

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAYSERİ YÖRESİNDE SÜT SIĞIRLARINDA
ESCHERİCHİA COLİ O157:H7’NİN KONVANSİYONEL VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Ayşegül YONTAR**

**Tezi Yöneten
Prof.Dr.Fuat AYDIN**

**Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Eylül 2009
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAYSERİ YÖRESİNDE SÜT SIĞIRLARINDA
ESCHERİCHİA COLİ O157:H7’NİN KONVANSİYONEL VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Ayşegül YONTAR**

**Tezi Yöneten
Prof.Dr.Fuat AYDIN**

**Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
SBT-06-24 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Eylül 2009
KAYSERİ**

Prof.Dr.Fuat AYDIN danışmanlığında **Ayşegül YONTAR** tarafından hazırlanan “**Kayseri Yöresinde Süt Sığırlarında *Escherichia coli* O157:H7’nin Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Mikrobiyoloji** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

28/08/2009

JÜRİ

Başkan : Prof.Dr.Hüseyin KILIÇ

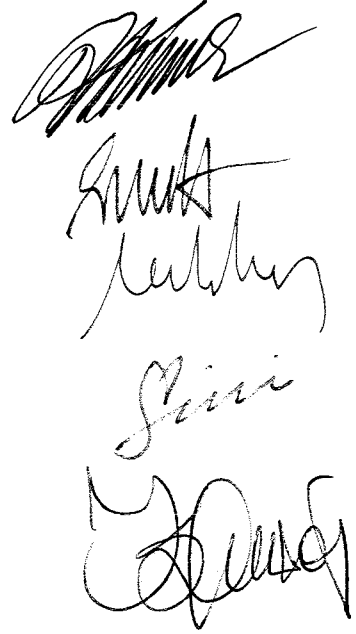
Üye : Prof.Dr.Fuat AYDIN (Danışman)

Üye : Prof.Dr.Mehmet AKAN

Üye : Prof.Dr.Abdullah İNCİ

Üye : Yrd.Doç.Dr.K.Semih GÜMÜŞSOY

İmza

**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez süresince verdiği desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yaptığım deneysel çalışmalara katkıları ve sağladığı her türlü kolaylık ve gösterdiği anlayış nedeni ile Prof.Dr. Fuat AYDIN'a, tez çalışmamın bütün aşamalarında yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Tuba İÇA'ya ve Araş. Gör. Dr. Nurhan ERTAŞ'a en başından beri tez çalışmamın her aşamasında emeği bulunan, hiçbir zaman yardımlarını ve desteğini esirgemeyen bana maddi ve manevi her türlü desteği veren aileme ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

KAYSERİ YÖRESİNDE SÜT SIĞIRLARINDA *ESCHERİCHİA COLI* O157:H7'NİN KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada, Kayseri ili ve ilçelerindeki kamu ve özel sektöre ait süt işletmelerindeki çeşitli yaş gruplarındaki sağlıklı hayvanların dışkı ve sütlerinde *E. coli* O157:H7'nin varlığının saptanması ve hayvansal risk faktörlerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Bu amaçla çeşitli ilçelerden toplanan 500 adet dışkı ve 500 adet süt örnekleri çalışmada materyal olarak kullanıldı. Immuno Magnetik Seperasyon ve ardından Chorom agar ve Sorbitol MacConkey (SMAC) agara ekim yapıldı. Bu besiyerlerinde üreyen şüpheli koloniler seçildi ve bunlar serolojik yönden H ve O agglütinasyon testi ile incelendi. Moleküler yönden ise şüpheli isolatlar multipleks PCR (mPCR) ve unipleks PCR (uPCR) teknikleri ile incelendi. Bu işlemleri sonucunda 500 süt örneğinden 1 (% 2)'inde ve 500 dışkı örneğinden 6 (% 4,6)'sında O157:NM suşu tespit edilmiş olup örneklerin hiçbirinde flagella H antijenine rastlanmadı. Dışkıdan izole edilen O157:NM suşlarına yapılan mPCR'da bir örnekte Enterohemolisin genine (*Ehly A*) rastlanırken, 1 örnekte yalnızca Sitotoksin 2 (*stx2*) geni tespit edildi. Diğer dışkı örneklerinde virülens genlerinden hiçbirisine rastlanmadı. Sütten izole edilen bir adet O157:NM suşunda ise virülens genlerinden hiçbirisine rastlanmadı.

Sonuç olarak, Kayseri ili ve ilçelerindeki işletmelerdeki süt sığırlarının dışkısında ve sütlerinde *E. coli* O157 belirlenmiştir. Belirlenen kontaminasyon oranının düşük düzeylerde olduğunu, bununla birlikte Kayseri ilinde hijyen kurallarına dikkat edilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler : Sığır dışkısı, çiğ süt, *E. coli* O157: H7, IMS, PCR

**INVESTIGATION WITH CONVENTIONAL AND MOLECULAR METHOD OF
ESCHERICHIA COLI O157:H7 IN DAIRY CATTLE IN KAYSERİ REGION**

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the animal risk factors related to the presence of *E. coli* O157:H7 in feces and milk samples from healthy cattle with various ages collected from private and government dairy farms in Kayseri and vicinity.

Five hundred fecal samples and 500 raw milk samples were collected from different locations of Kayseri, processed through immune Magnetic Separation and inoculated Chorom medium and Sorbitol MacConkey medium. Suspicious colonies were selected from this medium and they were examined serological aspect with H and O agglutination test. The molecular direction suspicious isolates were examined multiplex with PCR (mPCR) and unipleksPCR (uPCR) techniques. The examination showed that only 1 (2 %) out of 500 raw milk samples and only 6 (4.6%) out of 500 fecal samples contained O157:NM strain, and none of the samples contained flagella H antigen. Through using mPCR, only one sample from O157:NM of isolated fecal samples contained Ehly A, whereas only one sample contained stx2 genes. None of the other fecal samples contained any virulence genes. Only one raw milk sample isolated from O157:NM strain did not have any virulence genes.

In conclusion, the raw milk and fecal samples collected from dairy farms in Kayseri region and its vicinity contain *E. coli* O157. Low levels of contamination rate was determined in the samples. However it was concluded that attention should be hygiene rules in Kayseri.

Key Words: Cattle feces, raw milk, *E. coli* O157:H7, IMS, PCR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	I
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
KISALTMALAR	IX
TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ	XII
 1. GİRİŞ VE AMAÇ	 1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ETİYOLOJİ.....	3
2.2. <i>E. COLI</i> ALT TİPLERİ.....	6
2.2.1. Enterotoksijenik <i>E. coli</i>	7
2.2.2. Enteroinvasif <i>E. coli</i>	8
2.2.3. Enteropatojenik <i>E. coli</i>	8
2.2.4. Enteroagregatif <i>E. coli</i>	9
2.2.5. Difüz Adherent <i>E. coli</i>	10
2.2.6. Enterohemorajik <i>E. coli</i>	10
2.3. <i>E. COLI</i> O157:H7	13
2.4. <i>E. COLI</i> O157:H7 BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	13
2.5. <i>E. COLI</i> O157:H7 PATOJENİTESİ VE VİRULENS FAKTÖRLER.....	15
2.5.1. Shiga Like Toksin I... ..	16
2.5.2. Shiga Like Toksin II.....	16
2.5.3. İntimin	17
2.5.4. pO157	17
2.5.5. Tip III Sekresyon Sistemi	17
2.5.6. Somatik antijen	18

	<u>Sayfa no</u>
2.6.E.COLI O157:H7 GENOM HARİTASI VE PATOJENİTE ADALARI	18
2.7. E.COLI O157:H7 'NİN KAYNAĞI VE EPİDEMİYOLOJİSİ.....	19
2.7.1. Dışkı	20
2.7.2.Süt	21
2.7.3. Yem	21
2.7.4. Su	22
2.7.5 Diğer Bulaşma Kaynakları.....	22
2.8. E. COLI O157:H7'NİN YAPTIĞI HASTALIKLAR	24
2.9 E. COLI O157:H7'NİN TEŞHİS YÖNTEMLERİ.....	25
2.9.1.Kültürel-Biyokimyasal Yöntemler	26
2.9.2. Serolojik Yöntemler	31
2.9.3.Moleküler Yöntemler	31
2.9.3.1.PCR Modifikasyonları.....	32
2.9.3.2.RT-PCR.....	33
2.9.3.3.Multiplex PCR	33
2.9.3.4.Real-time PCR	33
2.9.4.Genotiplendirme	34
2.9.4.1.Genotiplendirmede kullanılan yöntemler.....	34
2.10. E. COLI O157:H7 SAĞALTIMI.....	35
2.11. E.COLI O157:H7 ENFEKSİYONUNUN KONTROLÜ VE ÖNLEME YOLLARI	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1. GEREÇ.....	38
3.1.1.Numuneler.....	38
3.1.2.Besi yerleri	39
3.1.3 Testlerde Kullanılan Solüsyon ve Tampon Sıvılar.....	40
3.1.4 Testlerde Kullanılan Cihaz Ekipmanlar	41

	<u>Sayfa no</u>
3.2. YÖNTEM.....	44
3.2.1.Ön zenginleştirme ve İmunomanyetik Seperasyon	45
3.2.2 Latex Aglütinasyon Testi	46
3.2.2.1.O antiserumu ile latex aglütinasyon testi	46
3.2.2.2.H antiserumu ile latex aglütinasyon testi	47
3.2.3.Moleküler İdentifikasyon	48
3.2.3.1.DNA Ekstraksiyonu.....	48
3.2.3.2.Multipleks PCR.....	48
3.2.3.3.Unipleks PCR.....	48
3.2.3.3.1.FliC	48
3.2.3.3.2.EhlyA	49
3.3.Agaroz Jel Elektroforezi.....	49
4.BULGULAR	50
4.1.CT-SMAC Agar ve CHROM Agar Ekim Sonuçları	50
4.2. LATEKS AGLÜTİNASYON TESTİ	51
4.2.1. O antiserumu ile latex aglütinasyon testi	51
4.2.2. H antiserumu ile latex aglütinasyon testi	51
4.3.MULTİPLEKS PCR SONUÇLARI.....	51
4.4. UNİPLEKS PCR SONUÇLARI.....	53
4.5.SIĞIR DIŞKI VE SÜTLERİNDEKİ NUMUNELERİNDEKİ <i>E.COLI</i> O157:H7 VE VİRULENS GENLERİN SUŞLAR ARASINDAKİ DAĞILIMI.....	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	55
6. KAYNAKLAR	61
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

Ab-DEFT	:Antikor-direkt epifluoressan filtre tekniği
AFLP	:Amplified fragment lenght polymorphism
A/E	:Attaching and effacent
BCIG	:5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide
Bfp	:Bundle forming pilus
β -GUR	:Beta glukorinidaz
Bp	:Basepare
$^{\circ}\text{C}$	:Santigrat derece
CMAC	:Sellobiyozlu MacConkey
CR-SMAC	:Cefixime-Rhamnose katkılı sorbitol MacConkey
CT-SMAC	:Cefixime-Tellurite katkılı sorbitol MacConkey
DAEC	:Diffuz-adhering <i>E.coli</i>
DNA	:Deoksiribonükleik asit
cDNA	:Complementer DNA
DPCR	:Direk PCR
EAggEC	:Entero-agregatif <i>E.coli</i>
EAST	:Enteroagregatif stabil toksin
EHEC	:Enterohemorajik <i>E.coli</i>
EhlyA	:Enterohemolizin
EIEC	:Enteroinvazif <i>E.coli</i>
EPEC	:Enteropatojenik <i>E.coli</i>
ETEC	:Enterotoksijenik <i>E.coli</i>
EIA	:Enzim immunoassay
ELISA	:Enzim Linked Immun Sorbent Assay
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EspA	: <i>E.coli</i> secreted-proteins
EMB	:Eosine Methylen Blue agar
EAF	:EPEC aderens faktörü
FliC	:Flagella

FIA	:Fluorescent immunoassay
Gb ₃	:Glikolipid globotriyoskleramide reseptörü
Gr	:Gram
G	:Gravidity
HC	:Hemorajik Kolitis
HACCP	:Hazard Critical Control Point
H ₂ S	:Hidrojen sülfür
HUS	:Hemolitik Üremik Sendrom
IMS	:Immunomagnetic seperation
Kb	:Kilobaz
KCN	:Potasyum siyanür
LEE	:Locus of enterocyte effacement
LT	:Heat Labile Toksin
MC	:MacConkey agar
mDa	:Mega dalton
mECB	:Modifiye <i>E.coli</i> broth
mL	:Mililitre
MLST	:Multi-locus sequence typing
M-PCR	:Multipleks PCR
MR	:Metil Red
mTSB	:Modifiye tryptone soy broth
MUG	:4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide
NaCl	:Sodyum klorür
PAI	:Patojenite adası
PBS	:Pepton Buffer Solution
PCR	:Polimeraz chain reaktion
PFGE	:Pulsed Field Gel Electroforesis
RAPD	:Randomly amplified polymorphic DNA
Real time PCR	:Gerçek zamanlı PCR
Rep-PCR	:Repetitive -sequence –based PCR

RFLP	:Restriction Fragment Length Polymorphism
RIA	:Radioimmunoassay
RNA	:Ribonükleik asit
RT-PCR	:Reverse Transcriptase PCR
SLT-1	:Shiga-like-toxin 1
SLT-2	:Shiga-like-toxin 2
ST	:Heat Stable Toksin
STEC	:Shiga toksin üreten <i>E.coli</i>
SLTEC	:Shiga benzeri toksin üreten <i>E.coli</i>
TBE	:Tris Borate EDTA Buffer
T3SS	:Tip III sekresyon sistemi
Tir	:Transloke intimin reseptörü
TTP	:Trombotik Trombositopenik Purpura
ml	:Mikrolitre
U-PCR	:Unipleks PCR
VP	:Voges Proskauer VP
VT	:Verotoksin
VTEC	:Verotoksin üreten <i>E.coli</i>

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 2.1	Diyarejenik <i>E. coli</i> suşlarının klasifikasyonu, kısaltmaları ve infeksiyonların temel semptomları 7
Tablo 2.2	<i>E.coli</i> O157:H7 serotipinin biyokimyasal özellikleri 14
Tablo 3.1	Numunelerin Alındığı İşletmeler ve Numune sayısı 39
Tablo 3.2	<i>E.coli</i> O157:H7 suşlarının m-PCR ve u-PCR’ında kullanılan primerlerin dizilimi (Inregrated DNA Technologies Inc. IDT, USA) 43
Tablo 4.1	Sığır dışkı ve sütlerinden izole edilen şüpheli <i>E.coli</i> O157:H7 suşlarına uygulanan m-PCR ve u-PCR sonuçları ve virulens genlerin suşlar arasındaki dağılımı 54
Şekil 2.1	Diyarejenik <i>E.coli</i> suşlarının patogeneiz mekanizmaları 12
Şekil 2.2	Patojenik <i>E. coli.</i> ’de patojenite adasının oluşum modeli 19
Şekil 3.1.	Sığır dışkı ve süt örneklerinde <i>E.coli</i> O157:H7 izolasyon ve identifikasyon protokolü. 45
Şekil 3.2.	İmmunomanyetik seperasyon işlemini (A) ve dynalbead’lerin işlem sonrası mikrosantrifüj tüplerinin çeperindeki görünümü (B) 46
Sekil 4.1	CHROM agarda pozitif (<i>E.coli</i> O157:H7, RHS 232) (A) ve negatif (B) kültürlerin görünümü 51
Sekil 4.2	Sığır dışkı ve süt örneklerinden Chrom agarda <i>E.coli</i> O157:H7 yönünden şüpheli olarak değerlendirilen kolonilerden O antiserumu ile yapılan latex aglütinasyon testi sonuçları 51
Şekil 4.3.	<i>E.coli</i> O157:H7 pozitif kontrol suşu (RHS 232) ve sahadan izole edilen şüpheli suşlara uygulanan m-PCR işlemi. M. Marker, 1-2 pozitif kontrol, 3-4 dışkıdan izole edilen iki adet örnekte <i>rbfO157</i> ve <i>Stx2</i> genlerinin varlığı.....53
Şekil 4.4.	Sahadan izole edilen şüpheli suşlara uygulanan m-PCR sonuçları. M. Marker, 1, 4-7, 4 dışkı ve bir adet süt örneğinde <i>rbfO157</i> geninin varlığı....53
Şekil 4.5.	<i>E.coli</i> O157:H7 pozitif kontrol suşu (RHS 232) ve sahadan izole edilen şüpheli suşlara uygulanan u-PCR işlemi (<i>EhlyA</i>). M. Marker, 1. Pozitif kontrol, 5. Bir dışkı örneğinde <i>EhlyA</i> geninin varlığı. 53

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kayseri ili hayvancılığın yoğun olarak yapıldığı şehirlerimizden birisidir. Hayvancılık Kayseri iş dünyasının ilgisini çeken, yatırım yapılan bir sektör haline gelmiştir. Kayseri iline bağlı 14 ilçe ve iki merkeze ilçede (Akkışla, Bünyan, Develi, Felahiye, Hacılar, İncesu, Özvatan, Pınarbaşı, Sarıoğlan, Sarız, Talas, Tomarza, Yahyalı, Yeşilhisar ile merkeze bağlı Melikgazi, Kocasinan) resmi kayıtlara göre 2007 yılı içerisinde 49.521 ton süt üretilmiştir. Merkez ilçelerde 2007 yılı içerisinde 23.650 ton, Develi’de 6.661 ton, Yeşilhisar ilçesinde 4.123 ton, Pınarbaşı ilçesinde 3.105 ton süt üretimi gerçekleştirilmiştir. Kayseri ilinde 2008 yılı içerisinde faaliyete geçen yeni işletmelerle süt üretim miktarlarında artışlar olmuştur. Türkiye’nin 2007 yılı toplam süt üretimi 10.500.000 ton civarındadır. Temel gıda maddesi olan süt ve süt ürünlerinin tüketim ve muhafaza aşamalarındaki en önemli problemlerden biri sütlerin elde edildiği birinci basamak olan ahırlarda meydana gelebilecek bakteriyel kontaminasyonlardır. Çiğ süt ürünlerine bakterinin bulaşması meme başlarından, sağım makinaları ile, uygun olmayan alet ve ekipman hijyeni, yetersiz pastörizasyon, pastörizasyon sonrası kontaminasyon ile olabilmektedir.

