerlendirmişlerdir. Kültür sonucu, 272 *C. perfringens* izole edilmiş ve izolatların %24’ünün sağlıklı, %63.4’ünün NE’li tavuk örneklerine ait olduğu bildirilmiştir. Yang vd. (2018), sağlıklı (kloakal svaplar) ve ölü (jejunum içeriği) NE’li broyler’lerdeki çalışmalarında kültür ve PZR yöntemleriyle olguların %100 ’ünde *C. perfringens* elde etmişlerdir. Wei vd. (2020), Kore’de yaptıkları çalışmada, herbir çiftlikten temsili seçtikleri piliç sekum ve organ örneklerinden kültür ile 162 *C. perfringens* izolatu elde etmişlerdir. İzolatların %100’ünün NE’li tavuklardan (ince bağırsak veya karaciğer) ve %54.8’inin sağlıklı tavuk (sekum veya ince bağırsak) örneklerinden oluştuğunu ve tüm izolatların *C. perfringens* olarak identifiye edildiğini bildirmişlerdir.

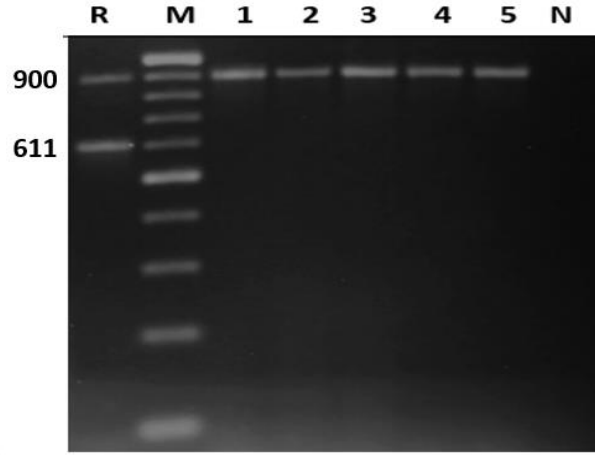
Bu çalışmada, cins düzeyinde belirlenen suş oranları ile tür düzeyinde tespit edilen oranlardaki farklılıklar piliçlerden alınan örneklerde *C. perfringens* dışında diğer Clostridium tür varlığını işaret etmektedir.

4.2. *C. perfringens* Suşlarının Toksin Tip ve Virülens Genlerinin Tespiti

C. perfringens patojenitesi bağırsak kolonizasyonu ve patojenitesi; bakterinin virülensiyle ilişkili toksin, antimikrobiyal direnç ve adezin genleri ile ilişkilendirilmektedir (Kiu et al., 2019; Rood et al., 2018). Kümes hayvanlarında hastalıklara *C. perfringens* Tip A, Tip C ve Tip G suşları neden olmakta ve bazı

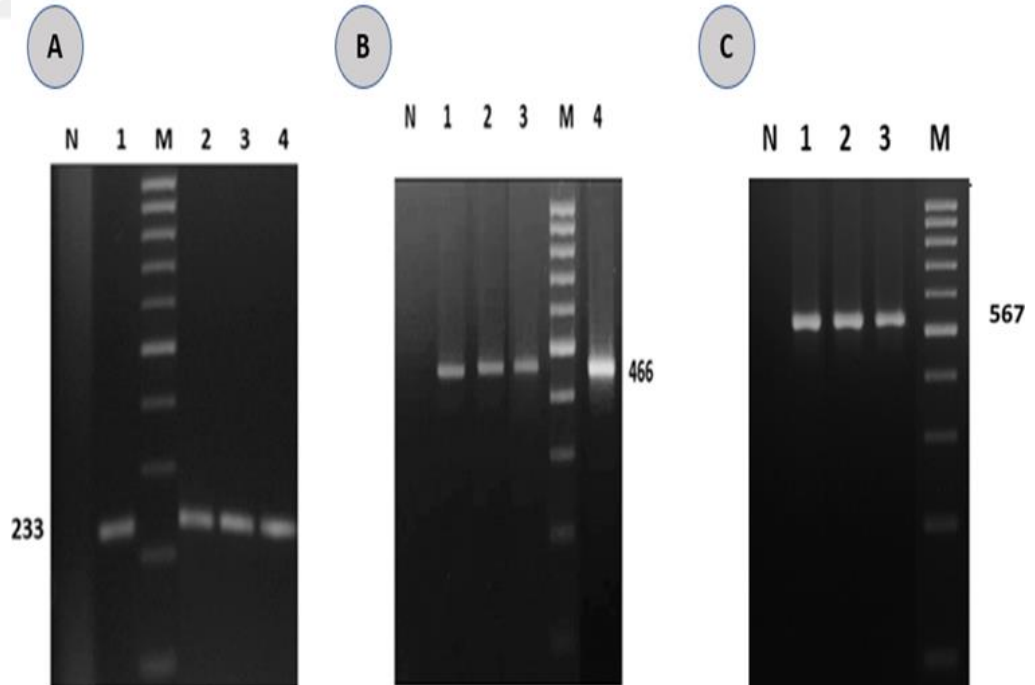
araştırmacılar hastalığın şiddetini artırmada *TpeL* (*tpeL*), enterotoksin (*cpe*), beta2 toksin (*cpb2*), kollajen adezin geni (*cnaA*) gibi çeşitli toksinlerden bir veya daha fazlasının rolü olduğunu bildirmişlerdir (Lepp et al., 2013; Rood et al., 2018; Uzal et al., 2014; Uzal et al., 2018). Ancak *tpeL* geni hakkında sınırlı bilgiler sebebiyle bu toksinin rolü henüz tam olarak bilinmemektedir. Diğer toksinlerle ilgili yapılan çalışmalarda, Karagülle (2016), broyler bağırsak örneklerinden izole edilen *C. perfringens* suşlarının sadece *cpa* geni içerdiğini ve suşların herhangi birinin diğer toksin genlerini (*cpb*, *etx*, *ia*, *cpe*, *cpb2*) taşımadığını tespit etmiştir. Ahmed vd. (2022), yaptıkları bir çalışmada 10 adet *C. perfringens* Tip A suşundan hiçbirinin *cpe* geni içermediğini ve 9 (%90)'unun *cpb2* geni taşıdığını tespit etmişlerdir. Anju vd. (2021) ise *C. perfringens* Tip A suşlarının hiçbirinde *cpe* geni belirlenmediğini ve 1 (%5.26)'inde *cpb2* geni tespit edildiğini bildirmişlerdir. El-Helw vd. (2020), yaptıkları çalışmada, 2 adet *C. perfringens* suşun *netB* geni bulundurduğunu ve Tip G olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *C. perfringens* Tip G suşlarının *cpe* geni taşıdığını belirlemişlerdir. Gholamiandekhordi vd. (2006), izole ettikleri *C. perfringens* Tip A suşların, 2 (%7.4)'sinin *cpe* ve 4 (%14.8)'ünün *cpb2* geni içerdiğini, sağlıklılara kıyasla NE'lilerde ise 8 (%25)'inin sadece *cpb2* geni taşıdığını bildirmişlerdir. Haider vd. (2022), hasta tavukların bağırsak örneklerinden yaptıkları çalışmada, multipleks PZR sonucunda *C. perfringens*'in tüm suşlarının sadece *cpa* geni içerdiğini ve suşların hiçbirinin *cpb*, *etx*, *ia*, *cpe*, *netB* ve *tpeL* toksin genlerini taşımadığını ortaya koymuşlardır. Heikinheimo ve Korkeala (2005), ise yaptıkları bir araştırmada, broyler bağırsaklarından izole edilen 118 *C. perfringens* izolatının tamamının yalnızca *cpa* geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Rachid (2020) de benzer olarak 22 izolatın tamamının yalnızca *cpa* geni taşıdığını bildirmiştir. Abdel Rahman ve Abdelhafez (2017), *C. perfringens* Tip A suşlarının %22.2'sinin *netB* geni bulundurduğunu bildirmiştir. Sağlıklı ve ölü NE'li broyler'lerde yapılan diğer bir çalışmada, *netB* ve *tpeL* genlerinin prevalansının NE'lilerde daha yüksek olduğu belirlenmiş, diğer toksin genlerinin (*cpb*, *cpb2*, *cpe*, *etx*, *ia*) hiçbirinin bulunmadığı belirlenmiştir (Mwangi et al., 2019). Wei vd. (2020), 162 *C. perfringens* suşunun % 23.5'inin *netB*, % 77.8'inin *cpb2* geni içerdiğini ve her iki geni barındıran suşların sağlıklılara kıyasla NE'lilerde daha fazla olduğunu, ayrıca suşların % 4.9'unun *tpeL* geni içerdiğini ve sadece NE'lilerde tespit edildiğini bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada suşların %50'sinin *cpb2*, tümünün *tpeL* toksin geni taşıdığı bunun aksine suşların *cpe* geni içermediği bildirilmiştir (Park and Rafii, 2019).

Konuya ilişkin yapılan çalışmalarda bildirildiği gibi bu araştırmada izole edilen 60 adet *C. perfringens* suşunun toksin tiplendirmesinde sadece *cpa* geni içerdiği ve tip A olduğu tespit edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *C. perfringens* 'in multipleks PZR ile tiplendirmesi
M: marker (100-1000 bç), R: *C. perfringens* Tip C referansı (*cpa*-900 bp, *cpb*-611 bp),
Kuyucuk 1-2-3-4-5 *C. perfringens* Tip A temsili örnekler N: DNA içermeyen örneği
göstermektedir.

Çalışmada 60 suştan 3'ü *cpb2*, 12'si *cpe*, 13'ü ise *tpeL* genlerini içerdiği ancak suşların hiçbirinin *cnaA* genini taşımadığı saptandı (Tablo 4.2 ve Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *cpe*, *tpeL* ve *cpb2* genleri pozitif *C. perfringens* DNA'larının agaroz jel görüntüsü
A: 233 bp ampikon *cpe* genini göstermekte (1-2-3-4 saha suşu); B: 466 bp ampikon
tpeL genini göstermekte (1-2-3 saha suşu, 4 *C. perfringens* Tip C referansı); C: 567
bp ampikon *cpb2* genini göstermekte (1,2,3 saha suşu) M: marker (100-1000 bç),
N: DNA içermeyen örneği göstermektedir.

Tablo 4.2. *C. perfringens* suşlarında *tpeL*, *cpe* ve *cpb2* virülens genlerin dağılımı

Suş No	Virülens Genler		
	<i>tpeL</i>	<i>cpe</i>	<i>cpb2</i>
*CP 1	+	-	-
*CP 2	+	-	-
*CP 5	+	-	-
*CP 6	+	+	-
*CP 7	+	-	-
*CP 8	+	+	-
*CP 9	-	+	-
*CP 10	+	-	-
CP 11	-	+	-
CP 16	+	+	+
CP 17	+	+	+
CP 18	+	-	-
CP 19	+	-	-
CP 20	+	-	-
CP 21	-	-	+
CP 22	+	-	-
CP 23	-	+	-
CP 24	-	+	-
CP 25	-	+	-
CP 26	-	+	-
CP 27	-	+	-
CP 28	-	+	-

*: İshal olguları

Çalışma kapsamında *C. perfringens* suşlarının *tpeL* ve *cpe* virülens geni sağlıklılara kıyasla ishallerde sırasıyla %70 ve %30 oranlarında tespit edildi (Tablo 4.3). Bu çalışmada elde edilen *tpeL* izolasyon sonuçları, sağlıklılara kıyasla NE'lilerde yüksek oranda tespit edilen Mwangi vd. (2019)'nin çalışma sonuçlarıyla benzerlik taşısa da, çalışmada NE olguları mevcut olmadığından klinik hastalık olgularıyla ilgili karşılaştırma mümkün olmadı. Diğer bir yandan *cpe* geni içeren suşların, sadece sağlıklı piliçlerde tespit eden Gholamiandekhordi vd. (2006)'nin aksine tez çalışmasında hem sağlıklı hem de ishallerde piliçlerden elde edilmesi, hastalığın patogenezinde klinik rolünü akla getirmektedir. Bu durum bize bu suşlarla ilgili sağlık ve olgu bazlı ekspresyon ve patojenite çalışmalarının gerekliliğini göstermektedir.