Süt ve süt ürünlerinin kalitelerini olumsuz yönde etkileyen koliform grubu bakteriler besinlerde hijyen indikatörü olarak kabul edilirler. Bu grup bakteriler arasında; *Escherichia coli* (*E. coli*) oldukça önemlidir. *E. coli* insan ve hayvanların bağırsak

sisteminin normal florasıdır. *Escherichia* grubunda çok farklı serotipler bulunmasına rağmen, az sayıda *E. coli* serotipi insan ve hayvanlarda zararlı etki yapar. *E.coli* O157:H7 serotipi bugün gıdalarla insanlara bulaşan patojenler arasında en önemlilerden birisi olarak kabul edilmektedir. *E. coli* O157:H7, süt ineklerinin bağırsak sistemlerinde yaşayabilmekte, buradan dışkı ile sağım ve kesim işlemleri esnasında süte ve ete, toprağa, suya, bitkisel ürünlere ve dolayısı ile her yere bulaşabilmekte ve sonunda insanlara bulaşarak enfeksiyonlara neden olmaktadır. Aynı zamanda işletmelerdeki personel hastalıkların taşınmasında portör görevi üstlenir. Bu nedenle gıda işletmelerinde besine elle teması olan bireyin kişisel temizliğinin, el temizliğinin yapılması, dolayısıyla personelin sanitasyon ve hijyen konusunda eğitilmesi, işletmenin temizliğinin sağlanması, kullanılan alet ve ekipmanın temizliğinin sağlanması enfeksiyonların kontrolü ve halk sağlığı açısından oldukça önemlidir.

Escherichia coli O157:H7 sağlıklı sığırların bağırsaklarında yaşayabilir. *Escherichia coli* O157:H7 enfeksiyonlarında primer rezervuarı sığır olmakla birlikte, koyun, keçi, tavuk, domuz, kedi, köpek ve martılarda da bulunabilir. Etkenin genelde dışkıdaki yaygınlığı % 0-10 arasında değişmekle birlikte bu oranın genç hayvanlarda daha fazladır. Etken sığır dışkısında 5°C’de 70 güne kadar canlılığını koruyabilir.

Escherichia coli O157:H7 ısı işlemine oldukça dirençsiz olmasına rağmen başta yetersiz ısı işlemine tabi tutulan et, süt ve süt ürünleri ile salgınlara ve bireysel enfeksiyonlara neden olmaktadır.

Escherichia coli O157: H7 serotipi enterohemorajik patojen bir mikroorganizmadır. *Escherichia coli* O157: H7 enfeksiyonları, kişisel hijyene yeterince dikkat edilmeyen durumlarda, enfekte olmuş bir kişiden başka bir kişiye kolaylıkla geçebilmektedir. *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarında sıklıkla görülen belirtiler şiddetli kanlı diyare ve abdominal kramplardır. Enfeksiyon aynı zamanda kırmızı kan hücrelerinin yıkımı ile meydana gelen HUS olarak adlandırılan komplikasyonlara da neden olmaktadır. *Escherichia coli* O157: H7 enfeksiyonları çok az ateş olmakta veya hiç ateş olmamakta ve hastalık 3-8 gün içinde iyileşmektedir. Özellikle çocuklar ve yaşlılar en yüksek riski grubu içinde yer almaktadırlar. Hastalıkta ölüm oranı %3-5 arasında değişmektedir.

Bu çalışmada, Kayseri ili ve ilçelerindeki kamu ve özel sektöre ait süt işletmelerindeki çeşitli yaş gruplarındaki sağlıklı hayvanların dışkı ve sütlerinde *E. coli* O157:H7’nin varlığının saptanması ve hayvansal risk faktörlerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *ESCHERICHIA COLI*'NİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Bu bakteri ilk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafından ishalli bir çocuğun dışkılarından izole edilmiş ve *Bacterium coli commune* olarak isimlendirilmiştir (1). Daha sonra, Escherich'in adına itafen, 1919 yılında Castelli ve Calmer tarafından etkene *Escherichia coli* (*E.coli*) adı verilmiştir (2).

Escherichia coli 1950'lerin sonuna kadar fekal kontaminasyonun göstergesi olarak kabul edilmiş olmakla birlikte, insan ve hayvanlarda ölüme yola açan patojen tiplerinin bulunmasıyla *E.coli*'ye bakış açısı değişmiştir (3). Etken; insan ve hayvanların normal bağırsak florasında bulunmakla birlikte, bir çok hastalık vakasından primer veya sekonder etken olarak izole edilmektedir. Bakteri sahip olduğu flagella, kapsül, hücre duvarı, fimbria antijenleri; sentezlediği, kolisinler, enterotoksinler, sitotoksinler, hemolizinler ve aerobactin gibi virülens faktörleriyle hayvan türlerinde değişik patogeneze ile seyreden çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır. Bu hastalıklar arasında çeşitli sepsisemik, üriner sistem enfeksiyonları, enterik enfeksiyonlar ve mastitisler yer almaktadır (4-7).

Escherichia coli, Enterobacteriaceae ailesi içinde yer alan *Escherichia* genusuna bağlı, Gram negatif, aerob ya da fakültatif anaerob, çoğunlukla hareketli, sporsuz 1,1-1,5 x 2,0-6,0 µm boyutlarında, düzgün çomak tarzında bir etkidir (8-10). *E.coli* türlerine bakteri alemi içerisindeki yerine ilişkin bilimsel sınıflandırma aşağıda verilmiştir.

Alem: Bacteria

Bölüm: Proteobacteria

Sınıf: Gamma Proteobacteria

Takım: Enterobacteriales

Aile: Enterobacteriaceae

Cinsi: *Escherichia*

Tür: *E. coli* (11).

E.coli sıcak kanlı hayvanların sindirim sisteminde doğumdan hemen sonra kolonize olabilmektedir (12). Bu bakteri kontamine besinler ve hijyenik kurallara uymayan bireylerden diğer kişilere direk olarak geçebilmektedir (13). Bu mikroorganizma canlıların bağırsağına kolonize olduktan sonra bu bölgenin kalıcı flora üyeleri olarak yaşamına devam eder. Çoğu peritrik flagellalara sahip olup hareketlidir (14). *E. coli*; nutrient agar ve kanlı agar gibi genel besiyerleri ve MacConkey (MC) agar, Eosine Methylen Blue (EMB) agar gibi selektif ve diferansiyel besiyerlerinde 37 °C’de 24 saat içerisinde gözle görülebilir büyüklükte, düzgün kenarlı, S-tipli koloniler meydana getirir. Eski kültürlerde ise R tipli kaba, düzensiz koloniler gözlenebilir. Kapsüllü suşlar ise M tipi mukoid koloniler meydana getirir (15). Optimal üreme ısıları 37 °C olmasına rağmen 20-40 °C’de ve optimal pH’sı 7-7,2 olmasına rağmen pH 5-8’de de üreyebilmektedir (16).

Etken laktozu fermente ettiği için MC agarda pembe renkli koloniler, EMB agarda metalik refle görünümünde koloniler oluşturur. Ayrıca, patojen olan bazı suşları kanlı agarda hemoliz oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu konuda 12-24 saatlik inkubasyon sonucunda homojen bir bulanıklık oluşturarak ürer (9, 13, 17, 18).

E. coli, glukoz, sukroz, laktoz, mannitol gibi bazı karbonhidratları fermente ederek asit ve gaz oluştur. İndol ve Metil Red (MR) testleri pozitif, Voges Proskauer (VP) testi ise negatiftir. Sitratlı besi yerlerinde üremez, üreli besi yerlerinde üreyi kullanamadıkları için üreyemez. Genellikle hidrojen sülfür (H₂S) gazı oluşturmaz, oksidaz negatif olan *E.*

coli, nitratları nitritlere redükte etme yeteneğine de sahiptir. *E.coli* fiziksel ve kimyasal etkenlere karşıda oldukça dayanıklıdır. Su, dışkı, hayvan barınakları gibi doğal koşullarda uzun süre canlılığını koruyabilir, ısı ve soğuğa dayanıklıdır. Dezenfektanlara, bazı boya maddelerine (Malaşit yeşili, Füksin vb.), safra ve safra tuzlarına , %7 NaCl 'e karşı ise duyarlıdır.(8, 9, 17, 19-21,).

Escherichia coli suşları arasındaki serolojik ilişkiler ilk kez 1921 yılında Dodgeon tarafından belirtilmiş, sonra 1937 'de Lowel *E. coli* 'nin kapsül ve somatik olmak üzere 2 çeşit antijeni olduğunu ileri sürmüş, 1943 'de ise Kaufmann flagella antijenini de göstermiştir. 1944'te Kauffmann, *E. coli*'lerin serolojik klasifikasyonu için günümüzde de modifiye edilerek kullanılmakta olan bir şema oluşturmıştır. Modifiye edilen Kauffman şemasına göre, *E. coli*'ler somatik "O" antijenlerine, flagellar "H" antijenlerine ve kapsüller "K" antijenlerine göre serotiplendirilmektedir (10, 11). Buna göre *E. coli*'de O1-O171 arasında gösterilen 165 somatik O antijeni, K1-K90 arasında gösterilen 90 kapsül K antijeni ve H1-H56 arasında gösterilen 56 flagella H antijeni saptanmıştır. En son çalışmalara göre bugün 174 O, 56 H ve 80 K antijeni olduğu bildirilmektedir (9, 21- 23).

Escherichia coli'nin somatik"O" antijenleri lipopolisakkarit özelliğinde olup ısıya dirençli yüzey antijenleridir. Makroaglutinasyon ve mikroaglutinasyon testi ile ortaya konulabilir. Ancak kapsüller ve fimbrial antijenlere sahip *E. coli*'lerde somatik antijenlerin ortaya konulması güçlük yaratmaktadır. Bu nedenle bu tür suşların 120 °C'de 2 saat ısıtıldıktan sonra aglutinasyona tabi tutulması önerilir (9, 12-15).

Flagellar "H" antijenleri hareketli suşlarda bulunur, protein yapısındadır ve ısıya dayanıksız olup aglutinasyonla ortaya konulabilir (9, 15, 17, 19).

Kapsüller"K" antijenleri polisakkarit özelliğinde olan bu antijenik yapı, kapsül taşıyan *E.coli* suşlarında "O" somatik antijenlerinin üzerinde bulunur. Bu nedenle "K" antijeni taşıyan suşlar "O"antiserumları ile aglutine olmazlar."K" antijenlerinin K(A) ve K(B) olmak üzere iki önemli komponenti bulunur. K(A) antijenleri 120°C'de 2 saat içerisinde, K(B) antijenleri ise 100 °C'de tahrip olabilen polisakkarit yapısındaki antijenlerdir (9, 15, 17, 19).

Önceleri “K” antijeninin L fraksiyonu olarak adlandırılan fimbrial antijenler (pilus), protein yapısında olup fimbriya da bulunur. Bu antijenler de “K”antijenleri gibi bir suşun “O” antijenine göre identifiye edilmesini önler. *E.coli*’lerde bulunan bu antijenlerin saptanması, özellikle enteropatojenik *E.coli*’lerin (EPEC) belirlenmesinde önemli rol oynar. Bu piluslar *E.coli*’lerin virulans faktörü olarak kabul edilir (9, 15, 17, 19).

Bunların dışında *E.coli*’ler bakteriyofajlarına göre faj tiplerine ayrılmaktadır. Yine benzer bir sınıflama kolisin tiplerine göre de yapılabilmektedir. Kolisin, antibiyotik etkisi gösteren bir bakteriyosindir. Bu bakteriyosin aynı türden diğer *E.coli*’leri eritici etki yapmaktadır (1)

Escherichia coli’nin antijenik yapısı oldukça karmaşık olup, özellikle patojen suşlarda bu yapılar önem taşımaktadır. *E.coli*’ler de enterotoksin, nörotoksin ve endotoksin gibi çeşitli toksinlerde bulunur. Enterotoksinler genellikle, genç hayvanlarda görülen bağırsak infeksiyonlarından sorumludurlar. Bu toksinlerin stabil toksin (ST) ve labil toksin (LT) olmak üzere iki fraksiyonu bulunur. Stabil toksin ısıya dayanıklı, immunolojik özelliği bulunmayan ve aside dirençli olmayan, proteinazlara duyarlı ST_a ve ST_b olmak üzere iki varyanta sahiptir. Labil toksin ise ısıya duyarlı olup, antijenik yapısı nedeniyle kolera toksinine benzerlik gösterir (24).

Nörotoksinler lipoprotein özelliğinde olup, domuzlarda enterotoksemiye neden olan, ısıya duyarlı toksinlerdir. Endotoksinler ise bütün *E. coli* suşlarında bulunur ve kimyasal olarak protein- fosfolipid-polisakkarit kompleksinden oluşmuş toksinlerdir (9, 20).

2.2. E.COLI ALT TIPLERİ

Günümüzde insan ve hayvanlarda özellikle diyarejenik infeksiyonlara neden olan *E.coli* suşları; virülens özellikleri, patojenite mekanizmaları, ürettikleri toksin tipleri, neden oldukları klinik sendromlar, epidemiyolojileri ve O:H antijenlerine göre; Enteropatojenik (EPEC), enterotoksijenik (ETEC), enteroinvazif (EIEC), enterohemorajik (EHEC), difuz-adhering (DAEC), entero-agregatif (EAggEC) olmak üzere altı ana grup altında toplanmaktadır. Diyareye neden olan serotiplerin bu şekilde kesin bir ayrımı yoktur (1, 7, 25, 26).

Bu gruplara ilave olarak bazı araştırmacılar tarafından verotoksin oluşturanlar (VTEC) ve shiga toksin (STEC) oluşturanlar suşlar şeklinde tanımlanması (27) ve başka gruplarlada ifade edilmesi diyareye neden olan *E. coli* 'lerin enfeksiyon etkeni olarak gruplandırılması konusundaki terminolojiyi karışık bir hale getirmektedir (28).

Tablo 2.1. Diyarejenik *E. coli* suşlarının klasifikasyonu, kısaltmaları ve enfeksiyonların temel semptomları (21).

Diyarejenik <i>E.coli</i> suşlarının klasifikasyonu	Kısaltmalar	İnfeksiyonların temel semptomları
Enteropatojenik <i>E. coli</i>	EPEC	Diyare
Enterotoksijenik <i>E. coli</i>	ETEC	Diyare, ileitis
Enteroinvaziv <i>E. coli</i>	EIEC	Kanlı diyare
Enteroagregatif <i>E. coli</i>	EAggEC	Diyare
Enterohemorajik <i>E.coli</i>	EHEC	Diyare, HC, HUS, TTP
Diffuz Adherent <i>E.coli</i>	DAEC	Diyare

2.2.1. Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC)

Enterotoksijenik *E.coli* grubu, özellikle iyi hijyenik koşullara sahip ülkelere, daha düşük hijyenik standartlara sahip ve sıcak iklimli ülkelere giden bireylerde görülür. Turist hastalığı olarak adlandırılan hastalıkların %60-70 'inden sorumludur (29). Ayrıca gelişmekte olan ülkelerdeki bebek ve çocuklardaki diyarenin önemli nedenlerinden biridir (30, 31). Bakteri kontamine süt ve besinlerle alınır. Bu bakterilerin hastalığa neden olabilmesi için çok sayıda bakterinin vücuda girmesi gerekir. Hastalığın inkubasyon süresi 8-44 saat arasında değişmekte olup ortalama 26 saattir. Hastalık süresi 24-30 saat olup enfeksiyon piring suyu görünümünde sulu ishale ve dehidrasyona neden olmaktadır (30, 31).

ETEC suşlarının plazmidler tarafından kodlanan ısıya dirençli toksin (Heat Stable Toxin = ST) ve ısıya duyarlı toksin (Heat Labile Toxin = LT) olmak üzere iki önemli toksine sahiptir. Bu toksinlerden; ısıya duyarlı toksin (LT) protein yapısında olup 60 °C 'de 30 dakika da inaktif olur. Biyolojik ve antijenik olarak *Vibrio cholerae* toksiniyle yakından ilişkili bir toksindir (7, 32).

Isıya dirençli toksin (ST) ise, ısıya karşı dirençli olmasının yanı sıra proteolitik enzimlere, nükleazlara, lipazlara ve organik çözücülere de dirençlidir. Toksin 18 amino asitten oluşmaktadır. ST tamamen farklı bir moleküldür, küçük bir peptittir ve memelilerin guanilin denilen bir hormonuna benzer (30).

ETEC suşlarının toksik etkilerini gösterebilmelerinde kolonizasyon faktörleri önemli rol oynamaktadır. ETEC suşları bağırsağa ulaştığında, ince bağırsağın epitel yüzeylerine kolonize olur ve ince bağırsaklara etki eden bir veya daha fazla toksin salgılar. ETEC hücreleri ince bağırsağın epitel tabakasına nüfuz etmez ve zarar vermemekle birlikte yalnızca yüzeyde kolonize (Şekil 2.1c) olurlar (30).

Kolonizasyonda fimbrialar rol oynar. Fimbria protein yapısında, filamentöz olup türe özgüdür. Kolonizasyon faktörleri plazmide bağlı genler tarafından yönetilir ve enterotoksinler ile birlikte ETEC'in patojenitesinde rol oynarlar (30). O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O85, O115, O128ac, O148, O159, O167, serotipleri bu grup içinde yer almışlardır (13). ETEC'in taşınmasında dışkı ile kontamine besinlerin ve içme suyunun önemli rol oynadığı belirtilmiştir (4) .

2.2.2. Enteroinvasif *E.coli* (EIEC)

EIEC serotiplerinin hastalık tablosu *Shigella*'ya çok benzer bir tablo gösterir. Sulu, kanlı ve çoğunlukla da müköz bir diyareye neden olurlar. Kolon epitel hücrelerini istila ederek, bu epitel hücreleri içerisinde çoğalmakta ve epitel dokunun nekrozuna yol açarak kanlı diyareye sebep olmaktadır. EIEC türlerinin invazyon mekanizmasında, 120-140 MDa büyüklükte plazmidin etkili olduğu düşünülmektedir (7, 13). O28ac, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164 serotiplerinin yer aldığı grupta EIEC grubunda hastalıklarda en sıklıkla rastlanan serotip O124 tür. Hastalığın ilerlemesi sonucu, özellikle de çocuklarda Hemolitik Üremik Sendrom görülebilir (31).

2.2.3. Enteropatojenik *E.coli* (EPEC)

EPEC suşları, ilk olarak 1955 yılında Neter tarafından tiplendirilmiştir (33). Bu suşlar, neonatal ve infantil diyarelerle ilişkilendirilmektedir. Pek çok yetişkinin, EPEC türleri için taşıyıcı oldukları, fakat belirgin infeksiyon semptomları göstermedikleri bilinmektedir. Bunun nedeninin yetişkinler arasındaki kazanılmış bağışıklığa bağlı olduğu düşünülmektedir.

EPEC suşları, ısıya dayanıklı ST (ST_a, ST_b) ve ısıya duyarlı LT (LT-I, LT-II) olmak üzere bir veya daha fazla sayıda enterotoksin oluşturmaktadır. Bu suşlar; morfolojik lezyonlar oluşturmaksızın ince bağırsak epitel hücrelerindeki mikrovilluslara tutunmakta ve sentezledikleri enterotoksinlerle enterositleri lokal olarak etkileyerek buzağılarda, kuzularda ve domuz yavrularında neonatal diyareye ve ileitise, özellikle sıcak mevsimlerde de bebeklerde diyarelere (Şekil 2.1a) neden olmaktadır (1, 32, 34).

EPEC infeksiyonunun histopatolojik olarak en önemli özelliği tutunma ve bozma (attaching and effacing effect) etkisidir. Bu etkinin oluşması; bakterinin enterosite lokal aderensi, bakterinin enterosit sinyal sistemini uyarması ve enterositle bakteri arasındaki sıkı bir bağlanmanın gerçekleşmesi basamakları ile olur. EPEC virulens faktörleri kromozom ve plazmidler üzerinde bulunan genlerin kontrolündedir. Tutunma ve bozma etkisi “enterosit bozma lokusu”(locus of enterocyte effacement: LEE) denilen bir T3SS, intimin denilen dış membran adezini transloke intimin reseptörü (Tir) ve diğer proteinleri kodlayan bir patojenite adası tarafından yönetilir. Ek olarak bir çok EPEC suşu EPEC aderens faktörü (EAF) plazmidini denilen ve tip IV fimbria ve demet oluşturan piluslar (bundle forming pilus Bfp) denilen pilusları kodlayan plazmidler taşır. Bfp taşıyan EPEC suşlarına tipik EPEC denir ve bu suşlar enterositlere lokal aderens göstererek bağlanır. Atipik EPEC suşları ise EAF plazmidleri taşımazlar dolayısıyla Bfd'leri yoktur ve bunlar daha az patojendir. Bfp halat benzeri demet şeklinde agregat olmakta ve bakterini reversibl otoagregasyonuna yol açmaktadır. Bu özellikleriyle Bfp'nin infeksiyonun başlangıcındaki aderensi yönlendirdiğine ve daha sonra bakterinin barsak yüzeyine dağılmasına yol açtığına inanılmaktadır. EPEC'in başlıca adezin faktörleri Bfp, intimin ve T3SS'inde yer alan EspA proteindir. EspA, EPEC'e ait T3SS'te yer alan olağan dışı bir translokasyon proteindir. Bilindiği gibi T3SS sisteminde konak hücreye bakteri proteinlerinin oluşturduğu bir oluk oluşmaktadır. İşte bu EspA filamanöz yapısıyla enjektörün iğnesi gibi görev görür ve bakteriyi konak hücreye bağlar. Tir, EspA'nın oluşturduğu oluktan geçerek, EspB ve EspD'nin oluşturduğu delikten konak hücre membranı içine girer ve bakterinin intimin adezini için reseptör görevi görür. İntimin Tir'le bağlanması sonucu gelişen bazı olaylarla konak hücre iskeletinde aktin nükleasyonu ve flaman oluşumu mekanizmaları harekete geçerek bakterinin bağlandığı yerde kupa benzeri bir taban oluşturur, bu da bakterinin hücreye sıkıca yapışmasını sağlar. Yani EPEC kendi taşıdığı reseptörü konak hücre

membranı içine enjekte edip yerleştirerek ona bağlanır ve konak hücre modifikasyonu (Şekil 2.1) için kullanır (35).

2.2.4. Enteroagregatif *E.coli* (EAggEC)

Hayvanlarda epidemiyolojik çalışmalar sonrasında ortaya çıkarılmıştır. Tropik ülke çocuklarında süreklilik gösteren diyarelere neden olmaktadır. Erişkinlerde görülen seyahat diyaresindeki rolü tartışmalıdır. Hücre kültürlerinde bu serotipler hücreler üzerine kümelenmektedir. Virülens faktörü olarak ısıya dirençli enterotoksin içermektedir (13-15). İnfeksiyon mekanizması tam olarak anlaşılamamakla birlikte, ST'e benzeyen ve enteroagregatif stabil toksin (EAST) olarak isimlendirilen bir toksin sentezlediği bildirilmektedir (şekil 2.1d). Bu toksin plazmid tarafından kodlanmaktadır (33).

2.2.5. Diffüz Adherent *E.coli* (DAEC)

DAEC grubundaki suşlar ise yine çocuklarda süreklilik gösteren diyareye neden olurlar. Hücreye adezyon yolu ile yapıştıkları gibi diffüze olabilirler (Şekil 2.1f). Bu tip *E.coli*'lerde iki ayrı adhesin geninin varlığı ve ayrıca son olarak intimin varlığı saptanmıştır (14, 15, 36) .

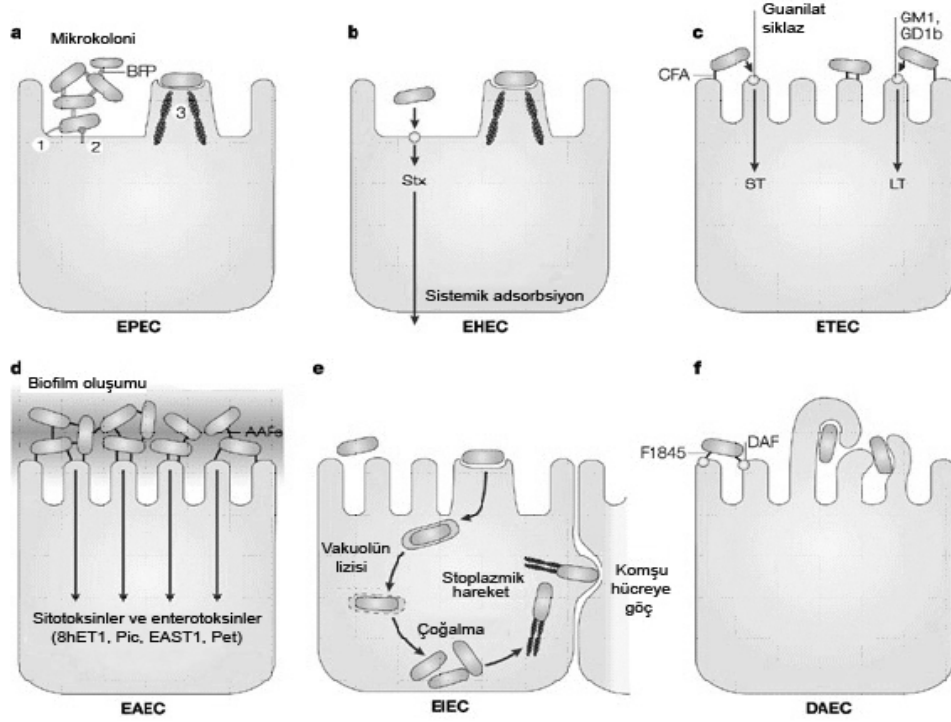
2.2.6. Enterohemorajik *E.coli* (EHEC)

EHEC suşları, enterohemolizin ve sitotoksin (verotoksin ya da sigatoksin) üretirler ve bu sitotoksinlerle mikrovilluslarda tutunma ve bozma (A/E) lezyonları olarak adlandırılan lezyonlara sebep olurlar (33, 37). Tüm dünyada verositol toksinler ile ilgili olarak gıda kaynaklı en önemli patojenler olarak *E. coli* O157:H7 ve *E. coli* O157:NM serotipleri kabul edilmektedir (1). Bu grupta bulunan diğer serotipler O26:H11, O26:H32, O26:H⁻, O55:H7, O111:H8, O111:H⁻, O113:H21, O117:H14 dir (7). Bu serotip insanlarda Hemolitik Üremik Sendrom (HUS), Trombotik Trombositopenik Purpura (TTP) ve Hemorajik Kolitis (HC) olmak üzere üç temel sendroma neden olmaktadır Bu bozukluklar sonucu insanlarda ciddi sağlık problemleri ve özellikle çocuklarda böbrek bozuklukları meydana gelmektedir (38).

Enterohemorajik *E.coli* suşları verotoksin üretme yeteneklerinden dolayı verotoksijenik *E.coli* (VTEC) olarak da adlandırılmaktadır. Hastalık belirtileri *Shigella dysenteria* Tip I'in neden olduğu belirtilerle aynı olduğundan Shiga benzeri toksin oluşturan *E.coli* (SLTEC) olarak ta adlandırılır. EHEC suşlarının verotoksinleri ince bağırsağın epitel

tabakasına nüfuz etmez ve bakteriler yalnızca yüzeyde kolonize olurlar (Şekil 2.1b). Kolonizasyonda fimbriyası rol oynar. Fimbria protein yapısında, filamentöz olup türe özgüdür. Kolonizasyon faktörleri plazmide bağlı genler tarafından yönetilir ve enterotoksinler ile birlikte ETEC'in patojenitesinde rol oynar (30).

EHEC suşlarının patojenitesinde hem Shiga toksinleri hem de tutunma ve bozma mekanizmaları rol oynar. Yani Shiga toksini (verotoksinde denir) salgılayan *E.coli*'nin (STEC) yapışma ve bozma mekanizmasını sağlayan LEE (enterosit bozma lokusu) genleri de varsa bu suşlara EHEC (örn:O157:H7) denir (şekil 2.1b). Dolayısıyla EHEC olmayan sadece Shiga toksini salgılayan STEC suşlarında vardır. EHEC suşları aynı zamanda EHEC hemolizini de salgılar. EHEC insanlara genellikle biftek gibi az pişmiş etlerle bulaşır, çünkü bu bakterinin sığırlar ve diğer geviş getiren hayvanların sindirim kanalı doğal florasında bulunur. EHEC suşlarının infeksiyöz dozu düşük olup, 100 bakteriden azdır. ishal yanında hemolitik üremik sendrom (HUS) ve ölüme yol açabilir. Etkisi hem Shiga toksin 1 ve 2 hem de tutunma ve bozma mekanizması ile gerçekleşir. Bu toksinler patojenite adacıkları tarafından kodlanır. Shiga toksini A-B grubundadır, yani bir A alt birimi ve pentamer yapıda B alt birimi vardır. Duyarlı hücre reseptörüne bağlanarak endositozla hücre içine alınır. A alt birimi aktive olarak hücre ribozomunda protein sentezini durdurarak hücre ölümüne yol açar. Sindirim kanalı epitel hücrelerinden geçerek bağırsak, böbrek ve diğer organların kılcal endotellerini tahrip eder ve bunun sonucunda intravasküler koagülasyon ve sonunda da trombositopeni, mikroanjiyopatik hemolitik anemi ve böbrek yetmezliği yani HUS'a yol açar (35).



Sekil.2.1. Diyarejenik *E.coli* suşlarının patogenezi mekanizmaları.

(AAF, birleştirici yapıştırıcı fimbria, aggregative attaching fimbriae; BFP, demet oluşturan piluslar, bundle forming pilus Bfp; CFA, kolonizasyon faktör antijeni; DAF, bozulmayı hızlandırıcı faktör, decay-accelerating factor; EAST1, enteroaggregative *E. coli* ST1; LT, heat-labile enterotoxin; ShET1, *Shigella* enterotoxin 1; ST, heat-stable enterotoxin)

a- EPEC'ler ince barsak enterositlerine yapışırlar fakat normal mikrovillus yapısını bozmaz ve karakteristik tutunma ve bozma lezyonlarını meydana getirir. Enterositlerde yangısal cevap ve diareden ötürü sitoskeletal düzenlemeler meydana gelir. Enterositlerde meydana gelen olaylar sırası ile 1. ilk yapışma, 2. tip III sekresyon sistemi ile protein translokasyonu, 3. kupa benzeri taban oluşumu.

b- EHEC'lerde tutunma ve bozma lezyonu kolonda görülür. EHEC'lerin bir diğer ayırıcı özelliği Shiga toksinlerin (Stx) işlenmesi ve bu toksinlerin sistemik adsorbsiyonu sonucu canlı hayatının tehlikeye girmesi şeklinde özetlenebilir.

c- ETEC'lerde ince barsak enterositlerine yapışır ve salgıladıkları ısı-duyarlı (LT) ve/yada ısı dirençli (ST) enterotoksinlerle sulu diareye neden olurlar.

d- EAEC'ler biofilm oluşturarak ince ve kalın barsak epitellerine yapışır ve enterotoksin ve sitotoksin salar.

e- EIEC'ler kolon epitellerini istila eder, fagozomu lize eder, aktin filamentler sayesinde hücre içerisinde hareket eder ve komşu hücreye baso-lateral olarak geçebilir.

f- DAEC'ler ince barsak enterositlerinde karakteristik sinyal transdüksiyonu meydana getirirler. Bu sinyaller, hücrenin parmak benzeri uzantılar meydana getirmesine ve bu sayede bakteriyi sarmasına neden olur.

2.3. *ESCHERICHIA COLI* O157:H7

Escherichia coli serotipleri içerisinde zoonoz olması nedeni en önemli yere sahip serotip *E. coli* O157:H7 dir. İlk kez 1975 yılında California’da ağır kanamalı diyare geçiren bir kadın hastadan izole edildiği belirtilmiştir (1). İnsan patojeni olarak kesin idendifikasyonu ise, 1982 yılında A.B.D.’nin Oregon ve Michigan eyaletlerindeki salgınlarda gerçekleştirilmiştir (39, 40).

2.4. *ESCHERICHIA COLI* O157:H7’NİN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Escherichia coli O157:H7 serotipi diğer *E. coli* 'lerden; 44,5 °C ve üzerinde gelişmemesi, sorbitolü fermente edememesi, β - glucuronidase enzimine sahip olmaması, buna karşı *eae* genine sahip olması, 60 mDa plazmid taşıması ve enterohemolizin üretimi ile ayrılır (20, 27). *E. coli* 'lerin %95 'i sorbitolü 24 saat içinde fermente ederken *E. coli* O157:H7 sorbitolü 48 saat içinde fermente edememektedir. SLTEC O157 suşları arasında sorbitol pozitif olanlara da rastlanılmaktadır. *E. coli* O157:H suşları sorbitol pozitifdir (20).

Yine *E. coli* 'lerin %97 'si β -glucuronidase enzimi içerirken *E. coli* O157:H7 serotipi β -glucuronidase negatiftir. Yeni bir tip hemolisin olarak kabul edilen enterohemolisin, verotoksin pozitif *E. coli* O157:H7 ve *E. coli* O157:H serotipleri tarafından üretilirken, bu özellik diğer *E. coli* 'lerde yoktur. Enterohemolisin sadece eritrositleri yıkanmış kanlı agar petrilerinde belirlenebilir. Bu şekilde 33 adet verotoksik *E. coli* O157:H7 ya da *E. coli* O157:H izolatının 32 adedinin enterohemolisin ürettiği gösterilmiştir. Bunların dışında *E. coli* O157:H7 serotipi diğer *E. coli* 'lere göre safra tuzlarına daha az dayanıklıdır. Antijenik yapısı diğer *E. coli* 'ler ile kesin bir ayırım sağlar (41-43).