Bununla birlikte 2 suşta her üç toksin geni belirlenirken, *cpb2* virülens geni %6 oranında sağlıklılarda tespit edildi ve ishallerde ise saptanamadı (Tablo 4.3). Bu sonuç, diğer araştırmacıların bulgularıyla benzerdir (Anju et al., 2021; Chalmers et al., 2008). Ancak, *cpb2* genini sağlıklılara kıyasla hastalık olgularında daha fazla

belirlendiği çalışmalar da mevcuttur (Gholamiandekhordi et. al., 2006; Wei et. al., 2020).

Sonuç olarak, tez çalışmasında incelenen ishal olgu sayılarının yetersizliği hatta NE’li vakaların yokluğu, sağlık ve hastalık olgularına yönelik toksin ve virülens faktörlerinin karşılaştırılmasını mümkün kılmamıştır. Bu sebeple, hastalıklı ve sağlıklı kanatlılardaki *C. perfringens* suşları arasında virülens toksinlerin (*tpeL*, *cpe*, *cpb2* ve *cnaA*) rolünün anlaşılması için detaylı araştırmalara gereksinim ortaya çıkmaktadır.

Tablo 4.3. *C. perfringens* suşlarının virülens gen sonuçları

Materyal	<i>tpeL</i>	<i>cpe</i>	<i>cpb2</i>
İshal olguları	7/10 (% 70)	3/10 (%30)	0/10
Sağlıklı	6/50 (%12)	9/ 50 (%18)	3/ 50 (%6)
Toplam	13 / 60 (%21.6)	12 / 60 (%20)	3 /60 (%5)

4.3. *C. perfringens* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılık Test Sonuçları

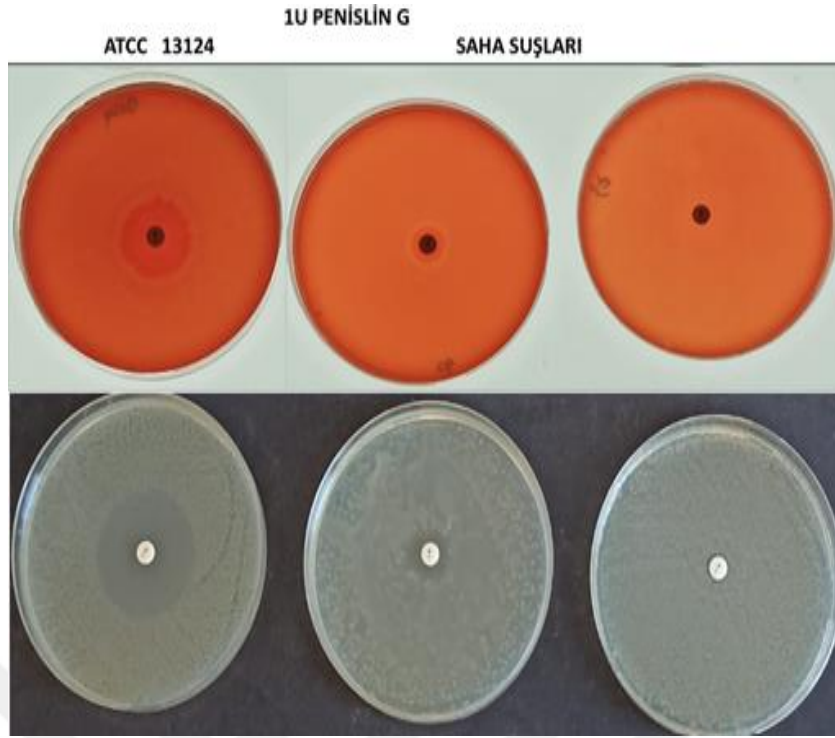
Uzun yıllar büyüme, performans ve verimliliği artırmak ve hayvanları patojenik enterik mikroorganizmaların olumsuz etkilerinden korumak için çiftlik hayvan ve kümes hayvanları yemlerine antibiyotikler katılmıştır (Dahiya et al., 2006; Dibner and Richards, 2005). Hayvan yemlerinde büyüme faktörü olarak antibiyotiklerin sürekli, düzensiz ve aşırı kullanımı antibiyotiklere direnç sorunu yaratmıştır (Benno et al., 1988; Kather et al., 2006; Tansuphasiri et al., 2005; Watkins et al., 1997). Bakterilerde artan antimikrobiyal direncin (AMR) önlenmesi için, ülkemizde ve tüm Avrupa ülkelerinde 2006 yılından itibaren antibiyotiklerin yem takviyesi olarak kullanımı yasaklanmıştır (Castanon, 2007; Tuncer, 2007). Antibiyotik Büyütme Faktörlerinin (ABF) yasaklanmasından sonra etlik piliçlerde enterik hastalıklar yeniden ortaya çıkmış ve antimikrobiyal ajanlar piliçlerde tedavi için yoğun şekilde kullanılmaya devam etmiştir. Hem beşeri hem de veteriner hekimlikte antibiyotiklerin sürekli ve yaygın kullanımı, *C. perfringens* suşları için direnç riskini beraberinde getirmiştir (Akhi et al., 2015, Yadav et al., 2017).

Dünyanın farklı bölgelerinde antibiyotik duyarlılıklarını belirleyen çeşitli araştırmalar mevcuttur. Bu araştırmalar, disk difüzyon yöntemine bağlı olarak yapılabildiği gibi agar ve broth dilüsyon yöntemlerine bağlı olarak da yapılmaktadır.

Bu araştırmalarda *C. perfringens*'in hem mikroflorayı oluşturan suşlarında hem de patojen türlerinde antibiyotik direnci ortaya konulmaktadır.

Mwangi vd. (2019), disk difüzyon yöntemi ile test ettikleri izolatların %53'ünün streptomisin, gentamisin, eritromisin, tetrasiklin ve basitrasinden oluşan çoklu dirençli bir profile sahip olduğunu göstermiştir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada, *C. perfringens* suşlarının disk difüzyon metodu ile basitrasin ve enrofloksasin direnci sırasıyla %36.84, %21.05, gentamisin ve tetrasiklin direnci %26.31, eritromisin ve linkomisin direnci %15.79 olarak tespit edilmiştir (Anju et al., 2021). Park vd. (2015), tüm suşların gentamisin, neomisin, streptomisin antibiyotiklerine dirençli, ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, kloramfenikol, seftiofur ve penisiline duyarlı olduğunu bildirmiştir. Haider vd. (2022), test sonucunda *C. perfringens* suşlarının neomisine %100, tetrasiklin ve linkomisine %95, ertiromisine %60, basitrasin ve enrofloksasine %15 dirençli, ancak tüm suşların amoksisilin, ampisilin, doksisisiklin, kloramfenikol ve penisilin G antibiyotiklerine duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer bir çalışmada, en yüksek dirençlilik, neomisin sülfat, tetrasiklin, linkomisin ve gentamisinde tespit edilmiş ve suşların dirençlilik yüzdeleri sırasıyla %87.5, diğer iki antimikrobiyal ajana %80 ve %52.5 civarında bulunmuştur. Ayrıca *C. perfringens* suşlarının %32.5'i enrofloksasine, %30'u ertiromisine, %22.5 ampisiline ve norfloksasine dirençli bunun aksine %90'ı kloramfenikole, %80'i penisiline ve %70'i amoksisiklin klavulanik asite duyarlı bildirilmiştir (Shojadoost et al., 2010). Abdel Rahman ve Abdelhafez (2017), yaptıkları bir çalışmada, eritromisine %100, linkomisine %94.4 dirençlilik, kloramfenikole %100, basitrasine %59.3, penisilin, ampisilin ve tetrasikline %83.4 civarında duyarlılık bildirmiştir. Ancak başka bir çalışmada, *C. perfringens* suşlarının %86.4'  tetrasikline, %77.3'  eritromisine, %50'si amoksisilin klavulanik asite, %36.4'  basitrasine ve %31.8'i penisiline dirençli bildirilmiştir (Rachid, 2020).

Tez çalışmasında disk difüzyon yöntemi ile penisiline duyarlılıkları belirlenemeyen suşların, disk içeriği 1 U deki sonuçları EUCAST standartı bazında değerlendirildiğinde 2'sinin dirençli olduğu saptandı (EUCAST, 2023) (şekil 4.5).



Şekil 4.5. Penisilin dirençli suşların disk difüzyon görüntüsü

Penisiline dirençli suşlar dışında disk difüzyon yöntemi ile 58 suş incelendi. Suşların tümü gentamisin, neomisin ve streptomisine, %77.6 (n:45)'sı linkomisin'e, %55.2 (n: 32)'si eritromisine, %53.4 (n: 31)'ü norfloksasine, %48.3 (n:28)'ü tetrasikline dirençli; %100 ampisilin, kloramfenikol ve virginamisine, %98.3 (n: 57)'ü amoksisiklin klavulanik asite, %96.6 (n: 56)'sı basitrasine, %91.4 (n: 53)'ü seftiofura, %82.8 (n: 48)'i doksisikline, %72.4 (n: 42)'ü enrofloksasine duyarlı bulundu (Tablo 4.4). Bununla birlikte, suşların % 74.1 (43/58)'i 3 ve/veya daha fazla gruptan antibiyotik sınıfına dirençli bulundu.

Tablo 4.4. *C. perfringens* suşlarının disk difüzyon testi ile antimikrobiyal duyarlılık sonuçları

Antimikrobiyal ajanlar	Suşlar (n:58)			
	Dirençli % (n)	Orta Derecede Duyarlı % (n)	İyi Derecede Duyarlı % (n)	Önemli Derecede Duyarlı % (n)
Streptomisin (10 µg)	100 (58)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Gentamisin (10 µg)	100 (58)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Neomisin (30 µg)	100 (58)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Linkomisin (2 µg)	77.6 (45)	5.2 (3)	5.2 (3)	12.1 (7)
Eritromisin (15 µg)	55.2 (32)	22.4 (13)	12.1 (7)	10.3 (6)
Tetrasiklin (30 µg)	48.3 (28)	20.7 (12)	3.4 (2)	27.6 (16)
Doksisiklin (30 µg)	17.2 (10)	15.5 (9)	13.8 (8)	53.4 (31)
Enrofloksasin (5 µg)	27.6 (16)	32.8 (19)	15.5 (9)	24.1 (14)
Norfloksasin (10 µg)	53.4 (31)	19 (11)	10.3 (6)	17.2 (10)

Tablo 4.4. (devam). *C. perfringens* suşlarının disk difüzyon testi ile antimikrobiyal duyarlılık sonuçları

Antimikrobiyal ajanlar	Suşlar (n:58)			
	Dirençli % (n)	Orta Derecede Duyarlı % (n)	İyi Derecede Duyarlı % (n)	Önemli Derecede Duyarlı % (n)
Seftiofur (10 µg)	8.6 (5)	6.9 (4)	5.2 (3)	79.3 (46)
Ampisilin (10 µg)	0 (0)	12.1 (7)	5.2 (3)	82.8 (48)
Amoksisilin klavulanik asit (30 µg)	1.7 (1)	3.4 (2)	1.7 (1)	93.1 (54)
Basitrasin (10 µg)	3.4 (2)	1.7 (1)	8.6 (5)	86.2 (50)
Viriginamisin (15 µg)	0 (0)	1.7 (1)	3.4 (2)	94.8 (55)
Kloramfenikol (30 µg)	0 (0)	6.9 (4)	10.3 (6)	82.8 (48)

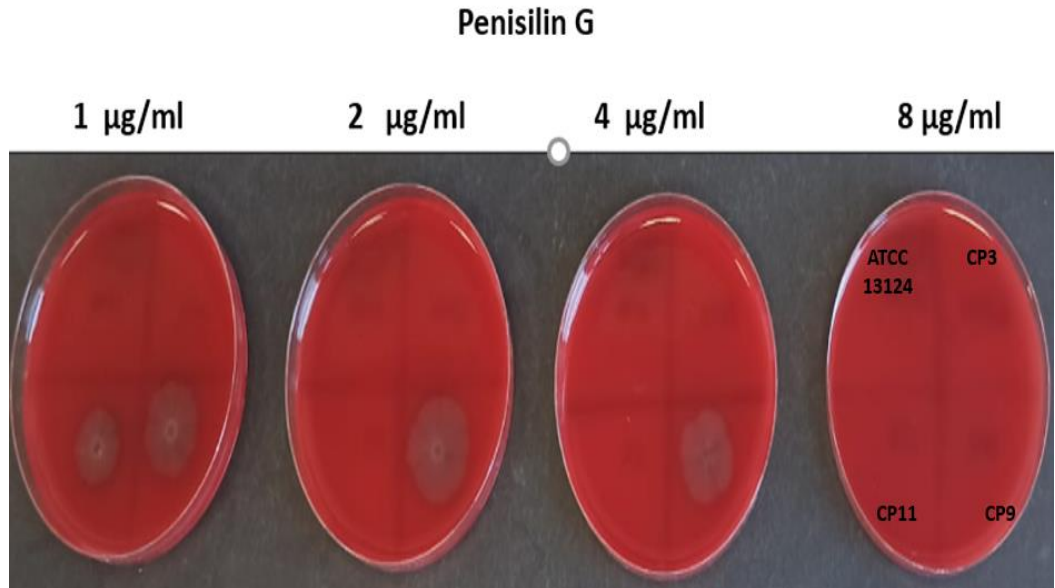
Disk difüzyon sonuçlarına göre penisilin dirençli 2 *C. perfringens* suşun, agar dilüsyon test metodu ile de dirençli olduğu belirlendi (EUCAST, 2023). Penisilin G, 0.03-16 µg/ml aralığında agar dilüsyon yöntemine göre EUCAST duyarlılık sonuçları, Tablo 4.5’de gösterilmektedir. Buna göre, MİK değerleri CP 9 ve CP11 için sırasıyla 8 ve 2 µg/ml olarak belirlendi.