E. coli 'nin florojenik MUG belirteci *uidA* geni tarafından kodlanan β -glucuronidase enziminin aktivitesine bağlıdır. EHEC *E. coli* O157:H7 'de de bu genin varlığı gösterilmiş olmakla beraber, yapılan sekans analizleri bu serotipte *uidA* geninde bir kaç baz mutasyonu olduğunu göstermiştir. Bu nedenle *E. coli* O157:H7 serotipinde diğer *E. coli* 'lerde tipik olan MUG reaksiyonu negatiftir (14, 34, 44).

Escherichia coli O157:H7’nin diğer *E. coli*’ler için geliştirilmiş pek çok biyokimyasal teste benzer reaksiyonlar verdiği bildirilmektedir. Buna göre; *E. coli* O157:H7 için de *E. coli*’lerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan indol ve MR testi pozitif, VP, sitrat testleri ve üreaz aktivitesi ise negatif olarak değerlendirilmektedir (10, 42, 45).

Ayrıca sukroz, arabinoz, trehaloz, mannitol, laktoz, maltoz, ramnoz, ksiloz, rafinoz ve dulsitol fermentasyonları, glukozdan gaz ve asit oluşturma yeteneği ile lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz testleri pozitif; salisin, eskülin, arjinin dihidrolaz, adonitol, inositol, potasyum siyanür (KCN) ve sellobiyoz reaksiyonları ise negatif olarak bildirilmektedir (46).

Bunun yanı sıra, özellikle, son yıllarda atipik biyokimyasal reaksiyonlar gösteren *E. coli* O157:H7 izolasyonu dikkati çekmektedir. Buna göre; ramnoz, sukroz, laktoz fermentasyonu ile glukozdan gaz oluşturma yeteneği, lizin dekarboksilaz, ornitin dekarboksilaz ve indol testlerinin negatif; üre hidrolizi ve sorbitol fermentasyonunun ise pozitif olduğu belirtilmiştir (47, 48, 49). Ratnam ve ark.'na (46) göre *E. coli* O157:H7 serotipinin çeşitli biyokimyasal özellikleri Tablo 2.2 de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. *E.coli* O157:H7 serotipinin biyokimyasal özellikleri

Biyokimyasal testler	<i>E.coli</i> O157:H7
Glikoz fermentasyonu	Asit ve gaz
Laktoz fermentasyonu	Asit ve gaz
Mannitol fermentasyonu	Asit ve gaz
Sakkaroz fermentasyonu	Asit ve gaz
Sorbitol fermentasyonu	Negatif
İndol	Pozitif
Üre	Negatif
Hareket	Pozitif
Hidrojen sülfür	Negatif
Lizin dekarboksilaz	Pozitif
Metil Red	Pozitif
Voges Proskau	Negatif

E. coli O157:H7 serotipi de diğer *E. coli*'ler gibi optimum olarak 37 °C'de ve pH 7.2'de üreyebilmektedir. (50).

Çeşitli araştırmalar, gıda kaynaklı hemorajik kolitis vakalarından izole edilen *E. coli* O157:H7'nin, asite oldukça dirençli olduğunu ve bunun da midenin kuvvetli asit ortamından rahatlıkla geçmesinde rol aldığını göstermektedir. pH'sı 1-2 olan insan midesinde yaklaşık üç saat süren sindirim sırasında canlı kalabilmesi ve buradan bağırsaklara geçmesi de bu görüşü desteklemektedir (27, 51).

Sığırların sindirim-boşaltım sistemlerindeki düşük pH ve organik asitler varlığının daha sonra karkasa bulaşma potansiyeli olan *E. coli* O157:H7 serotipi ve diğer patojenlerin aside dirençliğini artırabileceği düşünülmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalar bu bakterinin aside toleransının artırabileceğini (52), asit cinsinin aside olan tolerans artırımında etkili olduğu ve suş farklılıklarının aside dirençlikte önemli olduğunu göstermiştir (53).

Yapılan bir çalışmada aside direncin gelişme fazı ile doğrudan ilişkili olup, en yüksek direncin durma fazında olduğu belirlenmiş, aside bir kez direnç kazanıldığında bunun soğuk depo ortamlarında da korunduğu, ruminantların gastrointestinal sistemlerinde asidik ortama direnç kazanan bu patojenin karkasa bulaşması halinde soğuk depo ortamında canlılığını uzun süre koruyacağı ve etten elde edilecek asitli ürünlerde de ortam sıcaklığı gibi diğer koşulların uygun hale gelmesi ile gelişimini rahatlıkla sürdürebileceği gösterilmiştir (27).

Asitlik ve tuza olan direncinin aksine *E. coli* O157:H7 serotipinin yüksek sıcaklıklara *Salmonella* türlerinden daha fazla duyarlı olduğu, donma sıcaklıklarına ise kayda değer ölçüde dirençli olduğu belirtilmektedir (1).

2.5. *ESCHERICHIA COLI* O157:H7'NİN PATOJENİTESİ VE VİRULENS FAKTÖRLERİ

Escherichia coli O157:H7 serotipi infeksiyonların patogeneğinde rol oynayan shiga like toksin, enterohemolizin, intimin bağlanma faktörü, pO157 plazmidi, tip III sekresyon sistemi aracılığıyla salınan proteinler ve lipopolisakkarit gibi virulens faktörlerine sahiptir (54).

Escherichia coli O157:H7'nin patojenitesi tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte verotoksin (VT) veya shiga-like toksin olarak adlandırılan toksinlerin önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (55, 56). Bu toksinler önce Afrika yeşil maymunun böbreğinde elde edilen vero doku hücrelerine sitotoksik etki yaptığından dolayı verotoksin olarak isimlendirilmiştir (12, 57). Ancak daha sonra *Shigella dysenteriae* tip 1

tarafından oluşturulan shiga toksin ile %99 gibi çok büyük bir benzerlik göstermesinden dolayı shiga like toksin olarak adlandırılmıştır (27). Tüm klinik izolatların bir veya iki toksin ürettikleri saptanmış ve bunlar SLT-1 ve SLT-2 olarak isimlendirilmiştir (20, 30). Bunlar farklı proteinler ve farklı genler tarafından kodlanır ama aktif moleküler yapıları ve biyolojik fonksiyonları benzerdir (58).

2.5.1. Shiga Like Toksin I (SLT I)

Hücrelerin 60 S ribozomal alt ünitelerini inaktive ederek protein sentezini durdukları bildirilmiştir. SLT I A ve B olarak adlandırılan ve molekül ağırlıkları sırasıyla 5000 ve 7000; izoelektrik noktaları ise 7,1 ve 2 olan iki alt gruptan oluşmuştur. Shiga like toksin I, *E.coli O157:H7* 'nin bazı suşları tarafından üretilen intrasellüler bir toksindir (20, 41, 59)

2.5.2. Shiga Like Toksin II

Diğer toksin SLT I ile %55-60 benzer olmasına rağmen shiga like toksin olarak isimlendirilmektedir. HeLa ve vero doku hücrelerine sitotoksiktir ve anti-shiga toksini ile nötralize olmazlar (20) .

Verotoksinlerin memeliler üzerindeki etki mekanizması moleküler düzeyde tam olarak anlaşılamamıştır. Toksinler 70.000 dalton protein içeren basit yapıda bir A alt birim ve pentamer yapıda bir B alt biriminden oluşur. B alt birimi hücrelerde glikolipid reseptörüne bağlanarak içeri girdikten sonra A alt biriminin enzimatik olarak A₁ fragmentine indirgendiği bu fragmentin daha sonra 60S ribozomlarına bağlanarak protein sentezini inhibe ettiği ve hücre ölümüne yol açtığı tahmin edilmektedir. A alt birimi 28S ribozomal RNA (rRNA)'daki protein sentezini inhibe eden bir aminoglikosidazdır (20, 26).

B alt birimi ise ,konakçı böbrek korteksinde bolca bulunan ve shigatoksin reseptörü olan glikolipid globotriyoskleramide (Gb₃), toksinin bağlanmasından sorumludur. Gb₃ reseptörü insanda vardır ama inek, domuz, geyik gibi başka hayvanlarda yoktur. Bu hayvanlar toksin üreten bakterileri kendileri zarar görmeden barındırabilir dışkıları ile onları çevreye salıp insanlara geçmesine neden olabilirler (20, 41, 60, 61).

Toksin kan damarlarının çeperlerindeki endotel hücrelere etki eder. Kalın bağırsak damarlarına bu şekilde zarar vermesi yüzünden kanlı ishal meydana gelir. Toksin kanla sindirim sistemini çevreleyen damarlardan daha öteye yayıldığı zaman küçük damarlar

içeren çeşitli organlara zarar verebilir. Böbrek glomerulusunun epiteli, taşıdığı Gb3 reseptörleri yüzünden özellikle toksine duyarlıdır ve onun zarar görmesi böbreğin filtreleme işlevini ortadan kaldırır, sonuç hemolitik üremik sendrom görülür (62) .

Shiga toksinler, hemorajik kolitis ve HUS ‘un nedenidir , bağırsak ve böbrekte ,merkezi sinir sistemi ve diğer organların damar endotel hücreleri üzerinde sitopatik etkili olduğu düşünülür (63).

2.5.3. İntimin

Enterosit silinme lokusu olarak isimlendirilen 43-kb’lık patojenite adasında yer alan eae (*E.coli* bağlanma ve silinme) geni tarafından kodlanan 94-97 kDa ‘luk bir dış membran proteindir (26, 54). İntimin, bakterinin bağırsak epitel hücreleri ile sıkı bir kolonizasyon sağlamaktadır. Eae geni *E.coli* O157:H7 ve *E.coli* O157:H serotipleri yanısıra diğer bazı serotiplerde de bulunmaktadır. Ancak, insanlarda hastalığa neden olan az sayıdaki STEC suşunda bu genin bulunmadığı, muhtemelen bu suşlarda diğer kolonizasyon faktörlerinin bulunduğu belirtilmektedir (34, 64).

2.5.4. pO157

Hemen hemen tüm *E.coli* O157:H7 serotipleri tarafından taşınan, ilk olarak 1990 yılında varlığı tespit edilen, 90 -kb büyüklüğünde ehx lokusu içerir ve enterohemolizin kodlanmasından sorumlu plazmidir (26). EHEC infeksiyonlarının patogeneizindeki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, yapılan çalışmalarda fimbriyanın epitel hücrelerinde adezyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (7).

2.5.5. Tip III Sekresyon Sistemi

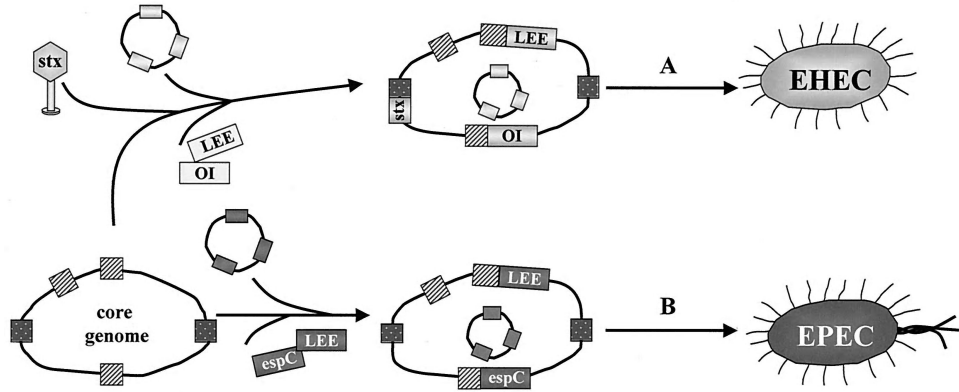
Pek çok Gram negatif bakteride bulunan, hayvanlarda infeksiyon nedeni olarak tanımlanan ve Tip III sekresyon sistemi aracılığıyla salınan Esps (*E.coli* secreted-proteins) gibi bazı immunreaktif proteinlerin *E.coli* O157:H7 tarafından salındığı bildirilmiştir. Bu immunreaktif proteinlerin tipik A/E lezyonlarının şekillenmesi için gerekli sinyal transdüksiyonunda rol aldığı belirtilmektedir. Tip III sekresyon sistemi bu proteinlerin stoplazmadan direkt olarak hücre yüzeyine taşınmasında görev almaktadır (26).

2.5.6. Somatik Antijen

E.coli O157:H7, Gram negatif bakterilerdeki tipik lipopolisakkarit yüzey yapısına sahiptir. “O” antijeni ya da somatik antijen olarak bilinen lipopolisakkarit, lipid O ve A polisakkaritinden oluşmaktadır. Serotipin antijenik determinantı olarak kabul edilen O polisakkariti *E.coli* O157:H7 serotipinin konakçı epitel hücrelerine adezyonunda önemli role sahiptir (26).

2.6. *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 GENOM HARİTASI VE PATOJENİTE ADALARI

Patojen bakterilerin genetiği üzerinde yapılan çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. *E.coli*’nin genetiği üzerinde yapılan incelemeler *E.coli* O157:H7 serotipinin enterik bir bakterideki genetik değişimden oluştuğunu göstermektedir. Kommensal *E.coli*’lerin memelilerin bağırsağını tercih ederken, patojen olanların ise bağırsak epitellerini aşarak dolaşım sistemine ve buradan uygun buldukları yerlere lokalize oldukları kabul edilmektedir. Enterik patojenler üzerine yapılan kromozomal incelemelerde, ayrı DNA segmentlerinin fonksiyonel virülens özellikleri kodladığı saptanmış ve bu bölgelere patojenite adası (pathogenity island) adı verilmiştir. Bu genler çoğunlukla başka mikroorganizmalardan kazanılmış olarak ortaya çıkmaktadır. Patojenite adası, bakteriye kompleks bir virülens özellik kazandırmakta ve genetik transfer ile rekombinasyonları önlemektedir. Patojenite adası genellikle hemolisin ve fimbria gibi hücre yüzeyi proteinlerinden sorumlu genler içerir. Bu yapının ortaya konulması ile *E.coli* O157:H7’nin evrim teorileri yeni bir yön kazanmıştır (26). Kommensal bakteri kromozomuna Locus of Enterocyte Effacement (LEE) ‘nin yerleşmesi EPEC benzeri bir klon oluşması için temel aşamadır (64). *E.coli* O157:H7 EPEC benzeri bir atadan önce LEE’yi elde etmesi sonra transdüksiyon ile SLT-2 ‘yi alması, sonra hemolisin kodlayan EHEC plazmidini kazanması daha sonra ise STL-1’i kazanması ve en son olarak sorbitol fermentasyonu ile β -GUR aktivitesini yitirmesi ile evrimini (Şekil 2.2.) tamamladığı kabul edilmektedir (26, 64).



Şekil 2.2. Patojenik *E. coli*.’de patojenite adasının oluşum modeli: Bu modelde, patojenik *E.coli*’ye ait DNA, omurgalı barsağında normalde bulunan nonpatojen *E. coli* türlerinin evrimleşmesi sonucu elde edilir. EHEC’de virülansla ilişkili bir plazmid, *Stx* (sitotoksin) fajı ve birkaç PAI (*LEE*) kalın barsakta yerleşmiş bulunan nonpatojenik *E.coli* genomuna entegre olabilmekte ve bunun sonucu HÜS (Hemolitik Üremik Sendrom)’a neden olan EHEC’ler gelişebilmektedir (A) Bu olaylar muhtemelen spesifik patojenik *E. coli* türlerinin gelişimine bağlıdır. Burada tanımlanan modelde, mobil genetik elemanların tutulumu ve birleşme basamaklarının gelişimi tanımlanmamıştır.

LEE üzerinde taşınan genler:

- (i) type III sekresyon sistemini kodlayan *sep* (Secretion of *E. coli* proteins) ve *esc* (*Escherichia* secretion) genleri (65),
- (ii) İntimin adı verilen adezinleri kodlayan *eae* geni (bakterinin epitel hücrelerine yakın tutunmasını sağlayan yapı) (66),
- (iii) type III sekresyon sistemi tarafında salınan proteinleri kodlayan *espABD* geni: Bu gen filamentöz sekresyon tüpünü şekillendiren EspA proteinini ve konak hücrede por oluşumuna yardımcı olduğuna inanılan EspBD proteinini kodlar. (67-70);
- (iv) Transloke intimin reseptörünü kodlayan *tir* geni (68),
- (v) LEE geninin pozitif regülatörünü kodlayan *ler* geni (LEE-encoded regulator) (71).

2.7. *ESCHERICHIA COLI* O157:H7’NİN KAYNAĞI VE EPİDEMİYOLOJİSİ

Escherichia coli O157:H7 serotipinin kaynağı üzerinde farklı görüşler bulunmaktadır. *E. coli* O157:H7 serotipi köpek, kuş, koyun, geyik ve insanda görülmekle beraber, sığır primer rezervuar olarak kabul edilmektedir. Bunun nedeni ise; insanlarda bu serotipin neden olduğu pek çok vakada yeterince pişirilmemiş sığır etlerinin ve daha az sıklıkta olmak üzere çiğ sütlerin hastalıktan sorumlu olduğunun kanıtlanmasıdır (19, 72).

Escherichia coli O157:H7'nin primer rezervuarı olarak kabul edilen sığırlar ve bu serotipin izole edildiği diğer hayvanların, *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarına oldukça dirençli oldukları ve etkenin bu hayvanlar için, genellikle, patojenik olmadığı bildirilmektedir (27). Ayrıca, bu serotiple doğal veya deneysel yolla enfekte sığırların büyük çoğunluğunda tipik klinik bulgulara rastlanılmadığı, çok azında ise geçici ve hafif bir ishal gözlemlendiği belirtilmektedir (73). Benzer şekilde Dean-Nystrom ve ark. (74) *E. coli* O157:H7'nin 3 haftalıktan büyük buzağılar için patojenik olmadığını bildirmişlerdir.

Çeşitli araştırmalar bu bakterinin sığırlar dışında diğer bazı memeli ve kanatlı hayvanların dışkıları ile de ete, süte, toprağa ve suya dolayısı ile tüm çevreye yayıldığını göstermiştir. Etkenin izole edildiği örneklerde ve bu örneklerde canlı kalış süreleri değişiklik göstermektedir (14).

2.7.1. Dışkı

Bu bakteri süt ineklerinin dışkılarında diğer sığırlara göre daha fazla bulunmaktadır (75, 76). Süt sığırlarının dışkısına *E. coli* O157:H7 ile inokule edilip farklı ısı aralıklarında depolandığı (5, 22 ve 37 °C) bir çalışmada etkenin süt sığırlarının dışkısında 5 °C'da 70 gün canlılığını koruduğu (77), ve dışkıda 50 günden daha fazla süre içinde halen belirlenebilecek düzeyde kaldığı gösterilmiştir (78). Yapılan başka bir çalışmada ise, sığır dışkısına *E.coli* O157:H7 inokulasyon düzeyinin artırıldığında sığır dışkısının 5, 15 ve 25 °C'lardaki depolanmasında etkenin sırasıyla 14, 18 ve 12 hafta canlılığını sürdürdüğü gösterilmiş ve bu bulgulara göre sığır dışkısının bu patojenin yayılmasında önemli bir kaynak olduğu ve gıdalara ve çevreye *E. coli* O157:H7'nin yayılmasında potansiyel bir taşıyıcı olduğu, dolayısıyla ahırlarda dışkının iyi bir şekilde kontrol edilmesi gerektiği belirtilmiştir (79).

Genç ve sağlıklı sığırlar *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarına oldukça dirençlidir. Deneysel olarak yemlerine belirli düzeyde katılan *E. coli* O157:H7 hayvanlarda her hangi bir klinik bulguya görülmezken 6-8 haftalık danalar için bu bakterinin patojen etki göstermemesi, buna karşın rumen ve barsaktan geçerken dışkılarındaki bakteri sayısında ciddi bir azalma olmakla beraber halen yoğun ölçüde bu patojene rastlanması sığırların bu bakterinin kaynağı ve çevreye bu bakterinin yayılmasında önemli olduğunu kanıtlamıştır (26).

Etkenin sığır dışında kanatlı hayvanlardan da izolasyonuna ilişkin çeşitli çalışmalar mevcuttur. Deneysel olarak 25 adet *E. coli* O157:H7 verilen civcivlerin inokülasyondan 8 ay sonrasına kadar dışkıları ile bu bakteriyi saçtıklarının belirlenmesi üzerine önce *E. coli* O157:H7 'nin ana kaynağının kanatlılar olduğu düşünülmüş (40), ancak 50 çiftlikte 500 hayvanın dışkısında bu bakteriye rastlanmaması üzerine kanatlıların bu açıdan potansiyel kaynak olmadığını göstermiştir (19).

2.7.2. Süt

Çiğ süt ile ilk *E. coli* O157:H7 enfeksiyonu ABD’de 1986 yılında tespit edilmiştir (35). Benzer bir enfeksiyona Kanada’da çiğ süt içilen bir çocuk yuvasındaki çocuklarda rastlanmıştır (25). İskoçya’da *E. coli* O157:H7 ile kontamine pastörize süt 100 kişinin enfeksiyonuna neden olmuştur (49). Güney Kanada’da anaokulu çocuklarında çiftlikte taze süt tüketiminden kaynaklanan bir enfeksiyon bildirilmiştir. 1998’te Batı ve Orta Wisconsin’de 4 adet *E. coli* O157:H7 enfeksiyonunda şüpheli gıdanın, süt imalathanelerinde 60 günden daha az olgunlaşma periyodunda tutulan taze peynirler olduğu rapor edilmiştir (80) .

Patojen mikroorganizmalar süt içerisine memeden direkt bulaşabileceği gibi hayvanın deri ve müköz membranlarından, sağıcılardan, kontamine sağımlardan, böcekler ve kemirgenlerden, kir ve dışkıdan da bulaşabilmektedir (30). Bu bakterinin çiğ süt ürünlerine bulaşması, meme başlarından, sağımların makineleri ile alet ve ekipman hijyeni, yetersiz pastörizasyon ve pastörizasyon sonrası kontaminasyon ile olabilmektedir (81). Son yıllarda çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketimine bağlı salgınlar sıklıkla gözlenmektedir. Hastalığa neden olan organizma sayısı belirlenmemiş olmakla beraber çok küçük olduğu tahmin edilmektedir (82).

2.7.3. Yem

Süt hayvanlarının beslenmesinde kullanılan pamuk tohumu ve mısır silajı gibi yemlerin az sayıda da olsa *E. coli* O157:H7 serotipi içerdiğinin belirlenmesi süt ineklerinin dışkılarında bu bakteriye daha fazla rastlandığı hakkındaki görüşü pekiştirmekle beraber, modern çiftliklerde beslenen süt ineklerinin dışkılarında bu serotipe çok daha az rastlanmaktadır (19). Buna bağlı olarak, önceleri bu bakterinin ana kaynağının süt inekleri olduğu ve insanlara asıl geçişin süt ürünleri ile olduğu düşünülmüş ise de süt ve peynirlere ilişkin olarak yapılan tarama çalışmalarından bu varsayımı doğru kılacak bulgular elde edilmemiştir (75).

Ruminantlarda saman, kuru ot gibi özel beslenme ile sağlanan gastrointestinal epitel hücre gelişmesinin *E.coli* O157:H7 serotipi üzerinde olumsuz etki yaptığı belirtilmektedir (54). Bunun yanı sıra süt ineklerinde yapılan bir çalışmada beslenmede kullanılan mısır silajının, *E.coli* O157:H7 serotipinin bu hayvanlardaki prevalansının yüksek olmasında etkili olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca mısır silajındaki asidik koşulların aside dirençli olan *E. coli* O157:H7'nin gelişmesini desteklediği belirtilmektedir (50). Silaj yapımı sırasında yetersiz fermentasyonun, tüm fekal koliformlarda olduğu gibi *E. coli* O157:H7 sayısında da artışa neden olduğu ve dolayısıyla dışkı ile kontamine otların silajında yetersiz fermentasyonun bu patojenin ruminantlar arasında taşınmasında etkili olabileceği düşünülmektedir (83).

2.7.4. Su

Yapılan çalışmalarda etkene göl (81), nehir (84) gibi yüzey sularında ve hayvan (85) ve tarım sulama (86) sistemlerinde rastlanmıştır.

Genellikle su kaynaklı hastalık salgınları su kaynağının (kuyu suyu, kaynak) yetersiz korunmasından distilasyon, ozonasyon, filtrasyon gibi uygulamaların yetersizliğinden şekillenmektedir. Atıkların taşınması, seller ve yüzey suları ile karışması sonucu bakteriyel popülasyonun toprağa geçmesiyle yeraltı (kaynak) suları kontamine olmaktadır. Bakteri ve virusler, yeraltı sularında yüzey sularına göre daha uzun süre canlı kalabilmekte ve büyük bir tehlike oluşturmaktadır (87). *E. coli* O157:H7, klorlanmış içme sularında 5°C'de 70 gün canlılığını sürdürebilmektedir (88).

2.7.5. Diğer bulaşma kaynakları

İnsanlarda infeksiyon nedeni olarak ilk sırayı, kesim sırasında sığırdışkıyla kontamine olmuş etlerin yeterince pişirilmeden tüketilmesi almaktadır (50, 89). Kesimhanelerde derinin yüzülmesi ve iç organların çıkarılması sırasında sığır eti kontamine olabilmekte (90, 91) etin kıyılması parçalanması sırasında bakteri yüzeyden iç kısımlara geçer yeterli ısı işleminin yapılmadığı durumda canlılığını sürdürür ve halk sağlığı açısından önemli risk oluşturmaktadır (92, 93). Diğer bulaşma kaynakları ise; infekte hayvanlar veya bunların dışkıları ile direkt temas (94, 95), dışkıyla kontamine sebze, meyve (96), içme ve kullanma suları (97), pastörize edilmemiş çiğ süt (98), yoğurt (82) ve meyve suları (79), kanatlı eti, kuzu eti, domuz eti ve deniz ürünleri (80) olarak bilinmektedir. İnsanlar arasındaki bulaşmada ise; infekte insanlarla direkt temasın ve halka açık yüzme

havuzları ile anaokulları, bakımevleri gibi kişisel hijyenin yetersiz olduğu yerlerin etkili olduğu bildirilmektedir (99-101).

Escherichia coli O157:H7'nin insan patojeni olarak tanımlanması, 1982 yılında Oregon (26 vaka) ve Michigan'da (21 vaka) yetersiz ısıtma işlemi görmüş kontamine hamburgerlerin tüketilmesi kaynaklanan 2 adet gastroenterit salgınında identifiye edilmesi ile ortaya konulmuştur (95). Bundan kısa bir süre sonra ise insan patojeni olarak tanımlanmıştır. Karmali ve ark.(102) hemolitik üremik sendromlu çocukların dışkılarında gözlemişlerdir. Günümüze kadar olan süreçte dünyanın pek çok ülkesinde *E. coli* O157:H7'ye bağlı çok sayıda gıda kaynaklı enfeksiyonun olduğu bildirilmiş, 1996 yaz aylarında ise Japonya'da 16 kişinin ölümüne neden olan salgında temel etken olarak *E. coli* O157:H7 gösterilmiştir (26, 39) .

Escherichia coli O157:H7'nin dışkı aracılığıyla saçılımını etkileyen faktörlere yönelik yapılan çalışmalarda, hayvanların yaşının ve mevsimsel etkilerin önemi üzerinde durulmuştur. Genellikle, fekal saçılımın ve fekal örneklerden izolasyonun genç yavrularda yetişkinlere oranla daha fazla olduğu belirtilmektedir (39, 103). Yetişkin hayvanlardaki düşük izolasyon oranı ile özellikle etlerden izole edilen *E. coli*'nin fekal bir kontaminasyonun göstergesi olabileceği arasında bir bağlantı olduğu düşünülmektedir (39).

Hancock ve ark.(104) yaptığı bir çalışmada, sütten kesilmiş yavrulardaki prevalans oranının, sütten kesilmemiş yavrular ve yetişkinlere oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca fekal örneklerden izolasyon oranının sıcak mevsimlerde özellikle de yaz aylarında ve sonbaharın ilk aylarında daha yüksek olduğu da bildirilmektedir (103, 105, 106). Epidemiyolojik olarak insanlara geçiş, direk olarak meslekle ilgili hayvanlarla temas şeklinde, indirek olarak dışkı ve atıklarla kontamine olmuş gıdalar ile olmaktadır (91, 107). İçme suları ve halka açık yüzme havuzları (95), çiğ ya da yetersiz pişirilmiş gıdaların hazırlanması sırasında temas edilen araçlar veya eller vasıtasıyla oluşabilen kross kontaminasyonlar (90, 92) ve en önemlisi kişiden kişiye temas (oral-fekal yolla) aracılığıyla ile kontaminasyon gerçekleşmektedir. Ayrıca asemptomatik taşıyıcı olan insanlar da patojenin geçişinde rol oynamaktadır (108, 109).

2.8. *ESCHERICHIA COLI* O157:H7'NİN İNSANLARDA YAPTIĞI HASTALIKLAR

E. coli O157:H7 ilk olarak 1982 yılında ABD 'de Oregon 'da 26 ve Michigan 'da 21 olmak üzere kanlı diyare şeklinde 2 salgın ile görülmüştür (95, 109). Bundan hemen sonra benzer vakalar ABD, Kanada ve İngiltere 'de görülmüş, daha sonra Meksika, Çin, Arjantin, Belçika gibi ülkelerde de aynı hastalığa rastlanmış, 1996 yaz aylarında ise Japonya 'da 16 kişinin ölümüne neden olan salgının etkeni *E. coli* O157:H7 olarak gösterilmiştir (39, 89, 110).

Escheriachia coli O157:H7 'nin yapmış olduğu hastalıklar tipik ve oldukça sert geçen hemorajik kolitis, HUS ve trombotik trombositopenik purpura (TTP) olmak üzere 3 şekilde görülür (13, 19, 39, 58).

Hemorajik kolitis (HC) aniden ortaya çıkan kramplı karın ağrıları ile başlar ve 24 - 48 saat içinde sulu diyare ile devam eder. Diyare sırasında görülen kan artar ve dışkı zamanla tümüyle kan olur. Hastalığın ortaya çıkması genellikle 3-9 gün (ortalama 4 gün), hastalık süresi ise 2-9 gündür. Hastalığın ortalama 8 gün sürdüğü şeklinde kaynaklara da rastlanmaktadır. Şiddetli karın ağrılarının yanısıra, sulu ishalin az ya da hiç bulunmaması kolonik mukoza ödemi ile karakterize bir hastalıktır (1, 13, 26). Bu hastalık shigelloste tanımlanan dizanteri ve invaziv *E. coli*'nin neden olduğu gastroenteritiden ateş olmaması ve kanlı dışkı ile ayrılmaktadır (19, 26, 39, 58).

Hemorajik Üremik Sendrom (HUS) özellikle çok gençlerde böbrek yetersizliği, mikroangiopatik hemolitik anemi ve trombositopeni ile karakterize edilen ve üçlü bir sendrom olarak ortaya çıkar. Hemorajik kolitis vakalarında ortalama % 0-15 arasında HUS geliştiği tahmin edilmekte, bu oran çocuklarda % 10 olarak verilmektedir. HUS, kalıcı böbrek fonksiyon kaybına neden olabilir. Yaşlılarda ise HUS, ateş ve TTP olmak üzere ilave iki semptom ile görülür. Bu durumda yaşlılarda ölüm oranı ortalama % 50 'ye çıkmaktadır. Kuzey Amerika ülkelerinde ölüm oranı % 5 olarak tahmin edilmektedir (19, 26). Çoğu kez hastalara diyaliz ve kan nakli gerekir, nöbet ve koma ile karakterize edilen merkezi sinir sistemi hastalıkları gelişir ve ölüm görülebilir (40). Hastalarda sarılık, sıklıkla yüksek tansiyon ve kalp yetmezliği de görülebilmektedir. *Sh dysenteriae* serotip-1 ile oluşan infeksiyon HUS 'a neden olurken bazı mikroorganizmalar HUS gibi hastalıklar yapmaktadırlar (58).

Trombotik Trombositopenik Purpura (TTP) TTP’de ise klinik ve patolojik özellikleri HUS’a benzemekle birlikte temel özelliği merkezi sinir sistemi bozukluğudur. Mikroanjiyopatik hemolitik anemi, trombositopeni ve ateş gibi klinik bulgularla karakterize olup genellikle yetişkinlerde gözlenir. Hastalıkta beyinde kan pıhtısı oluşur ve genellikle ölüm görülür (1, 26, 40, 59). Bununla beraber *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarında TTP’nin nadir olduğu da bildirilmektedir (19).

Bu temel klinik bulgular dışında *E. coli* O157:H7 ile infekte insanlarda gözlenen diğer komplikasyonlar ise hemorajik sistitis, konvülziyonlar, sepsis ve anemi şeklindedir (1). Bakteri antibiyotiklere dirençlidir ve/veya giderek direnç kazanmaktadır. Bu nedenle hastalıkta antibiyotik ve antikoagulant kullanılması tartışılmaktadır. İskoçya 'da yapılan çalışmalar mide asitliğini düşürücü ilaç ve tesadüfen antibiyotik kullanan hastaların HUS / TPP’ye yakalanma risklerinin arttığını ortaya koymuş (19, 111) Japonya’da 1996 yılında görülen ve çoğu okul çocuğu olan 6000 kişinin etkilendiği salgında ise özellikle enfeksiyonun 7. gününde alınan antidiyarejenik ilaçların enfeksiyonu daha da şiddetlendirdiği belirlenmiştir (26).

2.9. *E. COLI* O157:H7’NİN TEŞHİS YÖNTEMLERİ

E. coli O157:H7 serotipinin çeşitli gıdalar, fekal numuneler ve diğer klinik ve çevre örneklerinde aranması ve teşhisine yönelik çeşitli kategorilere ayrılmış farklı yöntemler kullanılmaktadır.

Bu yöntemler; serotipin biyokimyasal özelliklerine dayanan kültürel yöntemler ve şigatoksinlerin neden olduğu sitotoksik etkilere dayanan biyolojik testler (hücre kültürleri), şigatoksinlere, O157 ve H7 antijenlerine karşı monoklonal ve poliklonal antikorların kullanıldığı immunokimyasal yöntemler ve nükleik asitler üzerine dayanan yöntemleri içeren gelişmiş teknikler şeklinde dört ana başlık altında toplanabilir (26).

Sığır orijinli fekal örneklerde *E. coli* O157:H7 tespiti, bakteri sayısının çok düşük olmasından dolayı oldukça güçtür. Örneklerden petrilere direkt ekim yönteminin sensitivite açısından yetersiz bulunması, farklı zenginleştirme kültürleri ve izolasyon tekniklerinin geliştirilmesine neden olmuştur (112, 113). *E. coli* O157:H7’nin teşhis ve izolasyonuna yönelik çok çeşitli teknikler olmasına rağmen, önerilen herhangi bir standart prosedür bulunmamaktadır. Ayrıca izolasyon amaçlı uygulanan kombine yöntemlerin hiç birisinin % 100 duyarlı olmadığı bildirilmektedir (113). Yapılan çalışmalarda izolasyon şansını artırabilmek için incelenecek örneklerin taze olması ve

laboratuvara zaman geçirilmeden soğuk zincirde ulaştırılması gerektiği önerilmektedir (112).