Tablo 4.5. *C. perfringens* referans suşunun ve saha suşlarının penisilin duyarlılıkları

Suş No	Disk Difüzyon Yöntemi Değerlendirme Kriteri (mm) EUCAST			Agar dilüsyon Yöntemi MİK Sınır Değerleri (µg/ml) EUCAST		
	S≥15	R<15	DD	S≤0.5	R>0.5	DD
*CP 9	0	R		8		R
CP 11	11	R		2		R
ATCC 13124	27	S		0.06		S

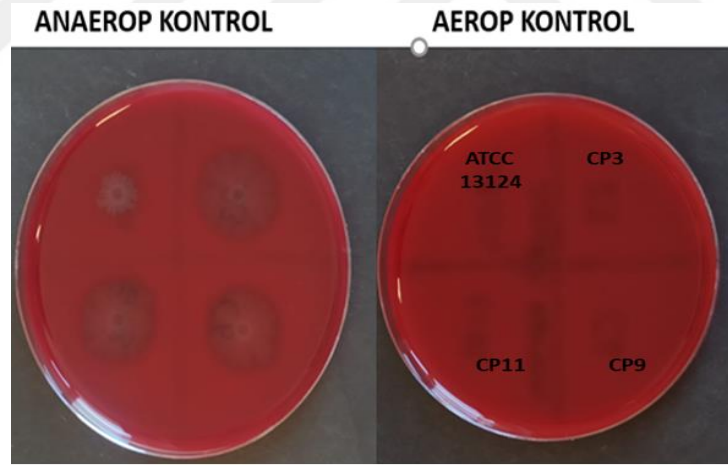
* ishal olgusu, R: dirençli, S: duyarlı, I: Orta duyarlı, DD: Direnç Durumu

C. perfringens ATCC 13124 suşu ile dirençli (CP9, CP11) ve duyarlı (CP3) saha suşların penisilin G MİK sonuçları Şekil 4.6’da gösterilmektedir.



Şekil 4.6. Penisilin dirençli suşların agar dilüsyon görüntüsü

Çalışmada canlılık kontrolü için antibiyotik içermeyen besi yerine bırakılan *C. perfringens* ATCC 13124 ve saha suşlarının hem aerop hem de anaerob kontrolleri Şekil 4.7’de gösterilmektedir.



Şekil 4.7. Suşların üreme kontrolleri

Antibiyotik duyarlılığının değerlendirilmesinde güçlükler olması ve çalışmada elde edilen çoklu dirençli suş sayısının fazlalığı, ayrıca çok az sayıda da olsa penisiline dirençli suşların olmasından dolayı, çalışmada tanımlanan suşların 22’sinin agar dilüsyon ile sınır değerleri belirlendi. Çalışmada, agar dilüsyon yöntemi ile incelenen *C. perfringens* suşlarının MİK aralıkları penisilin G için 0.03-8 µg/ml, linkomisin için 0.125-128 µg/ml, eritromisin için 1-128 µg/ml, tetrasiklin için 0.125-64 µg/ml, enrofloksasin için 0.125-4 µg/ml, gentamisin için 256-512 µg/ml ve ampisilin için 0.06- 2 µg/ml olarak bulundu (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. *C. perfringens* suşlarının agar dilüsyon yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri (µg/ml)

Suşlar (n: 22)	P	L	E	T	Enr	CN	Amp
ATCC 13124	0.06	2	0.5	1	0.125	+	0.06
*CP 1	0.06	0.5	2	4	0.5	+ ^b	0.06
*CP 2	0.06	0.25	2	4	0.5	+ ^b	0.06
*CP 3	0.03	4	2	0.25	0.5	256	0.06
*CP 4	0.03	+ ^a	+	0.125	1	+ ^b	0.06
*CP 5	0.03	32	+	64	4	256	0.06
*CP 6	0.125	0.5	2	16	0.5	+ ^b	0.06
*CP 7	0.06	+	+ ^a	4	+ ^d	+	0.06
*CP 8	0.06	2	2	8	0.25	+	0.06
*CP 9	8	2	+ ^a	8	+ ^d	+	2
*CP 10	0.25	8	2	8	0.125	+	0.06
CP 11	2	0.25	2	16	4	256	0.06
CP 12	0.125	4	8	16	0.5	+ ^b	0.06
CP 13	0.125	4	2	16	0.5	+ ^b	0.06
CP 14	0.06	1	+	0.125	1	+ ^b	0.06
CP 15	0.06	+	+	0.125	0.5	+ ^b	0.06
CP 16	0.06	0.125	1	32	0.5	+ ^b	0.06
CP 17	0.125	0.25	2	8	0.125	+	0.125
CP 18	0.06	0.25	2	8	0.125	+	0.06
CP 19	0.06	32	+ ^a	+ ^c	2	+	0.06
CP 20	0.06	16	+ ^a	+ ^c	+ ^d	512	0.06
CP 21	0.06	+	+ ^a	+ ^c	4	512	0.06
CP 22	0.03	+	+ ^a	4	4	+	0.06

*: İshalli broylerden izole edilen suş, + : Tablo 3.7’de belirtilen dilüsyonların tümüne karşı dirençli Suş, +^a: 0.125-≤32 µg/ml, +^b:16-≤256 µg/ml, +^c: 0.125- ≤16 µg/ml, +^d: 0.125-≤4 µg/ml, P: Penisilin G, L: Linkomisin, E: Eritromisin, T: Tetrasiklin, Enr: Enrofloksasin, CN: Gentamisin, Amp: Ampisilin

Agar dilüsyon yöntemi ile incelenen *C. perfringens* suşların disk difüzyon test sonuçları Tablo 4.7’de gösterilmektedir.

Tablo 4.7. MİK değerleri belirlenen *C. perfringens* suşlarının disk difüzyon yöntemine göre duyarlılık durumları

Suşlar	Linkomisin 2 µg (%)	Eritromisin 15 µg (%)	Tetrasiklin 30 µg (%)	Enrofloksasin 5 µg (%)	Gentamisin 10 µg (%)	Ampisilin 10 µg (%)
13124	R	+	+++	++	R	+++
*CP 1	+	+	R	R	R	+++
*CP 2	+	R	R	+	R	++
*CP 3	R	+++	R	+	R	+++
*CP 4	R	R	+++	++	R	+++
*CP 5	R	R	R	R	R	+++
*CP 6	++	+	+	R	R	+
*CP 7	R	R	+	R	R	+++
*CP 8	R	+	+	+	R	+++
*CP10	R	+	R	+	R	+
CP 12	R	R	R	R	R	+++
CP 13	R	++	+	+	R	+++
CP 14	R	R	+++	++	R	+++
CP 15	R	R	+++	+++	R	+++
CP 16	R	R	+++	+++	R	+++
CP 17	++	++	+	++	R	+++

Tablo 4.7. (devam). MİK değerleri belirlenen *C. perfringens* suşlarının disk difüzyon yöntemine göre duyarlılık durumları

Suşlar	Linkomisin 2 µg (%)	Eritromisin 15 µg (%)	Tetrasiklin 30 µg (%)	Enrofloksasin 5 µg (%)	Gentamisin 10 µg (%)	Ampisilin 10 µg (%)
CP 18	R	++	+	+++	R	+
CP 19	R	R	R	+	R	+++
CP 20	R	R	R	+	R	+
CP 21	R	R	+	++	R	+++
CP 22	R	R	+	+	R	+++

*İshal olguları

İnhibisyon yüzdeleri; ≤%40 R (dirençli), % 40–60 orta duyarlı (+), %60-%70 iyi duyarlı (++), ≥%70 önemli duyarlı (+++)

Çalışmada penisilin G, gentamisin ve tetrasiklin için agar dilüsyon ve disk difüzyon sonuçlarında %100 benzerlik saptandı. Her iki test arasında benzerlik yüzdeleri, linkomisin için %87.5, eritromisin için %75 ve enrofloksasin için %83.3 oranlarında bulundu (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. *C. perfringens* suşlarının agar dilüsyon yöntemi ile tespit edilen MİK değerlerinin disk difüzyon test sonuçları ile karşılaştırılması

Antimikrobiyal madde (n)	Dirençli bakteri sayısı (%)		
	Agar Dilüsyon	Disk Difüzyon	Her iki testte dirençli değerlendirilen suş sayısı (%)
PenisilinG (22)	2 (9.1)	2 (9.1)	2 (100)
Linkomisin (20)	14 (70)	16 (80)	14 (87.5)
Eritromisin (20)	9 (45)	12 (60)	9 (75)
Tetrasiklin (20)	8 (40)	8 (40)	8 (100)
Enrofloksasin (20)	6 (30)	5 (25)	5 (83.3)
Gentamisin (20)	20 (100)	20 (100)	20 (100)

n: Suş sayısı

İncelenen suşların tamamının gentamisine dirençliliği agar dilüsyon yöntemi ile değerlendirildi. Disk difüzyon yöntemiyle, penisiline dirençli olan iki suşun MİK değerleri EUCAST’da belirtilen cut-off değeri 0.5 µg/mL’nin üzerinde 2 µg/mL ve 8 µg/mL olarak bulundu. Kore’de 162 izolatla yapılan bir araştırmada %1.2 oranında direnç bildirilirken (Wei et al., 2020), tez çalışmasında penisilin için MİK değerleri daha yüksek olup, suşların %9.1’inde dirençlilik saptandı. Aynı araştırmacı tarafından agar dilüsyon yöntemi ile Brezilya’da yapılan iki çalışmada penisiline %100 duyarlılık bildirilirken (Silva et al., 2009; Silva et al., 2014) tez çalışmasında suşların %90.9’u penisiline duyarlı ve ECOFF olarak ifade edilen MİK değerleri 0.5 µg/ml değerinin altında saptandı. Çalışmada penisilin G’ye dirençli 2 suşun bulunması bu suşların beta laktamaz enzimine sahip olmasının veya yoğun

antibiyotik kullanımından dolayı penisilin bağlayan protein (PBP) yapısında, aminoasit dizilerinde meydana gelen mutasyonların bir sonucu olarak ya da başka mekanizmalar ile bu durumun gelişebileceği açıklanabilir (Park and Rafii, 2017).