2.9.1. Kültürel-Biyokimyasal Yöntemler

Klinik örnekler ve diğer materyalde *E. coli* O157:H7 belirlenmesinde klasik olarak tanımlanan yöntemler biyokimyasal testler üzerine kurulmuştur ve rutin test laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna göre dışkı materyallerinde *E. coli* O157:H7'nin varlığının gösterilmesi sırasıyla; selektif bir sıvı besiyerinde ön zenginleştirme, selektif-diferansiyel katı besiyerine ekim, şüpheli kolonilerin biyokimyasal testler ve O157 antiserumu ile lam ya da tüp aglutinasyon testi yapılarak veya lateks aglutinasyon testi ile *E. coli* O157 olarak belirlenmesi ve son olarak da izolatin H7 antijeni içerip içermediğinin belirlenmesi şeklindedir. (26, 114).

Escherichia coli O157:H7 serotipinin kültürel yöntemlerle belirlenmesi amacıyla ön zenginleştirme besiyeri olarak en fazla modifiye tryptone soy broth (mTSB) ve modifiye *E.coli* broth (mECB) kullanılmaktadır (115). Genel olarak, örnekler homojenize edildikten sonra 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmakta bu sürenin sonunda selektif-diferansiyel bir katı besiyerine ekilmektedir. Tutenel ve ark. (113), doğal infekte sığır dışkılarından *E. coli* O157 izolasyonunda kullandıkları farklı yöntemler arasında 6 saatlik ön zenginleştirmenin 24 saatlik zenginleştirmeden daha iyi sonuç verdiğini belirtmiştir. mTSB besiyerine 0,05 mg/l cefixime, 10 mg/l cefsuladin ve 80 mg/l vancomycine ilavesi ile ön zenginleştirme besiyeri daha da selektif hale getirilebilmektedir. Son yıllarda ise mTSB besiyerine 20 mg/l olacak şekilde novobiocin katılımının selektivite açısından daha yararlı olduğu bildirilmektedir (113).

Immunomagnetic separation (IMS): Immunomanyetik Seperasyon tekniği gıda maddelerinde ve diğer örneklerde mikroorganizmaların aranmasında kullanılan hızlı, yüksek duyarlılığa sahip ve uygulanması basit bir yöntemdir. Bu yöntemin prensibi spesifik immünokimyasal ajanlar (monoklonal, poliklonal ve rekombinant antikorlar) ile kaplanmış manyetize olabilir boncuklar kullanılarak istenen mikroorganizmaların belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu boncuklar karışık bir süspansiyon içinden bile spesifik olarak aranan mikroorganizmayı yakalayabilmektedir (60). Bu yöntem pek çok araştırmacı tarafından güvenilir ve duyarlı bulunmuş ve doğrulama için doğrudan izolasyon sağlaması nedeni ile diğer gelişmiş analiz yöntemlerine göre avantajlı olarak tanımlanmıştır (21, 48, 123).

Son yıllarda IMS yöntemi ile çalışan sistemler üzerinde yoğun bir ilgi vardır. IMS yöntemi *E. coli* O157'ye spesifik antikorlarla kaplanmış manyetik boncuklardan oluşan selektif bir zenginleştirme yöntemi olarak kabul edilmektedir (116). Sığır fekal örneklerinde *E. coli* O157:H7'nin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada enzim immunoassay ve immunomanyetik separasyon tekniklerinin duyarlı ve güvenilir bulunduğu belirtilmiştir (117). Bunun yanı sıra Japonya'daki çoğu salgında, infeksiyöz etkeni IMS ile identifiye edebilmenin oldukça güç olduğu ve bu nedenle şüpheli gıdalardaki az sayıda mikroorganizmayı izole etmek için daha duyarlı yöntemlere gereksinim duyulduğu belirtilmiştir (117).

Selektif-diferansiyel katı besiyeri olarak bugün en yaygın kullanılan Sorbitollü MacConkey (SMAC) agardır. Bu besiyerinin standart MC agardan farkı; bileşiminde laktoz yerine sorbitol bulunmasıdır. *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol negatif olduğu için bu besiyerinde renksiz koloniler oluşturmakta, buna karşın sorbitolü kullanan bakterilerin oluşturduğu asitlik, bir pH indikatörü yardımı ile kolonilerin kırmızı renkte görülmesine neden olmakta, böylece *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol pozitif bakterilerden ayırt edilebilmektedir. *E. coli* O157:H7'nin tespiti için SMAC agarın, % 100 sensitivite, % 85 spesifite ve % 86 doğruluk payına sahip olduğu bildirilmiştir (118).

Standart MC agar ve SMAC agarlar, sırası ile laktoz ve sorbitol reaksiyonlarına dayalı yeterli düzeyde ayırt edici özellik sağlamakla birlikte, her iki besiyeri de oldukça zayıf bir selektiviteye sahiptir ve *E. coli* O157:H7 yanında pek çok bakterinin de gelişmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle SMAC agar çeşitli selektif katkıları ile desteklenmekte ve besiyerine daha fazla bir selektivite kazandırılmaya çalışılmaktadır. Bu amaçla en çok cefixime tellurite ve potassium tellurite kullanılmaktadır. Sefalosporin grubu bir antibiyotik olan cefixime, özellikle, sorbitol negatif olan *Proteus* spp.'nin inhibisyonu için önem taşımakta (119), potassium tellurite ile desteklendiğinde ise *E. coli* O157:H7 dışında kalan ve çeşitli yöntemlerle baskılanamayan *E. coli*'leri de önemli ölçüde etkilemektedir. Cefixime-Tellurite katkılı sorbitol MacConkey (CT-SMAC) agarın, VT oluşturmayan diğer *E. coli*'lerin üremesini % 67 oranında, *Proteus* spp., *Aeromonas* spp., *Morganella* spp. ve *Providencia* spp.'nin üremesini % 97 oranında inhibe ettiği bildirilmiştir (120). Ayrıca, özellikle, *E. coli* O157 dışındaki sorbitol fermentasyonu negatif pek çok bakteri tarafından fermente edilen ramnozun bu ayırt edici özelliğinden

yararlanılarak Cefixime-Rhamnose katkılı sorbitol MacConkey (CR-SMAC) agar geliştirilmiştir (119). CT-SMAC agarın, özellikle, sığır dışkılarından *E. coli* O157:H7 izolasyonunda CR-SMAC agara göre daha uygun ve daha duyarlı olduğu bildirilmektedir. Ayrıca dışkı örneklerinden izolasyon için en duyarlı selektif besiyeri olarak CT-SMAC agar önerilmektedir (113, 120).

Escherichia coli O157:H7 izolasyonunda Fluorocult *E. coli* O157:H7 agar gibi florojenik özellikteki besiyerlerinden de yararlanılmaktadır. Besiyeri, bakterinin β -glukuronidaz özelliğinin tespitinde kullanılmaktadır. Besiyerinin içerisinde florojenik bir substrat olarak bulunan MUG, UV ışığı altında floresans parıldama vermekte, β -glukuronidaz özelliği bulunmayan *E. coli* O157:H7 ise parıldama göstermemektedir (121). Noveir ve Halkman (122) yaptıkları bir çalışmada SMAC agarın, Fluorocult *E. coli* O157:H7 agara göre daha iyi sonuç verdiğini ve Fluorocult *E. coli* O157:H7 agarda hatalı pozitif sonuçlar alınabileceğini bildirmiştir.

Escherichia coli O157:H7'nin negatif olan β -glukuronidaz özelliğinden yararlanılarak SMAC agara kromojenik bir substrat olan 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (BCIG) eklenerek SMAC-BCIG adıyla yeni bir kromojenik agar geliştirilmiştir (115). *E. coli*'lerin % 96-98'i β -glukuronidaz enzim aktivitesine sahiptir ve bu enzim, besiyerinde bulunan BCIG ile reaksiyona girerek, mavi-mor renkli koloniler oluşturur. *E. coli* O157:H7 ise β -glukuronidaz enzim aktivitesine sahip olmadığı için besiyerinde renksiz şeffaf görümlü koloniler oluşturur (115, 121). Okrend ve ark (115) SMAC-BCIG agarın, sadece SMAC agarla karşılaştırıldığında hatalı sonuç oranını % 36 oranında azalttığını bildirmiştir.

Kültürel yöntemlerle *E. coli* O157:H7 aranmasında diğer bir aşama, katı besiyerinden izole edilen şüpheli kolonilerin biyokimyasal testler ile tanımlanmasıdır (26, 123). Biyokimyasal testler açısından *E. coli* O157:H7; H₂S; VP, sitrat testleri, üreaz aktivitesi ile sorbitol ve sellobiyoz fermentasyonu negatif; indol, MR, lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz testleri, glukozdan asit ve gaz oluşturma yeteneği ile laktoz fermentasyonu pozitifdir (117). Ayrıca sukroz, arabinoz, trehaloz, mannitol, maltoz, ramnoz, ksiloz, rafinoz ve dulsitol fermentasyonları pozitif; salisin, eskülin, arjinin dihidrolaz, adonitol, inositol ve potasyum siyanür (KCN) reaksiyonları ise negatif olarak bildirilmektedir (45).

Fekal örnekler ve gıda örneklerinden, özellikle de çiğ sütlerden sıkça izole edilen *Escherichia hermannii*; biyokimyasal ve serolojik özellikleri bakımından *E. coli* O157:H7'ye benzemekte ve sorbitol negatif olup, *E. coli* O157 antiserumu ile aglutine olabilmekte, böylece *E. coli* O157:H7 ile karıştırılabilmektedir. Aralarında ayırım yapılabilmesi ise *E. hermannii*'nin pozitif olan sellobiyoz fermentasyonu ile sağlanabilmektedir. Bu amaçla sellobiyozlu MacConkey (CMAC) agarlar kullanılarak selektivite artırılmakta ya da izolatlara sellobiyoz şeker testi yapılarak fermentasyon sonucu değerlendirilmektedir (123).

Genellikle, VT üreten *E. coli* O157:H7 ve *E. coli* O157:H serotipleri, Beutin ve ark. (124) tarafından bazı EPEC suşlarında rastlanan β -hemolizin ve α -hemolizinden morfolojik, genetik ve immunolojik olarak farklı olduğu saptanan enterohemolizin oluşturmaktadır. Daha sonra yapılan çalışmalarda enterohemolizinin sadece yıkanmış koyun kanlı agarda 37°C'de 18-24 saatlik inkubasyon sonrası saptanabildiği ve hemoliz zonunun koloninin altında veya etrafında bulanık görünüşte, dar çaplı olduğunu bildirilmiştir. Buna karşılık α -hemolizinin 37°C'de 3 saatlik inkubasyon sonrasında yıkanmamış koyun kanlı agarda kolaylıkla saptanabildiğini belirtilmiştir.

Klasik yöntemle *E. coli* O157:H7 aranmasındaki son aşama selektif katı besiyerinde izole edilen şüpheli kolonilerin tanımlanmasıdır. Bu tanımlama O157 serotipi için biyokimyasal testler ile yapılabileceği gibi lateks aglutinasyon testi ile de yapılabilmektedir. Ancak O157 olarak belirlenen izolatın H7 olup olmadığının saptanmasında H7 antiserumu ile belirlenebilmektedir (125). *E.coli* O157 olarak saptanan izolatın H7 olup olmadığının saptanmasında H7 antiserumu çeşitli besi yerlerine katılarak immobilizasyon testi uygulanmaktadır (125, 126). Dışkı örnekleri ile inokule edilmiş SMAC agar besi yerinden izole edilen sorbitol negatif *E. coli* O157:H7 serotipinin hızlı identifikasyonu için *E. coli* O157:H7 fluoresans antikor konjugatının %100 duyarlı ve spesifik olduğu bulunmuştur (127).

2.9.2. Serolojik Yöntemler

E.coli O157:H7 suşlarının serolojik özelliklerini belirlemede en çok kullanılan test Lateks Aglutinasyon testidir. Ayrıca, Lateks aglutinasyon doğrulama testi *E.coli* O157:H7 suşlarının hızlı identifikasyonu için kullanılan ve yüksek duyarlılığa sahip bir testtir. (14).

Bu yöntemlere son zamanlarda yeni serolojik metotlar özellikle immunoassay, radioimmunoassay (RIA), fluorescent immunoassay (FIA), enzim immunoassay (EIA), immun peroksidaz testleri de katılarak bakterilerin belirlenmesinde daha güvenli ve erken sonuçlar alınmaktadır. Bunlar arasında, ELISA, koloni immunblot analizleri, direkt immunofloresan filitre ve immun yakalama teknikleri *E. coli* O157:H7 analizlerinde kullanılmaktadır. Bu amaçla O ve H antijenlerine karşı monoklonal ve poliklonal antiserumlar geliştirilmiştir (128, 129).

SLT 1 ve SLT 2 antikorları için ELISA yöntemleri kullanımı HeLa hücre sitotoksitesi nötralizasyon analizleri ile benzer sonuçlar vermiştir. Gerek ELISA uygulamaları gerek nötralizasyon testleri enfekte olmuş hastaların belirlenmesinde duyarlı değildir. Bununla beraber *E.coli* O157 lipopolisakkarit antikorları için ELISA teknikleri her ikisinde duyarlı ve spesifik bulunmuş ve *E .coli* O157.H7 ile enfekte olmuş kişilerin belirlenmesinde antitoksik antikorlardan muhtemelen daha yararlı olarak yorumlanmıştır (130).

Selektif zenginleştirme kültürünün “sandwich ELISA” *E.coli* O157 antijeni için spesifik bir poliklonal antikor ile uygulanmasıdır. Yüksek düzeydeki spesifikliği, duyarlı ve hızlı olmasının yanında bu işlem rutin mikrobiyolojik kontrol yapan laboratuvarlar için kullanımı kolay ve uygun bir yöntem olarak tanımlanmıştır (26).

Dışkı örneklerinde *E.coli* O157:H7’nin belirlenmesi için geliştirilmiş ve 1 saatten az sürede sonuç veren hızlı bir ELISA yönteminde diğer enterik patojenler ile çapraz reaksiyon alınmamıştır. Bu yöntem dışkılarda *E. coli* O157’nin aranması için doğru ve kolay uygulanabilir olarak değerlendirilmiştir (131).

Escherichia coli O157’nin hızlı ve basit olarak belirlendiği bir diğer enzim immunoassay sistemi polymacron’dur. Bu sistemin esas test örneğinin sodyum cholate ile 100 C ‘de 10 dakika ısıtılması ile ekstrakte edilen *E .coli* O157 antijeninin immuno enzimatik yöntemle belirlenmesidir. Sistem *E. coli* ‘nin 29 O157:H7 serotipi, 1 O157:H12 serotipi ve 1 O157:NM (non motile, H⁻) serotipi ve *S.urbanda* (N grup) ile pozitif sonuç vermiş ancak çok sayıda Gram negatif ve pozitif bakteri ile reaksiyon vermemiştir (132).

İmmunokimyasal yöntemlerin çoğunda, *E. coli* O157:H7'nin "O" antijeni ya da tüm antijenlerine karşı geliştirilmiş antikorlar kullanılmaktadır. Fakat çoğunlukla hatalı pozitif sonuçlar alınabildiği ve teşhis için bu yöntemlerin sensitivitesinin yeterli olmadığı belirtilmektedir. ELISA'da, kullanılan monoklonal ya da poliklonal antikorlar ile bu hatalı pozitiflik oranını düşürdüğü bildirilmektedir (26).

Enzim-antikor içeren hidrofobik grid membran filtrasyon yöntemi doğal olarak kontamine olmuş taze et ve süten izolasyonda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak yöntem çok yoğun ve kompleks çalışmaları gerektirdiğinden dolayı rutin analizlerde yaygın olarak kullanılmamaktadır (133).

Süt ve meyve sularında *E. coli* O157:H7'nin tanımlanması için geliştirilmiş antikor-direkt epifluoresan filtre tekniği (Ab-DEFT) modifiye bir yöntemdir. Bu yöntemde örnek, direk olarak homojenize edildikten sonra 15 dakika süre ile tripsin ve Triton X-100 ile muamele edilmekte ilk önce 5µm por çaplı ön filtreden, daha sonra 0,2 µm por çaplı siyah polikarbonat filtresinden geçirilmekte ve son filtre doğrudan fluorescein ile işaretlenmiş anti-O-157 poliklonal antikor ile boyandıktan sonra yıkanmakta ve epiflouressans mikroskopta incelenmektedir. Ab-DEFT yönteminin duyarlılığı standart yöntemle aynı olup 16 kob/g düzeyinde *E.coli* O157:H7 varlığında güvenilir bir şekilde kullanılmaktadır (133).

2.9.3. Moleküler Yöntemler

Hastalıkların başarılı bir şekilde tedavi edilmeleri için ilk şart, erken ve doğru tanının sağlanmasıdır. Bu nedenle hızlı tanı sağlayabilen, spesifikliğı ve duyarlılığı yüksek laboratuar yöntemlerine ihtiyaç vardır. Geleneksel tanı yöntemleri günümüzde halen birçok patojen mikroorganizmanın saptanmasında vazgeçilmez yöntemler olmalarına rağmen bazı durumlarda yetersiz kalabilmektedirler (134).

Moleküler tanı yöntemleri; tanı yanında cins veya tür düzeyinde tanımlanması, epidemiyolojik tiplendirme, virulans faktörlerinin belirlenmesi, direnç genlerinin araştırılması, mutasyon incelemeleri, sınıflandırma ve filogenetik analizlerde kullanılmaktadır (134, 135). Moleküler tanı yöntemleri hibridizasyon "probe" larının kullanıldığı sinyal amplifikasyon yöntemleri ve nükleik asit amplifikasyon yöntemleri olmak üzere grublandırılabilir (135).

Kary Mullis'in 1983 yılında PCR yöntemini keşfetmesinden günümüze kadar olan süreçte, nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin rutin tanı amacıyla kullanılmaları konusunda önemli gelişmeler kaydedilmiştir.

Nükleik asit çoğaltma yöntemleri, seçilmiş olan hedef bölgenin çoğaltılması ile gerçekleştirilebildiği, nükleik asit üzerinde özgül problemlerin çoğaltılması veya sinyal çoğaltma yöntemleriyle de istenen sonuca ulaşılması mümkündür.

Rutin mikrobiyolojik tanıda PCR yönteminin kullanım amacı, hastalardan alınan örnekler içinde, hastalık etkeni mikroorganizmanın nükleik asit düzeyinde saptanmasıdır. PCR yöntemi, nükleik asitlerin in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Bir başka deyişle, canlı bir hücre içinde gerçekleşen DNA replikasyonu, PCR yönteminde bir tüp içinde taklit edilir. Bu amaçla bakteri hücresinde DNA replikasyonu için kullanılan enzimlerin işlevleri, farklı ısı döngüleri kullanılarak gerçekleştirilir. Mikroorganizmalarda replikasyonun başlayabilmesi için ilk basamak, DNA çift zincirinin birbirinden ayrılmasıdır. PCR yönteminde 94°C'de gibi yüksek bir uygulanarak, zincirlerin birbirinden ayrılması sağlanır. Bu yöntemle yüksek sıcaklıklarda çalışabilen Taq polimeraz enzimi ve uygun primerler kullanılır (136).

PCR yöntemi, farklı sıcaklıkların uygulandığı üç basamağın (denaturasyon, bağlanma, sentez) birbirini takip eden döngüler şeklinde tekrarlanması esasına dayanır. Böylece toplam 40-50 döngü yapılması sonucunda, genom üzerinde seçilmiş olan hedef bölge milyarlarca kopya halinde çoğaltılmış olur (137).

Çoğaltılan ürün saptanmasında hız ve kolaylık açısından en uygun yöntemin ethidium bromid ile jel analizidir. Ancak duyarlılık artırılmak istenirse, radyoaktif dot blot veya southern blot analizleri kullanılır. Kemilüminesans ve enzim kullanan non-radyoaktif sistemler de geliştirilmiştir (138).

2.9.3.1. PCR Modifikasyonları

Bugün kullanılmakta olan çok çeşitli PCR Modifikasyonları teknikler olmakla beraber bunlardan adından en çok söz ettirenler RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR), Multiplex PCR ve Real-time PCR'dır (26, 139).

2.9.3.2. RT-PCR (Reverse Transkriptaz-PCR)

Bu yöntem RNA hedeflerini çoğaltılması için kullanılır. Hedef RNA öncelikle revers transkriptaz enzimi ile cDNA'ya çevrilir. Bundan sonraki aşamada cDNA kullanılarak normal PCR ile çoğaltma işlemi yapılır. *E. coli* O157:H7 suşları çevresel şartlarda (nehir, göl, içme suyu vs) çeşitli stres faktörleri altında canlı fakat kültüre edilemeyen (viable but nonculturable) bir formda bulunurlar. Normal PCR yöntemleri (DNA tabanlı) bakterinin canlı olup olmadığını almamamızda yetersiz kalmakta bu nedenle karkas ve sularda bakteri canlılığını ve türünü saptamada mRNA tesbitine dayalı RT-PCR kullanılmaktadır (139).

2.9.3.3. Multiplex PCR (mPCR)

Bu yöntemle tek bir tüp içinde iki veya daha fazla hedef bölgeye özgül primerlerin kullanılmasıyla farklı çoğaltma ürünleri elde edilmesi mümkündür. Ancak kullanılacak olan primerlerin benzer bağlanma sıcaklığına sahip olmamalarına ve birbirlerine komplementer bölgeleri olmamasına dikkat edilmelidir. mPCR yöntemi aynı klinik örnek içindeki farklı mikroorganizmaların tanısı için kullanılabileceği gibi aynı mikroorganizmanın farklı hedef bölgelerini saptayabilmek için de kullanılabilir. mPCR analizleri duyarlı, spesifik ve O157:H7 serotipinin fenotipik varyantlarını belirleyebilecek düzeyde iken, bu sistemin çok kompleks ve gıdalar ile klinik örneklerin rutin analizlerinde kullanılamayacak kadar pahalı olduğu belirtilmektedir (26).

2.9.3.4. Real-time PCR

Çoğaltılan ürünlerin elektroforez yapılmaksızın saptanmasına yönelik olarak yapılan çalışmalar sonucunda, real-time PCR yöntemi ve otomatize PCR sistemleri geliştirilmiştir. Real-time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesi ile, kantitatif sonuç alınabilen bir PCR yöntemidir. Böylece hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin, hem de çoğaltılan ürünlerin saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi çok pratik bir yöntem haline getirmiştir. Ayrıca tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski de azalmaktadır (140).

2.9.4. Genotiplendirme

Bakteriler ile benzer biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik profile sahip organizmalar olduklarından dolayı karışıkları olması olasıdır. Bundan dolayı isimlendirme, taksonomi ve epidemiyolojik çalışmalarda genotiplendirme fenotipik yöntemlerin yerini almıştır.

Genotipleme; tüpler arasında farklılığı genotipik yapı ve genetik dizilim ile gösterilmesidir.

2.9.4.1. Genotiplendirmede Kullanılan Yöntemler

a. Genomik DNA'nın nükleotid farklılığına dayanan yöntemler:

I- PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

II- RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)

b. Amplifikasyona dayalı yöntemler:

- RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)
- AFLP (amplified fragment length polymorphism)
- Microsatellite PCR (interrepeat PCR,IR-PCR)
- Rep-PCR (repetitive -sequence –based PCR)
- MLST(multi-locus sequence typing)
- Microarray analysis (mikro Chip teknolojisi)
- Ribotyping

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)'ye dayalı genotiplendirme altın standart olarak kabul edilir. Bu yöntem de, besiyerinde hücreler karıştırılıp, hücreleri deterjan veya enzim ile parçalayarak DNA izolasyonlarının yapıldığı ve bu DNA kalıplarının restriksiyon enzimi ile kesilerek elektroforez ile 10-800 kilobazlık DNA segmentlerinin net olarak ayırt edilmesine olanak sağlar. Bu bant profillerinin bilgisayar programları yardımıyla değerlendirilerek suşların birbirleriyle olan ilişkilerinin ortaya konmasıdır (140).

Bu yöntemler taksonomik/filogenetik çalışmalarda suşların başka cins adı altında isimlendirilmesini sağlanmasına rağmen aynı zamanda farklı isimlendirilen suşlar aynı genotipik özellikler gösterile bilmektedir. Ayrıca suşlar arası genotipik farklılıklar bakteriyel duyarlılığı etkileyebilmektedir (141).

Mikroorganizmaların genotipik ayrımın moleküler olarak yapıldığı metotlar PFGE, RAPD, AFLP ve RİBOTYPİNG'i içerir (128, 141). Bu yöntemlerden MLST; yüksek derecede üretkenlik sağlayabilir. Fakat MLST ve PFGE çok deneyimli kullanıcılara ihtiyaç duyar. Spesifik organizmalar için belirlenmiş protokolleri sınırlıdır ve standart solusyonları yoktur (141, 142).

PFGE gıda zincirleri arasında çeşitli noktalarda *E. coli* O157:H7'nin ekolojisinin araştırılması, patojenik ve patojenik olmayan bakteriler arasında genetik ilişkinin tanımlanması ve tür bazında identifikasyon için çeşitli genotipik metotlar yaygın şekilde kullanılmıştır (37, 143).

2.10. *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 SAĞALTIMI

Escherichia coli O157:H7 serotipi antibiyotiklere her geçen gün direnç kazanmaktadır. *E.coli* O157:H7 serotipinin sefalotin ve kolistin'e karşı direçli olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle hastalıkta antibiyotik ve antikoagulan kullanımı tartışılmaktadır. Konuyla ilgili olarak İskoçya'da mide asitliğini düşürücü ilaç ve rastgele antibiyotik kullanan hastalarda HUS/TTP'ye yakalanma riskinin artırdığı bildirilmiştir (14,19, 48, 81,111, 144-146). Japonya'da 1996 görülen ve çoğunluğunun okul dönemi çocuklarda olmak üzere 6000 kişinin etkilendiği salgında, enfeksiyonun yedinci gününde alınan antidiyaretik ilaçların hastalık tablosunu ağırlaştırdığı bildirilmiştir. Bu nedenle antibiyotik kullanımı tavsiye edilmemektedir (26). *E. coli* O157: H7 ile enfekte olmuş insanlarda nonspesifik destekleyici tedavi önemlidir (144).

2.11. *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 ENFEKSİYONUNUN KONTROLÜ VE ÖNLEME YOLLARI

Enfeksiyonu önlemek için, tarımsal üretimden, gıdaların işlenmesi ve hazırlanmasına kadar olan prosesin her basamağında kontrol önlemlerinin alınması gerekmektedir. Hijyenik kesim uygulamaları ile karkasın dışkı ile kontaminasyon riski azaltılmaktadır. Çiftliklerde, gıda işletmeleri ve kreşlerde çalışan personelin, güvenli gıda sağlama teknikleri, çiğ ve pişmemiş gıdalardan kaynaklanabilen direkt ve indirekt kros kontaminasyonlar ve personel hijyeni konularında eğitilmesi, bakterinin insanlara geçişini minumuma indirgemede önem taşımaktadır (91, 95, 146) .

Enfeksiyonun yayılmasını engellemek için, özellikle çocukların tuvalet sonrasında, yemek öncesinde çiftlik hayvanları ve çiğ gıdalarla temastan sonra ellerini sabunla uygun şekilde yıkanması gerekmektedir. Ayrıca koruyucu önlem olarak etin kesim sonrası hızla 7°C altında, sütün ise 5°C altında soğutulması gerekmektedir (77) .

Gıdalarda bulunan EHEC 'i elimine etmek için uygulanan en etkili metodun ısıtma olduğu bildirilmektedir (107). Pastörize edilmemiş süt ürünleri ve meyve suları ile yetersiz pişirilmiş kıyma, et ürünleri ve hamburgerlerin tüketiminden kaçınılmalıdır. Özellikle bu tip gıdalara uygulanan ısı işleminin ürünün her yerinde 70°C ve üzerinde olması (90, 91, 95) etin pembe renginin kaybolup gri kahve rengine dönüşmesi ve et suyunun tamamen uzaklaşması ile yeterli pişirme sağlanabilmektedir (88, 107).

In vitro çalışmalar, yumurta sarısı antikorlarının *E.coli* O157:H7 gelişimini engelleyici etkisi olduğu göstermiştir. Antikorların *E.coli* O157:H7 gelişimini engelleyici etkisini belirlemek için yapılan, tavuk yumurta sarısı antikorlarının in vitro aktivitesine ilişkin bir araştırma, *E.coli* O157:H7'ye karşı antikorların spesifik bağlanma etkisinin yüksek olduğunu göstermiştir (148).

E. coli O157:H7 enfeksiyonlarından korunma amaçlı etkenin inhibisyonu için çeşitli kimyasallar denenmektedir. Bunlardan klor, özellikle içme ve kullanma suları için uygun bulunurken, çeşitli dezenfektanların organik asitlere göre daha etkili olduğu belirtilmektedir (149).

Kullanılan atık suların, belli işlemlerden geçirilmesi önerilmektedir. Bunun yanında işlem görmemiş havuz ve göl sularının da patojenin geçişi için bir risk olduğu öğretilmelidir. Günümüzde EHEC'e bağlı hastalıklardan korunmak için kullanılan etkin bir aşı bulunmamakta ancak hayvanlarda deneysel uygulamalar devam etmektedir (90).

Kesimhanelerde derinin yüzülmesi ve iç organların çıkarılması sırasında sığır eti kontamine olabilmektedir (90, 91). Etin parçalanması kısılması sırasında yüzeyden iç kısımlara geçen bakteri, yeterli ısı işlemi yapılmadığı durumlarda canlılığını sürdürmekte halk sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadır (92, 93).

Genel hijyenik kurallara uyulması da enfeksiyonlardan korunmada önem taşımaktadır. Bu amaçla başta kesimhaneler olmak üzere tüm gıda üretimi ve işlenmesi ile ilgili yerlerin, fekal kontaminasyon ve bir gıdadan diğerine kros kontaminasyon riskinin azaltılması amacıyla sanitize edilmeleri önerilmektedir. Karkasların su veya uygun solüsyonlarla yıkanmasının da fekal materyallerin uzaklaştırılmasında bir dereceye

kadar da olsa etkili olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, özellikle, çiftlik hayvanları yetiştiriciliğı yapılan yerlerde periyodik olarak hayvanlardan dışkı örneğı alınarak, *E. coli* O157:H7'ye yönelik izolasyon ve fekal saçılım taramaları yapılması önerilmektedir (149).

Amerika Birleşik Devletlerindeki Gıda Güvenlik ve Denetim Servisi *E. coli* O157:H7'nin iyonize ışınlarla pişirmeksizin etkili bir şekilde elimine edilebileceğinden dolayı gelecekte sığır etinin yüzeyinin büyük ölçüde ışınlanabileceğine inanmaktadır. Sığır etlerinin ışınlanmasında etin tadında ve besin değeriinde herhangi bir değışiklik olmadığı belirtilmiştir (150, 152). *E. coli* O157:H7'nin inaktivasyonu için çeşitli kimyasallar denenmektedir, bu kimyasallardan klor sular için etkili olabilmekte (151), yağlı ve yağsız sığır etleri için hidrojen peroksit etkili olmaktadır (150, 152).

İnsanlarda Stx oluşturan *E. coli* infeksiyonlarının insidensini ve etkilerini sınırlandırmak amaçlı immunizasyon çalışmaları da bulunmaktadır. Genel olarak, immunizasyona ilişkin iki çeşit yaklaşım üzerinde durulmaktadır. Bunlardan ilki, özellikle, infeksiyonlarda önemli rol oynayan çiftlik hayvanlarının aşılansıdır. Fakat hayvan sayısının çok fazla olması bu uygulamayı çoğunlukla geçersiz kılmaktadır. Diğer bir yaklaşım ise, insanların aşılansı yönündedir ve Stx'e dayanan aşılar üzerinde çalışılmaktadır (153).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Numuneler

Çalışmada, Kayseri'nin ilçe (Bünyan, Felahiye, Sarioğlan, Yahyalı, Yeşilhisar) ve köylerinden (Dikme Köyü, İlyaslı Köyü, Avlağa Köyü, Çubuklu Köyü, Senirköy Köyü, Ovaçiftlik Köyü, Yeşilova Köyü, Hasanarpa Köyü, Elagöz, Akın, Yazır, Güneşli), kamu ve özel sektöre ait süt sığır yetiştiriciliği yapılan 12 işletmeye ait sağlıklı sığırlardan bir yıllık süre içinde 500 adet dışkı ve 500 adet süt örnekleri toplandı (Tablo 3.1). Numuneler, hayvanın rektum mukozasından svabla dışkı ve dört meme lobundan süt alındıktan sonra içerisinde 20 mg/l novobiosin içeren 10 ml tryptone soya broth içersine konularak soğuk zincir altında en kısa sürede içerisinde laboratuvara getirildi ve incelemeye alındı.

Tablo 3.1. Numunelerin Alındığı İşletmeler ve Numune sayısı

İşletme No	İşletmenin Bulunduğu İlçe	Numune Sayısı	
		Dışkı	Süt
1	Elagöz	30	30
2	Elagöz	30	30
3	Güneşli	90	90
4	Akınyazır	30	30
5	Bünyan	30	30
6	Yahyalı	50	50
7	Yahyalı	80	80
8	Yeşilhisar	45	45
9	Yeşilhisar	55	55
10	Hasanarpa Köyü	25	25
11	Felahiye	20	20
12	Sarıoğlan	15	15
TOPLAM NUMUNE SAYISI		500	500

3.1.2.Besiyerleri**Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) (Acumedia, ABD)**

Bileşimi	gr/l
Enzymatic Digest of Gelatin	17,0
Enzymatic Digest of casein	1,5
Enzymatic Digest of Animal Tissue	1,5
Sorbitol	10,0
Bile Salts No.3	1,5
Sodium chloride	5,0
Neutral red	0,03
Crystal violet	0,001
Agar	13,5

Hazırlanışı: Sorbitol MacConkey agar besiyerinden 50g tartıldı. 1 l distile su içerisinde ısıtılarak eritildi. Daha sonra 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. 50°C’ye soğutulan besi yerine Cefixime Tellurite Selective Supplement katılarak aseptik koşullarda steril petrilere 12,5-15 ml olacak şekilde döküldü

Cefixime Tellurite Selective Supplement (Fluka, Hindistan)

Bileşimi	500ml/mg
Potassium tellurite	1,25
Cefixime	0,025

Hazırlanışı: 500 ml SMAC besiyerine 2ml distile su içerisinde eritilmiş olarak 1 vial Cefixime Tellurite Selective Supplement katıldı.