Broylerlerde *C. perfringens* enfeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan diğer bir antibiyotik linkomisin için MİK değerleri 0.125-128 µg/ml bulundu. Ancak linkomisin için ECOFF değeri EUCAST ve CLSI'de bildirilmemektedir. Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, linkomisin için MİK değerini ≥ 1 µg/ml temel aldığındaki dirençlilik oranını Martel vd. (2004) %63, Gholamiandehkordi vd. (2009) %61.5 olarak tespit etmişlerdir. Tez çalışmasında, linkomisin için Martel vd. (2004) tarafından bildirilen MİK değeri ≥ 1 µg/ml standart alındığında test edilen suşların %68.2(15/22)'sinin linkomisine dirençli olduğu belirlendi. Aynı araştırmacı tarafından 2009'da yapılan çalışmada suşların %3.6'sının ve 2014'de ise %72.2'sinin dirençli olduğu bildirilmiştir (Silva et al., 2014; Silva et al., 2009). Sıvı dilüsyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda; linkomisinin histopatolojik lezyon gelişimi arttıkça MİK₅₀ değerinin 64- ≥ 256 µg/ml aralıklarında değiştiği raporlanmıştır (Fan vd., 2016). Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da, linkomisin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri, Amerika'da 64 ve >256 µg/ml; Ürdün'de ≥ 256 µg/ml, Almanya'da 4 ve ≥ 8 µg/ml olarak belirlenmiştir (Gad et al., 2012; Gharaibeh et al., 2010; Watkins et al., 1997). Tez çalışmasında incelenen 22 suştan 8'inin 16-128 µg/ml MİK değerleri ile yüksek konsantrasyonlarda dirençli bulunması, direnç sorunlarının önemli boyutlarda olduğunu göstermesi açısından anlamlı bulunmuştur. MİK değerlerinin geniş aralıkta saptanması, linkomisinin broylerlerde tedavi ve profilaktif amaçlı yoğun kullanımından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada eritromisin MİK değeri 1-128 µg/ml aralığında bulundu. Ancak bu antimikrobiyal ajan için ECOFF değeri bilinmemektedir. Sınır değer 16 µg/ml olarak kabul edildiğinde suşların %45.5(10/22)'inde dirençlilik belirlendi. Agar dilüsyon çalışmaları; MİK₅₀-MİK₉₀ değerlerini Benning ve Mathers (1999) 4-256 µg/ml, Wei vd., (2020) 16 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Buna karşın farklı araştırmalarda *C. perfringens* suşlarında eritromisine duyarlılık saptanmıştır (Gholamiandehkordi et al., 2009; Silva et al., 2014). Sıvı dilüsyon yöntemi ile MİK₅₀-MİK₉₀ değerlerinin belirlendiği araştırmalarda, Benning ve Mathers (1999) 4-16 µg/ml, Fan vd. (2016) bağırsakta histopatolojik lezyon yoğunluğuna göre MİK₅₀ değerini 8-256 µg/ml

aralığında bildirmişlerdir. Almanya’da eritromisin için MİK₅₀-MİK₉₀ değerlerinin 4 µg/ml olduğu ve suşların %17.4’ünde (Gad et al., 2012), Çin’de 4-256 µg/ml konsantrasyonda ve suşların %49.1’inde (Li et al., 2020) dirençliliğin belirlendiği, Kanada’da suşların %2’sinde >256 µg/ml konsantrasyonunda MİK değeri tespit edildiği bildirilmiştir (Slavic et al., 2011). İskandinav ülkelerinde eritromisin için MİK değerleri 4-32 µg/ml olarak rapor edilmiştir (Johansson et al., 2004). Tez çalışmasında da 4 suşta yüksek konsantrasyonda (128 µg/ml) MİK tespit edildi. Bu olası dirençlilik durumlarının suşların dirençlilik gen potansiyeli ve direnç mekanizmaları yönünden değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Enrofloksasin için de değerlendirme kriteri CLSI ve EUCAST kılavuzlarında bulunmamaktadır. Wei vd. (2020), çalışmalarında enrofloksasin için sınır değer olarak 2 µg/ml belirlemiş ve bu değere göre suşlarının %43.8’inde dirençlilik saptamışlardır. Aynı araştırmacılar enteritli broylerlerden elde ettikleri suşlarda %27.7, sağlıklı olanlarda ise yaklaşık 2 kat %54.6 oranında dirençlilik tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Buna karşın başka bir çalışmada *C. perfringens* suşlarında enrofloksasine dirençlilik saptanamamıştır (Gholamiandehkordi et al., 2009). Tez çalışmasında, suşlar için belirlenen MİK değerleri 0.125-4 µg/ml aralığında belirlendi. MİK değeri Wei vd. (2020) tarafından belirlenen sınır değeri 2 µg/ml kabul edildiğinde, suşların %36.4(8/22)’ünde enrofloksasine dirençlilik belirlendi. Sıvı dilüsyon yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada enrofloksasin için MİK₅₀-MİK₉₀ değerleri 0.25-2 µg/ml bulunmuştur (Fan et al., 2016). Diğer bir çalışmada enrofloksasin için MİK₅₀-MİK₉₀ değerleri 8-≥256 µg/ml olarak bildirilmiştir (Gharaibeh et al., 2010). Araştırmacılar, bu çalışmada elde edilen MİK değerinin yüksekliğini, kümes hayvanlarında *E. coli* enfeksiyonlarının tedavisi için enrofloksasinin yaygın kullanımı ile ilişkilendirmişlerdir (Gharaibeh et al., 2010). Diğer bir çalışmada, enrofloksasinin MİK₅₀-MİK₉₀ değerlerinin >512 µg/ml olduğu ve suşların %91’inde enrofloksasine dirençlilik tespit edildiği bildirilmiştir (Li et al., 2020). Ancak yumurtacı tavuklardan elde edilen *C. perfringens* suşları üzerinde yapılan bir çalışmada suşlar 0.25 µg/ml konsantrasyonunda enrofloksasine %100 duyarlı bulunmuştur (Gad et al., 2012). Enrofloksasine duyarlı sonuçların alınması intrinsik bir direncin mevcut olmadığını, bu farklılığın suşlara bağlı olarak gelişebileceğini göstermektedir.

CLSI (M11-A7) kılavuzunda, tetrasiklin için sınır değeri anaerobik bakterilerde ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ olarak bildirilmiştir. Ancak *C. perfringens* için spesifik bir değeri bildirilmemiştir (CLSI, 2007). Farklı çalışmalarda *C. perfringens* suşlarında tetrasiklin duyarlılığı için değışken sonuçlar elde edilmiştir. Nitekim Wei vd. (2020), *C. perfringens* suşlarında MİK değeri 4 $\mu\text{g/ml}$ olarak bildirmiş ve buna göre suşların %60.5'inde tetrasikline dirençlilik tespit edilmiştir. Aynı çalışmada sağlıklı broylerlerden elde edilen suşlarda %67, ishallerden elde edilen suşlarda %50.8 oranında dirençlilik belirlenmiştir (Wei et al., 2020). Diğer bir çalışmada MİK değeri 0.5-32 $\mu\text{g/ml}$ bulunmuş ve suşların %66.6'sında dirençlilik bildirilmiştir (Gholamiandehkordi et al., 2009). Yine Brezilya'da yapılan bir çalışmada suşların %41.8'inde dirençlilik bildirilmiştir (Silva et al., 2009).

Agar dilüsyon yerine sıvı dilüsyon metodu kullanarak yapılan çalışmalarda fenotipik dirençlilik rapor edilmektedir. Tetrasiklin için suşların dirençlilikleri, Kanada'da %62 (Slavic et al., 2011), Almanya'da MİK₅₀-MİK₉₀ değeri $\leq 2-4$ $\mu\text{g/ml}$ bulunmuş ve buna göre suşların %100'ünün orta aralıkta (Intermediate) olduğu bildirilmiştir (Gad et al., 2012). Çin'de ise araştırmacılar, tetrasiklin için MİK₅₀-MİK₉₀ değeri 4-32 $\mu\text{g/ml}$ bulmuş ve suşların %20.1'inde tetrasiklin dirençliliğini saptamışlardır (Li et al., 2020). Tez çalışmasında ise CLSI (M11-A7), kılavuz standartına göre (≥ 16 $\mu\text{g/ml}$) suşların %40.9(9/22)'inde direnç saptanmıştır. Direnç oranındaki bu artış, *C. perfringens* gibi patojenlerin neden olduğu enterik hastalıkları önlemede tetrasiklinin tercihi ile ilişkilendirilebilir.

Farklı ülkelerde ampisiline yönelik çalışmalarda, %100 duyarlılık saptanmış ve klinik olguların tedavisi için ampisilin tercih edilmiştir (Gholamiandehkordi et al., 2009; Johansson et al., 2004; Wei et al., 2020). Ancak bu duyarlılığın araştırılan tüm suşlarda tam olmadığı Ürdün'de yapılan bir çalışmada MİK₉₀ değeri ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanarak %22.39 oranında bir direnç gelişimi gösterilmiştir (Gharaibeh et al., 2010). Tez çalışmasında ise CLSI (M11-A7) standartına göre (2 $\mu\text{g/ml}$), 1 suşta dirençlilik saptandı. Bu durum, *C. perfringens*'in yaygın beta-laktam antimikrobiyallerin kullanımı sonucu gelişebileceğini düşündürmektedir.

Tez çalışmasında *C. perfringens* suşlarının gentamisine %100 dirençli olduğu saptandı. Nitekim, Wei vd. (2020), *C. perfringens* suşlarında gentamisine %93.2 dirençlilik tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar enteritli broylerden elde edilen suşlarda sağlıklılara kıyasla %100 dirençlilik saptamışlardır. Diğer bir araştırmacı da

suşların %91'inde dirençlilik saptamıştır (Li et al., 2020). Tez çalışmasında yüksek MİK değerlerinin tespiti, *C. perfringens*'in aminoglikozid grubu antibiyotiklerin yaygın kullanımı sebebiyle, kümes hayvanlarında antimikrobiyal direnç genlerinin bir rezervuarı haline geldiğini veya doğal dirence sahip olduğunu düşündürmektedir.

C. perfringens üretimimin, antibiyotik duyarlılık testlerinin ve sonuçların ifadesinde standart yöntemlerin olmaması *C. perfringens*'in piliçlerde ve diğer canlı türlerinde araştırmalarını kısıtlamıştır. Sonuç olarak, çalışmalarda görülen antibiyotiklere farklı dirençlilikler, bölgede hastalıkların önlenmesi amacıyla terapötik veya subterapötik dozlarda antibiyotik kullanımının olabileceğini göstermektedir. Bu durumun antibiyotik büyütme faktörlerinin yasaklanmasından sonraki durum ile bağlantısı bilinmemektedir. Dolayısıyla bu durum yoğun kullanılan antibiyotiklere bağlı olarak bakterilerde gelişen dirençliliklerin muhtemel bir sonucu olabilir. *C. perfringens* için kullanılan antibiyotikler için henüz kesin bir MİK standardı olmaması sebebiyle ECOFF verileri oluşturulmasına devam edilmesi, çiftliklerde izleme programlarına *C. perfringens* takibi için MİK sonuçlarını gösterecek şekilde dahil edilmesi gelecekte olası antibiyotik direnç sorunlarının çözümüne katkı sağlayacaktır. Çalışmada yüksek oranlarda dirençli suşların tespiti direnç gelişim sebepleri intrinsik olanların ayrımını ve intrinsik dışındaki diğer sebeplerin hastalık olguları ve sağlık durumu temelinde karşılıklı değerlendirilmesini ve insan sağlığı yönünden taşınacak riskler yönünden araştırmaların yapılması gerektiği ortaya çıkarmıştır.

5. SONUÇ

Antimikrobiyal büyüme faktörleri (ABF), kanatlı üretim endüstrisinde nekrotik enteritlere neden olan *C. perfringens* dahil olmak üzere diğer bağırsak patojenlerini kontrol etmek için uzun yıllar kullanılmıştır. Ancak ABF'lerin yaygın kullanımı dirençli patojenlerin gelişmesine, üstelik gıda değeri olan hayvanlardan insanlara dirençli bakterilerin aktarımı gibi endişelerden dolayı yasaklanmıştır. ABF'nin yasaklanmasından sonra etlik piliçlerde *C. perfringens*'in neden olduğu NE olmak üzere enterik hastalıklar yeniden ortaya çıkmış ve antimikrobiyal ajanlar piliçlerde tedavi için yoğun bir şekilde kullanılmaya devam etmiştir. Sonrasında *C. perfringens* enfeksiyonlarının arttığı, ekonomik değere sahip olan etlik piliçlerde ağırlık artışı ve yem dönüşüm oranında azalma ve mortaliteden dolayı klinik olgularda antibiyotiklerin aşırı ve uygunsuz kullanımı artmış ve antibiyotiklere karşı direnç sorunu ortaya çıkmıştır. Böylece, insan ve hayvan sağlığı için kritik risk oluşturan çoklu dirençli patojenlerin görülme sıklığı giderek artmıştır. Bununla birlikte *C. perfringens* insanlarda gazlı gangren ve dışkı ile gıdalara ve çevreye bulaşarak gıda kaynaklı hastalıklara neden olması sebebiyle de zoonotik öneme sahiptir. Bu etken, tavukların normal bağırsak florasında yer almasına rağmen, toksinlerinin ve virülens faktörlerinin kolonizasyon ve hastalığın gelişimindeki bireysel rolü net değil ve birçoğu tanımlanamamıştır. Ülkemizde ve dünyada hastalığın virülens faktörlerini ve prevalansını ortaya koyan çalışmalar oldukça sınırlıdır. İnsan ve hayvan sağlığı için kritik risk oluşturan çoklu dirençli patojenlerin görülme sıklığı giderek artmaktadır. Bu nedenle insan ve hayvan sağlığının korunması için potansiyel direnç taşıyan suşların belirlenmesi ve antibiyotik duyarlılık profilinin ortaya çıkarılması önem taşımaktadır.

Benzer çalışmalarda bildirildiği gibi tez çalışmasında, tüm suşların sadece *cpa* geni taşıdığı ve tip A kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Tip A suşları içerisinde 12 suşun *cpe* geni, 13'ünün *tpeL* geni ve 3'nün ise *cpb2* taşıdığı saptanmıştır. Ancak bu çalışmada, NE olgularının olmaması ve ishal olgu sayılarının yetersizliği, buradan izole edilecek suşlardaki toksin ve virülens faktörlerinin karşılaştırılmasını engellemiştir. Buna karşın elde edilen verilerin gelecekte yapacağımız çalışmalar için iyi bir kaynak oluşturacağı aşikardır.

ABF'nin yasaklanmasından sonra etlik piliçlerde enterik hastalıklar yeniden ortaya çıkmış ve piliçlerde tedavi için yüksek oranda antimikrobiyal ajanlar yoğun

bir şekilde kullanılmıştır. Tez çalışmasında disk difüzyon yöntemi ile *C. perfringens* suşlarının % 74.1 (43/58) çoklu antibiyotik direnci saptanmıştır. Her iki antibiyotik duyarlılık yöntemi ile çalışılan 20 *C. perfringens* suşun, disk difüzyon testi ile %75(15/20)'inde, agar dilüsyon yöntemi ile %55(11/20)'inde çoklu antibiyotik direnci saptanmıştır. *C. perfringens* suşlarında çoklu antibiyotik dirençliliğinin fazla sayıda tespiti, olası kontaminasyon ve bulaşmalardan dolayı hem hayvan sağlığı hemde halk sağlığı açısından potansiyel risk oluşturacağını göstermektedir. Bu çalışma, antibiyotiklere dirençli *C. perfringens* suşlarında direnç durumunun ve seviyelerinin belirlenmesi nedeniyle tedavi için doğru antibiyotik kullanımına ve antibiyotik direncini en aza indirmeye yönelik çalışmalara katkı sağlayacaktır. Bununla birlikte, çalışmada elde edilen antibiyotik duyarlılık verileri kanatlı refahının iyileştirilmesi, ölüm ve ekonomik kayıpların önüne geçilebilmesi ve etkili kontrol stratejilerinin oluşturulmasında fayda sağlayacağı açıktır.

KAYNAKÇA

- Abadeen, Z.U., Javed, M.T., Rizvi, F., Rahman, S.U. (2021). Salutory effects of anti-*Clostridium perfringens* type A egg yolk antibodies (IgY) on growth performance and hemato-biochemical parameters in experimentally infected broiler chicken. *Pakistan Veterinary Journal*. 41(4). 562–566.
- Abdel-Glil, M.Y., Thomas, P., Linde, J., Busch, A., Wieler, L.H., Neubauer, H., Seyboldt, C. (2021). Comparative in silico genome analysis of *Clostridium perfringens* unravels stable phylogroups with different genome characteristics and pathogenic potential. *Scientific Reports*. 11(1):6756.
- Abdel Rahman, M.A.A and Abdelhafez, A.S. (2017). Prevalence of *Clostridium Perfringens* isolated from broiler chicken. *Animal Health Research Journal*. 5 (4A). 244-251.
- Abildgaard, L., Sondergaard, T.E., Engberg, R.M., Schramm, A., Højberg, O. (2010). In vitro production of necrotic enteritis toxin B, NetB, by netB-positive and netB-negative *Clostridium perfringens* originating from healthy and diseased broiler chickens. *Veterinary Microbiology*. 144(1-2):231-5.
- Abd El-Hack, M.E., El-Saadony, M.T., Elbestawy, A.R., El-Shall, N.A., Saad, A.M., Salem, H.M., El-Tahan, A.M., Khafaga, A.F., Taha, A.E., AbuQamar, S.F., El-Tarabily, K.A. (2021). Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives - a comprehensive review. *Poultry Science*. 101(2). 101590.
- Ahmed, H.A., El Bayomi, R.M., Hamed, R.I., Mohsen, R.A., El-Gohary, F.A., Hefny, A.A., Elkhawaga, E., Tolba, H.M.N. (2022). Genetic Relatedness, Antibiotic Resistance, and Effect of Silver Nanoparticle on Biofilm Formation by *Clostridium perfringens* Isolated from Chickens, Pigeons, Camels, and Human Consumers. *Veterinary Sciences*. 9(3):109.
- Akhi, M.T., Bidar, Asl.S., Pirzadeh, T. et al. (2015). “Antibiotic Sensitivity of *Clostridium perfringens* Isolated From Faeces in Tabriz, Iran”. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 8(7). e20863.
- Allaart, J.G., de Bruijn, N.D., van Asten, A.J., Fabri, T.H., Gröne, A. (2012). NetB-producing and beta2-producing *Clostridium perfringens* associated with subclinical necrotic enteritis in laying hens in the Netherlands. *Avian Pathology*. 41(6). 541-6.
- Alizadeh, M., Shojadoost, B., Boodhoo, N., Astill, J., Taha-Abdelaziz, K., Hodgins, D.C., Kulkarni, R.R., Sharif, S. (2021). Necrotic enteritis in chickens: a review of pathogenesis, immune responses and prevention, focusing on probiotics and vaccination. *Animal Health Research Reviews*. 22(2).147-162.
- Alves, G.G., Machado de Ávila, R.A., Chávez-Olórtegui, C.D., Lobato, F.C. (2014). *Clostridium perfringens* epsilon toxin: the third most potent bacterial toxin known. *Anaerobe*.30. 102–107.
- Amit-Romach, E., Sklan, D. and Uni, Z. (2004). Microflora Ecology of the Chicken Intestine Using 16S Ribosomal DNA Primers. *Poult Sci*. 83.1093-1098.
- Amimoto, K., Noro, T., Oishi, E. (2007). A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. *Microbiol*. 153(Pt 4):1198–1206.
- Anju, K., Karthik, K., Divya, V., Mala Priyadharshini, M.L., Sharma, R.K., Manoharan, S. (2021). “Toxinotyping and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolated from different sources of livestock and poultry “. *Anaerobe*. 67. 102298.

- Arif, M., Sultana, N., Islam, Sk.S., Tresha, A.O., Abdullah-Al-Mamun, Sayed., Nobi, Md. A., Khan M.F.R., Kabir, S.M.L. (2022). Occurrence of *Clostridium perfringens* in layer flocks of selected districts in Bangladesh: molecular typing, antimicrobial susceptibility. *Asian Australasian Journal of Bioscience and Biotechnology*. 7 (2). 36-49.
- Bae, D., Lee, J.W., Chae, J.P., Kim, J.W., Eun, J.S., Lee, K.W., Seo, K.H. (2021). Characterization of a novel bacteriophage ϕ CJ22 and its prophylactic and inhibitory effects on necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* in broilers. *Poultry Science*. 100(1):302-313.
- Baums, C.G., Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe, R. (2004). Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology*. 100(1-2):11–16.
- Benning, V.R. and Mathers, J.J. (1999). Comparison of Agar Dilution and BrothMicrodilution Methods of Anaerobic Antimicrobial Susceptibility Testing using SeveralVeterinaryAntibiotics against *Clostridium perfringens* Strains Originating from Porcine and Avian Sources. *Anaerobe*. 5. 561±569.
- Benno, Y., Endo, K., Shiragami, N., Mitsuoka, T. (1988). Susceptibility of fecal anaerobic bacteria from pigs and chickens to five polyether antibiotics for growth promotion. *Japanese Journal of Veterinary Science*. 50 (3). 783–790.
- Broussard, C.T., Hofacre, C.L., Page, R.K., Fletcher, O.J. (1986). Necrotic enteritis in cage-reared commercial layer pullets. *Avian Diseases*. 30(3). 617–619.
- Brynstad, S., Sarker, M.R., McClane, B.A., Granum, P.E., Rood, J.I. (2001). Enterotoxin plasmid from *Clostridium perfringens* is conjugative. *Infection and Immunity*. 69(5):3483-7.
- Butaye, P., Devriese, L.A., Haesebrouck, F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(2). 175-88.
- Calik, A., Omara, I.I., White, M.B., Evans, N.P., Karnezos, T.P., Dalloul, R.A. (2019). Dietary Non-Drug Feed Additive as an Alternative for Antibiotic Growth Promoters for Broilers During a Necrotic Enteritis Challenge. *Microorganisms*. 7(8):257.
- Castanon, J.I.R. (2007). History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*. 86(11):2466-2471.
- Chalmers, G., Bruce, H.L., Hunter, D.B., Parreira, V.R., Kulkarni, R.R., Jiang, Y.F., Prescott, J.F., Boerlin, P. (2008). Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. *Journal of Clinical Microbiology*. 46 (12). 3957–3964.
- Chen, J. and McClane, B.A. (2015). Characterization of *Clostridium perfringens* TpeL toxin gene carriage, production, cytotoxic contributions, and trypsin sensitivity. *Infection and Immunity*. 83 (6). 2369–2381.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2007). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, Approved Standards – Seventh Edition. CLSI document M11-A7. Wayne, Pennsylvania, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. 9th ed. CLSI Standard M11. Wayne, PA.
- Collier, C.T. Hofacre, C.L. Payne, A.M. Anderson, D.B. Kaiser, P. Mackie, R.I. Gaskins, H.R. (2008). Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. *Veterinary Immunology Immunopathology*. 122(1-2). 104–115.

- Cooper, K.K., Songer, J.G. (2009). NE in chickens: a paradigm of enteric infection by *C.perfringens* type A. *Anaerobe*. 15 (1-2): 55–60.
- Cooper, K.K., Songer, J.G., Uzal, F.A. (2013). Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 25(3). 314–327.
- Coursodon, C.F., Glock, R.D., Moore, K.L., Cooper, K.K., Songer, J.G. (2012). TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. *Anaerobe*. 18(1):117–121.
- Czczulin, J.R., Hanna, P.C., McClane, B.A. (1993). Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*. *Infection Immunity*. 61(8). 3429–3439.
- Dahiya, J.P., Wilkie, D.C., Van Kessel, A.G., Drew, M.D. (2006). Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Animal Feed Science and Technology*. 129 (1-2). 60–88.
- Dibner, J.J. and Richards, J.D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science*. 84 (4), 634-43.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J., Zhao, X. (2008). Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52(2). 385-92
- Dwivedi, P., Kaushik, S., Tomar, R.S. (2015). Towards an Understanding on Toxins and Infectious Diseases of *Clostridium perfringens* vis-a-vis Prospective Recombinant Vaccines. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4(11). 356-371.
- El-Helw, H.A., Taha, M.M., Elham F, El-Sergany., Ebtesam, E.Z. Kotb., Hussein, A.S., and Abdalla, Y.A. (2020). Identifying the Virulent Factors of *Clostridium perfringens* Locally Isolated from Different Species *World Veterinary Journal*. 10(4). 617-624.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).(2023). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Version 13.0. Erişim: 23 Mart 2023, https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.0_Breakpoint_Tables.pdf.
- Fan, Y.C., Wang, C.L., Wang, C., Chen, T.C., Chou, C.H., Tsai, H.J. (2016). Incidence and Antimicrobial Susceptibility to *Clostridium perfringens* in Premarket Broilers in Taiwan. *Avian Diseases*. 60(2). 444-9.
- Fathima, S., Hakeem, W.G.A., Shanmugasundaram, R., Selvaraj, R.K. (2022). Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Review on the Pathogen, Pathogenesis, and Prevention. *Microorganisms*. 10(10). 1958.
- Ferreira, M.R.A., Moreira, G.M.S.G., Da Cunha, C.E.P., Mendonça, M., Salvarani, F.M., Moreira, Â.N., Conceição, F.R. (2016). Recombinant Alpha, Beta, and Epsilon toxins of *Clostridium perfringens*: Production strategies and applications as veterinary vaccines. *Toxins*. 8(11). 340.
- Fisher, D.J., Miyamoto, K., Harrison, B., Akimoto, S., Sarker, M.R., McClane, B.A. (2005). Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Molecular Microbiology*. 56 (3). 747–762.
- Food and Drug Administration (FDA). (2022). *2021 summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals*. Erişim: 4 Haziran 2023, <https://www.fda.gov/media/163739/download>

- Freedman, J.C., Shrestha, A., McClane, B.A. (2016). Clostridium perfringens enterotoxin: Action, genetics, and translational applications. *Toxins (Basel)*. 8(3). 73.
- Gad, W., Hauck, R., Krüger, M. and Hafez, H.M. (2012). In vitro determination of antibiotic sensitivities of Clostridium perfringens isolates from layer flocks in Germany. *Archiv für Geflügelkunde*. 76 (4). S. 234–238.
- Gadde, U., Kim, W.H., Oh, S.T. and Lillehoj, H.S. (2017). Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: A review. *Animal Health Research Reviews*. 18(1). 26–45.
- Garmory, H.S., Chanter, N., French, N.P., Bueschel, D., Songer, J.G., Titball, R.W. (2000). Occurrence of Clostridium perfringens beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiology and Infection*. 124 (1). 61-7.
- Gholamiandekhordi, A.R., Ducatelle, R., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F. (2006). Molecular and phenotypical characterization of Clostridium perfringens isolates from poultry flocks with different disease status. *Veterinary Microbiology*. 113 (1). 143-152.
- Gholamiandekhordi, A., Eeckhaut, V., Lanckriet, A., Timbermont, L., Bjerrum, L., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F. (2009). Antimicrobial resistance in Clostridium perfringens isolates from broilers in Belgium. *Veterinary Research Communications*. 33(8). 1031-7.
- Gharaibeh, S., Al Rifai, R., Al-Majali, A. (2010). Molecular typing and antimicrobial susceptibility of Clostridium perfringens from broiler chickens. *Anaerobe*. 16(6). 586-9.
- Gibert, M., Monier, M.N., Ruez, R., Hale, M.L., Stiles, B.G., Benmerah, A., Johannes, L., Lamaze, C., Popoff, M.R. (2011). Endocytosis and toxicity of clostridial binary toxins depend on a clathrin-independent pathway regulated by Rho-GDI. *Cellular Microbiology*. 13(1). 154-170.
- Gohari, I.M., Navarro, M.A., Li, J., Shrestha, A., Uzal, F., McClane, B.A. (2021). Pathogenicity and virulence of Clostridium perfringens. *Virulence*. 12(1). 723-753.
- Grass, J.E., Gould, L.H. and Mahon, B.E. (2013). Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by Clostridium perfringens, United States, 1998–2010. *Foodborne Pathogens disease*. 10 (2). 131–136.
- Granstad, S., Kristoffersen, A.B., Benestad, S.L., Sjurseth, S.K., David, B., Sørensen, L., Fjermedal, A., Edvardsen, D.H., Sanson, G., Løvland, A., Kaldhusdal, M. (2020). Effect of Feed Additives as Alternatives to In-feed Antimicrobials on Production Performance and Intestinal Clostridium perfringens Counts in Broiler Chickens. *Animals (Basel)*. 10(2). 240.
- Grant, K.A., Kenyon, S., Nwafor, I., Plowman, J., Ohai, C., Halford-Maw, R., Peck, M.W., McLauchlin J. (2008). The identification and characterization of Clostridium perfringens by real-time PCR, location of enterotoxin gene, and heat resistance. *Foodborne Pathogens and Disease*. 5(5). 629–639.
- Goetting, V., Lee, K.A. and Tell, L.A. (2011). Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 34 (6). 521-56.
- Grave, K., Jensen, V.F., Odensvik, K., Wierup, M., Bangen, M. (2006). Usage of veterinary therapeutic antimicrobials in Denmark, Norway and Sweden following termination of antimicrobial growth promoter use. *Preventive veterinary medicine*. 75(1-2). 123-32.

- Gu, C., Lillehoj, H.S., Sun, Z., Lee, Y., Zhao, H., Xianyu, Z., Yan, X., Wang, Y., Lin, S., Liu L., Li, C. (2019). Characterization of Virulent netB+/tpeL+Clostridium perfringens Strains from Necrotic Enteritis-Affected Broiler Chicken Farms. *Avian Diseases*. 63(3). 461-467.
- Guttenberg, G., Hornei, S., Jank, T., Schwan, C., Lü, W., Einsle, O., Papatheodorou, P., Aktories, K. (2012). Molecular characteristics of Clostridium perfringens TpeL toxin and consequences of mono-O-GlcNAcylation of Ras in living cells. *Journal of Biology Chemistry*. 287 (30). 24929–24940.
- Hafez, H.M. (2011). Enteric Diseases of Poultry with Special Attention to Clostridium perfringens. *Pakistan Veterinary journal*. 31(3). 175-184.
- Haider, Z., Ali, T., Ullah, A., Basit, A., Tahir, H., Tariq, H., Ilyas, S.Z., Hayat, Z., Rehman, S.U. (2022). Isolation, toxinotyping and antimicrobial susceptibility testing of Clostridium perfringens isolated from Pakistan poultry. *Anaerobe*. 73. 102499.
- Hamouda, A.S., Amer, M.M., Abd El-F. Mohamed, A., Sherin Said, A. and Merati, R. (2011). Experimental induction of subclinical necrotic enteritis using C. perfringens field isolate in male layer chickens. *Veterinary Medical Journal (Giza)*. 59 (3). 363–383.
- Heikinheimo, A., Korkeala, H. (2005). Multiplex PCR assay for toxinotyping Clostridium perfringens isolates obtained from Finnish broiler chickens. *Letters in applied microbiology*. 40 (6). 407-411.
- Hofshagen, M. and Stenwig, H. (1992). Toxin production by Clostridium perfringens isolated from broiler chickens and capercaillies (Tetrao urogallus) with and without necrotizing enteritis. *Avian Diseases*. 36(4). 837–843.
- Hosny, R.A., Gaber, A.F. and Sorour, H.K. (2021). Bacteriophage mediated control of necrotic enteritis caused by C. perfringens in broiler chickens. *Veterinary Research Communications*. 45(4). 409–421.
- Huycke, M.M., Sahm, D.F. and Gilmore, M.S. (1998). Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging infectious diseases*. 4(2). 239-49.
- Johansson, A., Greko, C., Engström, B.E., Karlsson, M. (2004). Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of Clostridium perfringens from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Veterinary Microbiology*. 99(3-4). 251-7.
- Johansson, K.R., Sarles, W.B. (1948). Bacterial population changes in the ceca of young chickens infected with Eimeria tenella. *Journal of Bacteriology*. 56(5). 635–647.
- Kalender, H., Ertaş, H.B. (2005). Isolation of Clostridium perfringens from chickens and detection of the alpha toxin gene by polymerase chain reaction (PCR). *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*. 29 (3). 847-851.
- Karagülle, B. (2016). *Broyler'lerden Clostridium perfringens İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu*. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim dalı Elazığ.
- Katalani, C., Ahmadian, G., Nematzadeh, G., Amani, J., Ehsani, P., Razmyar, J. and Kiani, G. (2020). Immunization with oral and parenteral subunit chimeric vaccine candidate confers protection against necrotic enteritis in chickens. *Vaccine*. 38(46). 7284–7291.
- Kather, E.J., Marks, S.L., Foley, J.E. (2006). Determination of the prevalence of antimicrobial resistance genes in canine Clostridium perfringens isolates. *Veterinary Microbiology*. 113 (1-2). 97-101.

- Keyburn, A.L., Bannam, T.L., Moore, R.J. and Rood, J.I. (2010). NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins*. 2(7). 1913–1927.
- Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J.I., Moore, R.J. (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens*. 4(2). e26.
- Keyburn, A.L., Portela, R.W., Ford, M.E., Bannam, T.L., Yan, X.X., Rood, J.I. and Moore, R.J. (2013a). Maternal immunization with vaccines containing recombinant NetB toxin partially protects progeny chickens from necrotic enteritis. *Veterinary Research*. 44(1). 108.
- Keyburn, A.L., Portela, R.W., Sproat, K., Ford, M.E., Bannam, T.L., Yan, X., Rood, J.I. and Moore, R.J. (2013b). Vaccination with recombinant NetB toxin partially protects broiler chickens from necrotic enteritis. *Veterinary Research*. 44(1). 54.
- Kim, G., Seo, Y.M., Kim, C.H. and Paik, I.K. (2011). Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poultry Science*. 90. 75–82.
- Kiu, R., Brown, J., Bedwell, H., Leclaire, C., Caim, S., Pickard, D., Dougan, G., Dixon, R.A., Hall, L.J. (2019). Genomic analysis on broiler-associated *Clostridium perfringens* strains and exploratory caecal microbiome investigation reveals key factors linked to poultry necrotic enteritis. *Animal Microbiome*. 1.12.
- Kiu, R. and Hall, L.J. (2018). An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerging microbes infections*. 7(1). 141.
- Knapp, O., Maier, E., Benz, R., Geny, B., Popoff, M.R. (2009). Identification of the channel-forming domain of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin (ETX). *Biochimica et biophysica acta*. 1788(12). 2584-2593.
- Kohanski, M.A.; Dwyer, D.J.; Collins, J.J (2010). How Antibiotics Kill Bacteria: From Targets to Networks. *Nature Reviews Microbiology*. 8(6). 423–435.
- Kowalska-Krochmal, B. and Dudek-Wicher R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*. 10 (2). 165.
- Kumar, N.P., Kumar, N.V., Karthik, A. (2019). Molecular detection and characterization of *Clostridium perfringens* toxin genes causing necrotic enteritis in broiler chickens. *Tropical animal health and production*. 51(6).1559–1569.
- Lacey, J.A., Johanesen, P.A., Lyras, D. and Moore, R.J. (2016). Genomic diversity of necrotic enteritis-associated strains of *Clostridium perfringens*: a review. *Avian Pathology*. 45(3). 302-307.
- Lacey, J.A., Keyburn, A.L., Ford, M.E., Portela, R.W., Johanesen, P.A, Lyras D, Moore, R.J. (2017). Conjugation-mediated horizontal gene transfer of *Clostridium perfringens* plasmids in the chicken gastrointestinal tract results in the formation of new virulent strains. *Applied and environmental microbiology*. 83(24). e01814-17.
- Lakshmi, R., Nusrin, K.S., Ann, G.S. and Sreelakshmi, K.S. (2014). Role of Beta-Lactamases in Antibiotic Resistance: Review. *International Research Journal of Pharmacy*. 5 (2). 37–40.
- Landoni MF, Albarellos G. (2015). The use of antimicrobial agents in broiler chickens. *Veterinary Journal*. 205(1). 21-7.
- Lebrun, M., Filee, P., Mousset, B., Desmecht, D., Galleni, M., Mainil, J. G. and A. Linden. (2007). The expression of *Clostridium perfringens* consensus Beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome. *Veterinary Microbiology*. 120. 51–157.

- Lee, Y., Kim, W.H., k, S.J. and Lillehoj, H.S. (2018). Detection of chicken interleukin-10 production in intestinal epithelial cells and necrotic enteritis induced by *Clostridium perfringens* using capture ELISA. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 204. 52–58.
- Lee, K.W., Lillehoj, H.S., Jeong, W., Jeoung, H.Y. and An, D.J. (2011). Avian necrotic enteritis: Experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. *Poultry Science*. 90. 1381–1390.
- Lepp, D., Gong, J., Songer, J.G., Boerlin, P., Parreira, V.R., Prescott, J.F. (2013). Identification of accessory genome regions in poultry *Clostridium perfringens* isolates carrying the netB plasmid. *Journal of Bacteriology*. 95(6). 1152–1166.
- Lepp, D., Roxas, B., Parreira, V.R., Marri, P.R., Rosey, E.L., Gong, J., Songer, J.G., Vedantam, G., Prescott, J.F. (2010). Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. *PLoS One*. 5(5). e10795.
- Lepp, D., Zhou, Y., Ojha, S., Mehdizadeh Gohari, I., Carere, J., Yang, C., Prescott, J.F., Gong, J. (2021). *Clostridium perfringens* Produces an Adhesive Pilus Required for the Pathogenesis of Necrotic Enteritis in Poultry. *Journal of Bacteriology*. 203(7). e00578-20.
- Li, J., Adams, V., Bannam, T.L., Miyamoto, K., Garcia, J.P., Uzal, F.A., Rood, J.I., McClane, B.A. (2013). Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiology and molecular biology reviews*. 77(2). 208–33.
- Li, J., Zhou, Y., Yang, D., Zhang, S., Sun, Z., Wang, Y., Wang, S., Wu, C. (2020). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* in chickens and pigs from Beijing and Shanxi, China. *Veterinary Microbiology*. 252. 108932.
- Lucey, B.P. and Hutchins, G.M. (2004). William, H. Welch, MD, and the discovery of *Bacillus welchii*. *Archives of Pathology Laboratory Medicine*. 128(10). 1193-5.
- 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., Monnet, D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*. 18(3). 268–281.
- Mak, P.H.W., Rehman, M.A., Kiarie, E.G., Topp, E., Diarra, M.S. (2022). Production systems and important antimicrobial resistant-pathogenic bacteria in poultry: a review. *Journal of animal science and biotechnology*. 13(1). 148.
- Martel, A., Devriese, L.A., Cauwerts, K., De Gussem, K., Decostere, A., Haesebrouck, F. (2004). Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathology*. 33(1). 3-7.
- Martin, T.G. and Smyth, J.A. (2009). Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. *Veterinary Microbiology*. 136(1-2). 202–205.
- Martin, T.G. and Smyth, J.A. (2010). The ability of disease and non-disease producing strains of *Clostridium perfringens* from chickens to adhere to extracellular matrix molecules and Caco-2 cells. *Anaerobe*. 16. 533–539.
- Meer, R.R. and Songer, J.G. (1997). Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *American journal of veterinary research*. 58(7). 702–705.

- Miller, R.W., Skinner, J., Sulakvelidze, A., Mathis, G.F. and Hofacre, C.L. (2010). Bacteriophage therapy for control of necrotic enteritis of broiler chickens experimentally infected with *Clostridium perfringens*. *Avian Diseases*. 54(1). 33–40.
- Miyamoto, K., Wen, Q. and McClane, B.A. (2004). Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type A carrying a chromosomal enterotoxin gene (*cpe*) locus, a plasmid *cpe* locus with an IS1470-like sequence, or a plasmid *cpe* locus with an IS1151 sequence. *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (4). 1552-1558.
- Mohiuddin, M., Iqbal, Z., Siddique, A., Liao, S., Salamat, M.K.F., Qi, N., Din, A.M., Sun, M. (2020). “Prevalence, Genotypic and Phenotypic Characterization and Antibiotic Resistance Profile of *Clostridium perfringens* Type A and D Isolated from Feces of Sheep (*Ovis aries*) and Goats (*Capra hircus*) in Punjab, Pakistan”, *Toxins (Basel)*. 12 (10). 657.
- Moore, R.J. (2016). Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens. *Avian Pathology*. 45(3). 275-281.
- M'Sadeq, S.A., Wu, S., Swick, R.A., Choct, M. (2015). Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. *Animal Nutrition*. 1(1). 1-11.
- Mund, M.D., Khan, U.H., Tahir, U., Mustafa, B.H. & Fayyaz, A. (2017). Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review. *International Journal of Food Properties*, 20 (7). 1433-1446.
- Mwangi, S., Timmons J., Fitz-Coy, S., Parveen, S. (2019). Characterization of *Clostridium perfringens* recovered from broiler chicken affected by necrotic enteritis. *Poultry Science*. 98(1). 128-135.
- Nagahama, M., Ochi, S., Oda, M., Miyamoto, K., Takehara, M., Kobayashi, K. (2015). Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Toxins*. 7(2). 396-406.
- Nagy, E., Boyanova, L. and Justesen, U.S. (2018). ESCMID Study Group of Anaerobic Infections. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories. *Clinical microbiology and infection*. 24 (11). 1139-1148.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*. 289 (5481). 920-30.
- Paredes-Sabja, D., Sarker, N. and Sarker, M.R. (2011). *Clostridium perfringens* tpeL is expressed during sporulation. *Microbial Pathogenesis*. 51 (5). 384–388.
- Park, J.Y., Kim, S., Oh, J.Y., Kim, H.R., Jang, I., Lee, H.S. Kwon, Y.K. (2015). Characterization of *Clostridium perfringens* isolates obtained from 2010 to 2012 from chickens with necrotic enteritis in Korea. *Poultry Science*. 94(6). 1158-1164.
- Park, M., Rafii, F. (2017). Exposure to β -lactams results in the alteration of penicillin-binding proteins in *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*. 45:78-85.
- Park, M., Rafii, F. (2019). The prevalence of plasmid-coded *cpe* enterotoxin, β 2 toxin, tpeL toxin, and tetracycline resistance in *Clostridium perfringens* strains isolated from different sources. *Anaerobe*. 56. 124-129.
- Petit, L., Gilbert, M., Popoff, M. (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology*. 7(3).104 –110.
- Pham, V.H., Kan, L., Huang, J., Geng, Y., Zhen,W., Guo, Y., Abbas,W. and Wang, Z. (2020). Dietary encapsulated essential oils and organic acids mixture improves gut health in broiler chickens challenged with necrotic enteritis. *Journal of animal science and biotechnology*. 11. 1–18.

- Prescott, J.F., Parreira, V.R., Mehdizadeh Gohari, I., Lepp, D., Gong, J. (2016). The pathogenesis of necrotic enteritis in chickens: what we know and what we need to know: a review. *Avian Pathology*. 45(3). 288-94.
- Porter, R.E. Jr. (1998). Bacterial enteritides of poultry. *Poult Science*. 77(8). 1159-65.
- Rachid, M. (2020). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from broiler chickens with necrotic enteritis in tiaret, western algeria. *Bionature*. 40 (1). 9-16.
- Revitt-Mills, S.A., Rood, J.I., Adams, V. (2015). *Clostridium perfringens* extracellular toxins and enzymes: 20 and counting. *Microbiology Australia*. 36(3). 114–117.
- Rood, J.I., Adams, V., Lacey, J., Lyras, D., McClane, B.A., Melville, S.B., Moore, R.J., Popoff, M.R., Sarker, M.R., Songer, J.G., Uzal, F.A., Van Immerseel, F. (2018). Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*. 53. 5-10.
- Rood, J.I., Keyburn, A.L., Moore, R.J. (2016). NetB and necrotic enteritis: The hole movable story. *Avian Pathology*. 45(3). 295–301.
- Sakurai, J., Nagahama, M., Oda, M. (2004). *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. *Journal of Biochemistry*. 136(5). 569–74.
- Sakurai, J., Nagahama, M., Oda, M., Tsuge, H., Kobayashi, K. (2009). *Clostridium perfringens* Iota-Toxin: Structure and Function. *Toxins*. 1(12). 208-228.
- Shaaban, A., A Zoulfakar, S., I Youssef, Y. and Shalaby, B. (2017). The incidence of *C. perfringens* in chickens in different seasons and Governorates in Egypt. *Journal of Veterinary Medical Research*. 24 (1). 12-20.
- Shane, S. (2004). Update on the poultry disease situation in the USA-Significant disease outbreaks in recent years. Overall, the health status is good but there is no room for complacency. *Poultry International*. 43.10–15.
- Shanmugasundaram, R., Markazi, A., Mortada, M., Ng, T.T., Applegate, T.J., Bielke, L.R., Syed, B., Pender, C.M., Curry, S. and Murugesan, G.R. (2020). Research Note: Effect of symbiotic supplementation on caecal *Clostridium perfringens* load in broiler chickens with different necrotic enteritis challenge models. *Poultry Science*. 99(5). 2452–2458.
- Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S., Hayashi, H. (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. 99(2). 996–1001.
- Shojadoost, B., Peighambari, S.M. and Nikpiran, H. (2010). Isolation, identification, and antimicrobial susceptibility of isolates from acute necrotic enteritis of broiler chickens *Clostridium perfringens*. *International Journal of Veterinary Research*. 4 (3). 147-151.
- Shojadoost, B., Vince, A.R., Prescott, JF. (2012). The successfull experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. *Veterinary Research*. 43(1). 74.
- Silva, R.O., Junior, F.C.F., Marques M.V.R.M., Junior C.A.O., Martins, N.R.S., Lobato, F.C.F. (2014). Genotyping and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from Tinamidae, Cracidae and Ramphastidae species in Brazil. *Ciência Rural*. 44 (3).
- Silva, R.O., Salvarani, F.M., Assis, R.A., Martins, N.R., Pires, P.S., Lobato, F.C. (2009). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40 (2). 262-4.

- Slavić, D., Boerlin, P., Fabri, M., Klotins, K.C., Zoethout, J.K., Weir, P.E., Bateman, D. (2011). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 75 (2). 89-97.
- Songer, J.G. (1996). Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*. 9(2). 216–34.
- Stiles, B.G, Barth, G., Barth, H., Popoff, MR. (2013). *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin: A Malevolent Molecule for Animals and Man?. *Toxins*. 5(11). 2138-2160.
- Svobodova, I., Steinhäuserová, I. and Nebola, M. (2007). Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens in Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*. 76. 25–30.
- Tansuphasiri, U., Matra, W., Sangsuk, L. (2005). Antimicrobial resistance among *Clostridium perfringens* isolated from various sources in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 36 (4). 954-961.
- Thi, T.N., Vu-Khac, H., Duc, T.N. (2021). Characterisation of *Clostridium perfringens* isolated from chickens in Vietnam. *Veterinarni Medicina*. 66 (10): 431–439.
- Thomas, P., Arun, T.R., Karthik, K., Berin, P.V., Asok Kumar, M., Sing N., Usharani, J., Palanivelu, M., Gupta, S.K., Dhama, K., Viswas, K.N. (2014). Molecular Characterization and Toxinotyping of a *Clostridium perfringens* Isolate from a Case of Necrotic Enteritis in Indian Kadaknath Fowl. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 9(7). 385-394.
- Thompson, D.R., Parreira, V.R., Kulkarni, R.R. and Prescott, J.F. (2006). Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. *Veterinary Microbiology*. 113(1-2). 25–34.
- Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. and Van Immerseel, F. (2011). Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathology*. 40(4). 341-7.
- To, H., Suzuki, T., Kawahara, F., Uetsuka, K., Nagai, S., Nunoya, T. (2017). Experimental induction of necrotic enteritis in chickens by a netB-positive Japanese isolate of *Clostridium perfringens*. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 79(2):350–358.
- Tresha, A.O., Arif, M., Islam, Sk.S., Haque, A.K.M.Z., Rahman Md.T., Kabir S.M.L. (2021). Investigation of *clostridium perfringens* in small-scale commercial broiler flocks in mymensingh district of Bangladesh. *Veterinary World*. 14 (10). 2809-2816.
- Tuncer, H.İ. (2007). Karma yemlerde kullanımı yasaklanan hormon, antibiyotik, antitoksik ve ilaçlar. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 47 (1), 29- 37.
- Uzal, F.A., Fisher, D.J., Saputo, J., Sayeed, S., McClane, B.A., Songer, G., Trinh, H.T., Fernandez Miyakawa, M.E., Gard, S. (2008). Ulcerative enterocolitis in two goats associated with enterotoxin- and beta2 toxin-positive *Clostridium perfringens* type D. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 20(5). 668-672.
- Uzal, F.A., Freedman, J.C., Shrestha, A., Theoret, J.R., Garcia, J., Awad, M.M., Adams, V., Moore, R.J., Rood, J.I., McClane, B.A. (2014). Towards an understanding of the role of toxins in human and animal disease. *Future Microbiology*. 9(3). 361–377.
- Uzal, F.A., Navarro, M.A., Li, J., Freedman, J.C., Shrestha, A., McClane, B.A. (2018). Comparative Pathogenesis of Enteric Clostridial Infections in Humans and Animals. *Anaerobe*. 53.11-20.
- Uzal, F.A., Vidal, J.E., McClane, B.A., Gurjar, A.A. (2010). *Clostridium perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. *Open Toxinology J*. 2.24-42.

- Vakulenko, S.B. and Mobashery, S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical Microbiology Reviews*. 16 (3). 430-50.
- Van Immerseel, F., Buck, J.D., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathology*. 33(6). 537- 549.
- Van Immerseel, F., Rood, J.I., Moore, R.J., Titball, R.W. (2009). Rethinking our understanding of the Pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends in Microbiology*. 17(1):32-6.
- Vidal, J.E., Shak, J.R., Canizalez-Roman, A. (2015). The CpAL quorum sensing system regulates production of hemolysins CPA and PFO to build *Clostridium perfringens* biofilms. *Infection and Immunity*. 83 (6). 2430–2442.
- Wade, B., Keyburn, A.L., Seemann, T., Rood, J.I., Moore, R.J. (2015). Binding of *Clostridium perfringens* to collagen correlates with the ability to cause necrotic enteritis in chickens. *Veterinary Microbiology*. 180(3-4). 299-303.
- Watkins, K.L., Shryock, T.R., Dearth, R.N., Saif, Y.M. (1997). In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Veterinary Microbiology*. 54(2). 195-200.
- Wei, B., Cha, S.Y., Zhang, J.F., Shang, K., Park, H.C., Kang, J., Lee, K.J., Kang, M., Jang, H.K. (2020). Antimicrobial Susceptibility and Association with Toxin Determinants in *Clostridium perfringens* Isolates from Chickens. *Microorganisms*. 8(11). 1825.
- Wexler, H.M. (1991). Susceptibility testing of anaerobic bacteria: myth, magic, or method? *Clinical Microbiology Reviews*. 4 (4). 470-84.
- Wilde, S., Jiang, Y., Tafoya, A.M., Horsman, J., Yousif, M., Vazquez, L.A. and Roland, K.L. (2019). Salmonella-vectored vaccine delivering three *Clostridium perfringens* antigens protects poultry against necrotic enteritis. *PLoS One*. 14 (2). e0197721.
- Wu, S.B., Rodgers, N. and Choct, M. (2010). Optimized necrotic enteritis model producing clinical and subclinical infection of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Avian Disease*. 54(3). 1058–1065.
- Wu, S., Rodgers, N. and Choct, M. (2011). Real-time PCR assay for *Clostridium perfringens* in broiler chickens in a challenge model of necrotic enteritis. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(3). 1135–1139.
- Yadav, J.P., Das, S.C., Dhaka, P., Vijay, D., Kumar, M., Mukhopadhyay, A.K., Chowdhury, G., Chauhan, P., Singh, R., Dhama, K., Malik, S.V.S., Kumar, A. (2017). Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of *Clostridium perfringens* type A isolates from humans, animals, fish and their environment. *Anaerobe*. 47.120-124.
- Yang, W.Y., Chou, C.H., Wang, C. (2018). Characterization of toxin genes and quantitative analysis of netB in necrotic enteritis (NE)-producing and non-NE-producing *Clostridium perfringens* isolated from chickens. *Anaerobe*. (54).115-120.
- Yu, Q., Lepp, D., Mehdizadeh Gohari, I., Wu, T., Zhou, H., Yin, X., Yu, H., Prescott, J.F., Nie, S., Xie, M. (2017). The Agr-like quorum sensing system is required for pathogenesis of necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* in poultry. *Infection and Immunity*. 85(6). e00975-16.
- Zakeri, B. and Wright G.D. (2008). Chemical biology of tetracycline antibiotics. *Biochemistry and Cell Biology*. 86 (2). 124-36.
- Zaragoza, N.E., Orellana, C.A., Moonen, G.A., Moutafis, G., Marcellin, E. (2019). Vaccine Production to Protect Animals Against Pathogenic Clostridia. *Toxins (Basel)*. 11(9). 525.

Zeng, J., Deng, G., Wang, J., Zhou, J., Liu, X., Xie, Q., Wang, Y. (2011). Potential protective immunogenicity of recombinant *Clostridium perfringens* α - β 2- β 1 fusion toxin in mice, sows and cows. *Vaccine*. 29(33). 5459–5466.



ÖZ GEÇMİŞ

Evrım GENÇ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'nden 05.06.2013 tarihinde mezun oldu. 2013-2017 yılları arasında OMÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Mikrobiyolojisi Yüksek Lisans (Tezli) programını tamamladı. 2017 yılında OMÜ LEE Veterinerlik Mikrobiyolojisi Doktora programına başladı. OMÜ Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı'nda 8.03.2019 tarihinden itibaren Araştırma Görevlisi olarak görev yapan Evrım GENÇ, iyi derecede ingilizce bilmektedir.

Temel ilgi alanları: Müzik, Resim.

12.06.2023

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-6405-6076

Yüksek Lisans Tezi

Sığırlardan toplanan kenelerde lyme hastalığının etkeni *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*) varlığının moleküler tanı yöntemleriyle belirlenmesi. Haziran / 2017.

Yayınlar:

1. Genç E., Serdar G., Kılıçoğlu Y., Genç O. (2022). "Milk Non-Enzymatic Immunofiltration Assay mNERIFA An Alternative Rapid Bovine Milk Test for Anti-Brucella Antibody Detection," *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, vol. 28, no. 4, pp. 431–436.
2. Genç O., Serdar G., Büyüktanır Yaş Ö., Genç E. (2019). "Monitoring of the immune response to B abortus S19 conjunctival vaccine in cattle" *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, vol. 66, no. 1, pp. 53–58.
3. Yavuz H.H., Genç O., Çenesiz M., Arslan A., Genç E., Çenesiz S. (2017). "Evaluation of total oxidant antioxidant capacity and ceruloplasmin levels in horses with inflammatory airway disease" *Acta Scientiae Veterinariae*, vol. 45, no. 1518.

Kongre Bildirileri

Sözlü Bildiri

1. **Genç E.**, Topal G., Genç O., Büyüktanır Yaş Ö. (2023). The use of microsensors in diagnosis: An example of aptamer. *5nd International food, agriculture and veterinary sciences congress* (Tam metin bildiri).
2. Sharif M.S., **Genç E.**, Büyüktanır Yaş Ö., Genç O.(2023). Advances in milk based serological techniques for the screening of bovine brucellosis. *5nd International food, agriculture and veterinary sciences congress* (Tam metin bildiri).
3. **Genç E.**, Genç O. (2022). Broylerlerde *Clostridium perfringens* İzolasyonu, Toksin Genotiplendirmesi ve Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması. *XV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi Uluslararası Katılımlı* (Özet bildiri).
4. Genç O., Büyüktanır Yaş Ö., Yurdusev N., **Genç E.** (2016). Studies with non enzymatic rapid immunofiltration assay NERIFA model as alternative to detect anti Brucella antibodies in different species. *International Congress on Veterinary and Animal Sciences* (Özet Bildiri).

Poster Bildiri

1. Sharif M.S., **Genç E.**, Waqas M., Shahid S., Genç O. (2023). Review of the accurate and rapid serological detection methods of bovine brucellosis. *International Conference on – Health Security (ICHS)* (Özet Bildiri)
2. **Genç E.**, Kılıçoğlu Y., Büyüktanır Yaş Ö., Genç O. (2022). Anti-Brusella Antikor Tespit Testleri İçin Referans Süt Serumları Hazırlanması ve Süt Serumlarının Kantitatif Değerlendirilmesi. *XV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi Uluslararası Katılımlı* (Özet bildiri).
3. **Genç E.**, Serdar G., Kılıçoğlu Y., Genç O. (2021). Evaluation of non-enzymatic rapid immunofiltration assay (nerifa) test for anti-brucella antibody detection in bovine milk samples. *4th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences* (Özet Bildiri).
4. **Genç E.**, Büyüktanır Yaş Ö. (2021). Molecular detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* collected from cattle in Turkey. *4th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences* (Özet Bildiri).
5. Genç O., Kılıçoğlu Y., Karabak B.E., **Genç E.**, Serdar G., Büyüktanır Yaş Ö. (2018). Enterotoksemi şüpheli olgulardan *C. perfringens* toksin tiplerinin moleküler

ve serolojik yöntemler ile araştırılması. *2nd International Congress of Veterinary Microbiology* (Özet Bildiri).

6. Genç O., Serdar G., Büyüktanır Yaş Ö., **Genç E.** (2016). Development and validation of sandwich quantitative ELISA prototype for bovine IFNg detection. *International Congress on Veterinary and Animal Sciences* (Özet Bildiri).

7. **Genç E.**, Açıcı M., Genç O., Serdar A., Pal U., Büyüktanır Yaş Ö. (2016). Orta Karadeniz Bölgesinde sığırlardan toplanan kenelerde Lyme Hastalığının etkeni *Borrelia burgdorferi sensu lato* varlığının *fla* geni ile *rr-rrf* intergenik bölgeye dayalı olarak belirlenmesi. *VII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi* (Özet Bildiri).

8. Genç O., Büyüktanır Yaş Ö., **Genç E.**, Solmaz S., Uyanık T., Çelebi Ö., Serdar G. (2015). *B. abortus B. melitensis B. ovis* ve *B. canis* türlerinin tanımlanması ve aşı suşları ayırımı amacıyla modifiye multipleks PZR yöntemi geliştirilmesi ve klinik örneklerle değerlendirilmesi. *6. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi* (Özet Bildiri).

Projeler

TÜBİTAK Projeleri

1. Piliçlerden İzole Edilen *Clostridium perfringens* Tip A Suslarının Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Agar Dilüsyon Yöntemi ile Belirlenmesi (TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı-B Acil Destek Modülü, 2220846, Yürütücü, 2023- Devam ediyor).
2. Sığırlarda Total IgG ve Yenidoğan Buzağı İshallerinde Anti-F5 (K99) Antikor Tespitine Yönelik Elisa Prototipleri Geliştirilmesi ve Validasyon Çalışmaları (TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı-A Hızlı Destek Modülü, 1220815, Araştırmacı, 2022-Devam ediyor)

BAP Projeleri

1. Broyler'lerde *Clostridium perfringens* izolatlarının moleküler tiplendirme ile prevalansın ve önemli virülens özelliklerin araştırılması ve antibiyotik duyarlılıklarının tespiti (PYO.VET.1904.20.024, Araştırmacı).
2. Aşı, antijen ve immun serum hazırlanması amacıyla *Clostridium perfringens* izolatlarının multiplex PCR ile tiplendirilmesi, tiplendirilen izolatlardan beta ve epsilon toksinlerin farklı yöntemlerle ekstraksiyonları ve bu toksinlerin Western

Blotting ile belirlenmesi ve konsantrasyon tayini (PYO. VET.1901.17.004, Araştırmacı)

3. Sığırlardan toplanan kenelerde Lyme hastalığının etkeni *Borrelia burgdorferi sensu lato* kompleksine ait türlerin RFLP yöntemi ile moleküler tiplendirilmesi (PYO.VET.1901.17.018, Araştırmacı)

4. Sığırlardan toplanan kenelerde Lyme hastalığının etkeni *Borrelia burgdorferi* varlığının moleküler tanı yöntemleriyle belirlenmesi (PYO.VET.1904.16.010, Araştırmacı).

Sertifika:

1. *Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası*. 2022.
2. *Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Sekans Analizi*. 2020.
3. *HACCP ve ISO 22000 Gıda ve Yem Güvenliği Yönetim Sistemi*. 2013.
4. *Sığırlarda Recto-Vaginal Metotla Suni Tohumlama*. 2013.

Katılım Belgesi:

1. *I. Hücre Kültüründe Temel Uygulamalar Eğitimi*. 2021.
2. *Biorisk Yönetimi Temel Eğitimi*. 2020.