Chrom Agar O157 (CHROM) (CHROMagar, France)

Hazırlanışı: Chromagar besi yerinden 5,84 g tartıldı. 1 l distile su içerisinde eritildi. Daha sonra 121 °C’ de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

3.1.3. Testlerde Kullanılan Solüsyon ve Tampon Sıvılar

Novobiosinli modifiye Tyriptose Soy Broth (m TSB Broth Oxoid, England) :

Bileşimi	gr/l
Peptone from Casein	17,0
Soya Peptonu	3,0
NaCl	5,0
Bile Salts No.3	1,5
D(+) Glucose	2,5
K ₂ HPO ₄	4,0
Novobiosin	0,02

Hazırlanışı: Ticari olarak satılan besiyerinden 33g/l konsantrasyonunda distile su içerisinde eritilerek hazırlanan besiyeri 225 ml olacak şekilde erlenlere dağıtılıp otoklavda 121 °C’de 15 dakika Sterilize edildi. Sterilizasyon sonrası 25°Cde pH’sı 7,3 ± 0,2’dir. hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir.

Yıkama Solüsyonu (PBS Tween)

Bileşimi	gr/l
NaCl	0.15M
Sodium-Phosphate buffer	0.01M
Tween-20	%0.05
pH	7.4

Hazırlanışı: Verilen oranlarda karıştırılarak IMS’de örneklerin yıkanmasında kullanıldı.

Tris Borate EDTA Buffer (TBE, X10): TBE buffer (x10) (Fermantas, Litvanya) bir erlene konularak üzerine 2 l steril distile su ile tamamlandı.

Tris Borate EDTA Buffer (TBE, X5): Yarım hacim 10xTBE solusyonu 9.5 hacim steril distile su ile sulandırılarak hazırlandı.

***E.coli* O157 Antisera (SSI, Danimarka):** Ticari olarak satılan *E.coli* O157 antisera kullanım prosedürüne uygun olarak kullanıldı.

***E.coli* H7 Antisera (SSI, Danimarka):** Ticari olarak satılan *E.coli* H7 antisera kullanım prosedurune uygun olarak kullanıldı.

Referans suş: İzolasyon ve identifikasyon çalışmalarının her aşamasında kullanılan *E.coli* O157:H7 (RHFS 232) kontrol suşu Refik Saydam Hıfzısıhha Entitüsü’nden elde edilmiştir.

3.1.4. Testlerde Kullanılan Cihaz Ekipmanlar

İmmunomagnetik Separasyon (IMS) (DynaL, Norveç): *E.coli* O157 aranmasında kullanılan Dynebeads anti *E.coli* O157 kitleri kullanıldı.

Elektroforez Güç Kaynağı: Elektroforezde güç kaynağı olarak (ThermoEC 250-90,USA) zaman ayarlı güç kaynağı kullanıldı.

Jel Görüntüleme Sistemi: Jel elektroforezi sonrasında PCR test sonuçlarının değerlendirilmesi ve jel fotoğraflarının görüntülenmesi amacı ile Vilber Laurmat (Fransa) ve jel fotoğraflarının basılması için kullanıldı.

Steril Kabin(Laminar flow): DNA ekstraksiyonu ve PCR misklerinin hazırlanması steril kabinde (Telstar Bio-II-A,İspanya) gerçekleştirildi.

Thermal Cycler: DNA eldesinde ve sonrasında gerçekleştirilen amplifikasyon işlemlerinde (Techne Touchgene Gradient, USA) kullanıldı.

Jel Elektroforez Cihazı: DNA jel elektroforezi için mini ve midi jel elektroforez cihazları (ThermoEC 320, İngiltere) kullanıldı.

Nucleic Acid Extraction Kit

Absolute ethanol	(> %95)
Lizozim	(50 mg / ml)
Proteinaz K	(20 mg/ml)
RNase	(20 mg / ml)

Yıkama Solüsyonunu: GF-BA-100 washing buffıra 70 ml absolute ethanol ilave edilerek hazırlandı.

BG Solüsyonu: Buffer BG'de soğuk ortamda saklanmaya bağlı olarak tuz presipitasyonları meydana gelmiş ise, kullanmadan önce 55°C- 65°C 'lik su banyosunda sık sık karıştırılarak tamamen çözdürüldü ve ondan sonra kullanıldı.

PCR Reaktifleri

10X PCR (Sigma, USA)

Tris-HCl	100Mm
KCl	500mM
pH	8.3

dNTP Mix: Konsantrasyonu 10mM olan dNTP mix (Sigma, USA) solusyon amplifikasyon esnasında denatüre edilen zincirlerin tamamlanması için PCR reaksiyonunda kullanıldı. Solusyon kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Taq Polimerase: Isıya dayanıklı DNA enzimi (Sigma, USA, 250U) moleküler aşamada PCR reaksiyonunda çift zincirli DNA'nın 5'-3' yönünde nükleotidlerine ayrılması ve tek iplikçikli hale gelmesini sağlamak amacı ile kullanıldı. Kullanılncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

MgCl₂: Konsantrasyonu 25 mM olan MgCl₂ (Sigma, USA) PCR reaksiyonunda Taq polimeraz enzimi ile birlikte kullanıldı. Kullanılncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Primerler: Çalışmada mPCR reaksiyonu sonucunda yapılan agaroz jel elektroforezinde verocytotoksin 1 için 348 bp (base pair), verocytotoksin 2 için 584bp, enterohemolysin için 534 bp, intimin için 840 bp, LPS O157 için 420 bp, büyüklüğünde bantlar oluşturan primerler kullanıldı. Çalışmada kullanılan primerler Tablo 3.1'de belirtilmektedir.

Tablo 3. 2. *E.coli* O157:H7 suşlarının m-PCR ve u-PCR'ında kullanılan primerlerin dizilimi (Inregrated DNA Technologies Inc. IDT, USA)

Çalışmada kullanılacak olan primer dizileri (5'-3')	Gen bölgesi	Virulens gen adı	Amplikon büyüklüğü (bp)
PF8 CGTGATGATGTTGAGTTG PR8 AGATTGGTTGGCATTACTG	rfbO157	LPS O157	420
Int Fc CCGGAATTCGGGATCGATTACCGTCAT Int Rc CCAAAGCTTTATTTAATCAGCCTTAATCTC	eaeA	İntimin	840
hly AF GCATCATCAAGCGTACGTTCC hly AR AATGAGCCAAGCTGGTTAAAGC	ehlyA	Enterohemolysin	534
LP 30 CAGTTAATGTCGTGGCGAAGG LP31 CACCAGACAATGTAACCGCTG	Stx 1	Verocytotoxin 1	348
LP43 ATCCTATTCCCGGAGTTTACG LP44 GCGTCATCGTATACACAGGAGC	Stx 2	Verocytotoxin 2	584
H7 GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC H7 CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	fliC	H7	625

Çalışmada elde edilen izolatlar sekiz adet primer kullanılarak m-PCR ile ve iki adet primer kullanılarak u -PCR tekniği ile incelendi.

Çoğaltılması istenen bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp ona bağlanacak olan sentetik DNA parçaları olan liyofilize primerler 100 pmol/ml olacak şekilde sulandırıldı ve bu primerler PCR reaksiyonunda kullanılncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

DNA Ladder: Konsantrasyonu 0,5µg/µl olan 100bp DNA ladder (Fermentas, Litvanya) elektroforez sonucunda oluşan bantların büyüklüklerini belirlemek için kullanıldı. Kullanılincaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.

6xLoading Dye: 6 X Loading Dye’ın (Fermentas, Litvanya) bileşiminde boyaları bulunmaktadır. Elektroforez boyunca DNA göçünün izlenmesi amacı DNA ladderlerin ve örneklerin agaroz jele yüklenmesinde kullanıldı. Kullanılincaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

10xTBE Electrophoresis Buffer

Tris	89 mM
Borik asit	89 mM
EDTA	2 Mm

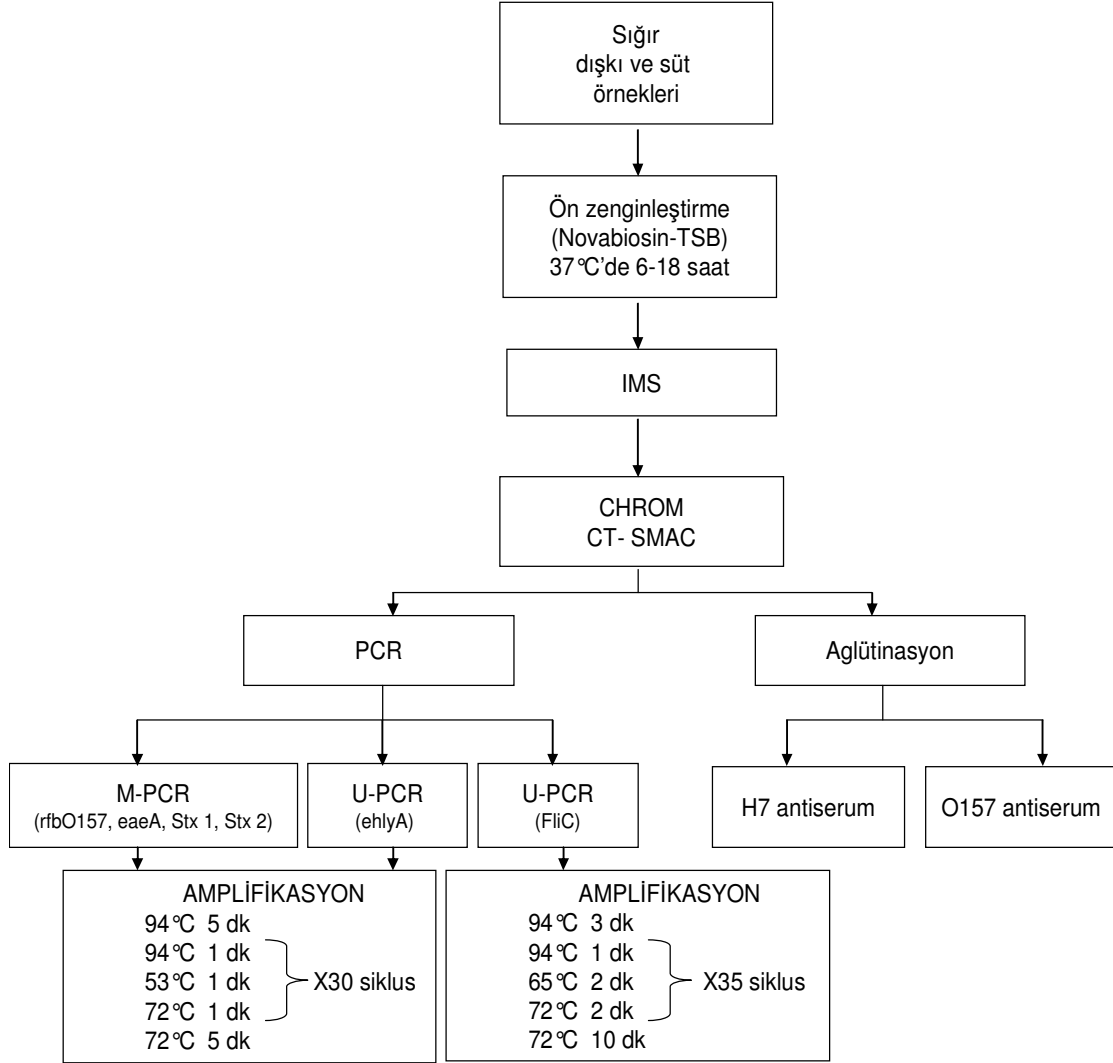
Hazırlanışı: 50 ml 10 X TBE Buffer (Fermentas, Litvanya) 950 ml distile su ile 1000’e tamamlanarak 0.5 X TBE buffer hazırlandı. 0.5 X TBE buffer agaroz jel hazırlanmasında ve elektroforez aşamasında kullanıldı.

Agarose: Agaroz’dan (Sigma, USA, 100gr) 2 gr tartılarak 100 ml 0.5 X TBE ile homojenize edildi. Mikrodalga fırında bir dk. 400W’ta bekletilerek eritildi. 5-6 dk soğumaya bırakıldı. 50 °C civarına kadar soğutulan agaroz 3 µl ethidium bromid ilave edildi ve jel haline getirilerek elektroforez aşamasında kullanıldı.

Ethidium Bromide: Jelde DNA bantlarının görülebilmesi amacıyla kullanılan ethidium bromid’ten 10 mg tartılarak 10 ml distile su ile sulandırılarak stok solusyon hazırlandı ve agaroz jelde hazırlanmasında kullanıldı.

3.2. YÖNTEM

Sığır dışkı ve süt örneklerinden *E. coli* O157:H7 suşunun izolasyon ve identifikasyonunda kullanılan yöntemler Şekil 3.2’de sıra ile verilmiştir.



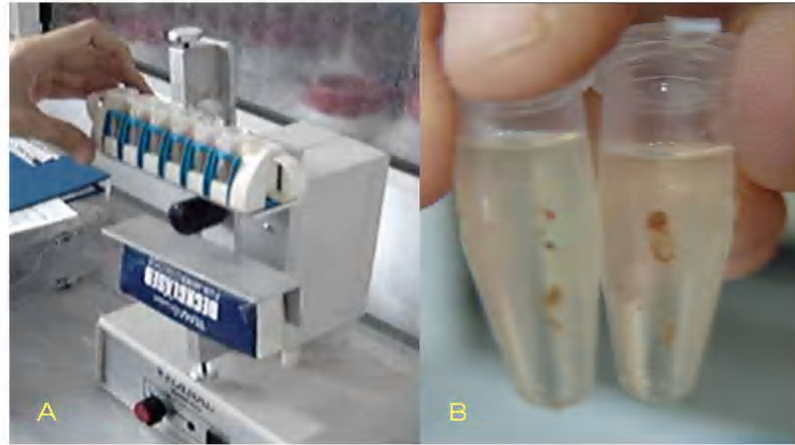
Şekil 3.1. Sığır dışkı ve süt örneklerinde *E. coli* O157:H7 izolasyon ve identifikasyon protokolü

3.2.1.Ön zenginleştirme ve İmmunomanyetik Separasyon

Alınan numuneler 20 mg/l novobiocinli TSB içerisine koyularak soğuk zincir altında laboratuara getirildi ve 37 °C 'de 6-18 saat inkübe edilerek ön zenginleştirmeye tabi tutuldu. İnkubasyon sonrasında immunomanyetik seperasyon işlemine geçildi. Immunomanyetik separasyon işlemi için dynabeads anti *E. coli* O157 boncukları kullanıldı (153).

Ön zenginleştirme sonrası 1 ml örnek steril ependorf içerisine kondu. Bu arada buz dolabından çıkarılan anti-*E. coli* O157 Dynabeads'ler pelet dipten kalkana kadar vortekslendi. İyice homojenize olan boncuklardan 20 µl alınarak ependorfun (örnek +TSB) içerisine kondu. Ependorflar kısa bir vorteksin ardından ağızları sıkı bir şekilde

kapalı olarak mıknatıslı aletin üzerine yerleştirildi. Bu işlem esnasında her seferinde temiz pipet kullanıldı. Alet 10 dk hafif bir devirde ve mıknatıs takılı olmadan çalıştırıldı. Ardından mıknatıs paneli takılarak alet 5 dk'da bu şekilde çalıştırıldı (kahverengi boncuklar ependorfun duvarında toplanmış olarak görüldü) ve 3 dk beklendi. Ependorfun içerisindeki sıvı dikkatli bir şekilde döküldü. Mıknatıs panelini ependorfun arkasından çıkarıldı. Ependorfun içerisine 1ml wash buffer kondu ve kapakları kapatılarak birkaç kez elimizde ters düz olacak şekilde çalkalandı. Ardından mıknatıs paneli takılarak 5 dk bu şekilde çalıştırıldı, durdurularak 3 dk beklendi. Mıknatıs paneli ependorfun arkasından çıkarıldı. Ependorf içerisindeki sıvı dikkatli şekilde döküldü. Daha sonra O157 Dynabead ve bakteri kompleksini 100 µl wash buffer ile sulandırıldı ve kısa süre vortekslendi. Örneklerden 50 µl alınarak CT-SMAC agar ve CHROM agara ekildi ve 37 °C de 18-24 saat inkubasyona bırakıldı. Bu süre sonunda sorbitolü fermente etmeyen pembe ve beyaz renkli kolonilere indol testi uygulandı. Pozitif kültürlerde O157 serogrubunun tanımlanması için lateks aglütinasyon testleri uygulandı (153).



Şekil.3.2. İmmunomanyetik seperasyon işlemi (A) ve dynalbead'lerin işlem sonrası mikrosantrifüj tüplerinin çeperindeki görünümü (B).

3.2.2. Latex Aglütinasyon Testi

3.2.2.1. O Antiserumu İle Lateks Aglütinasyon Testi

Chrom agarda üreyen kolonilerden iğne uçlu öze yardımıyla bir koloni alındı Şüpheli koloni ilave edilen Brain infuzyon brothda 37 °C de bir gece inkübe edildi. İnkubasyon süresi sonunda broth kültürü 90 °C de 1 saat kaynatıldı. Kaynatılan taze kültür kullanılmadan önce bakteriyel tortuların çökmesi için 1 saat masa üzerinde bekletildi. Kaynamış kültür hemen kullanılmayacak ise 4 °C 'de saklanabilir fakat

kullanmadan önce masa üzerinde 1 saat bekletilip birkaç kez aşağı yukarı çevrilir. Kullanmadan önce O antiserumu prospektüse göre sulandırılır. Bu süre sonunda tüp içindeki kültüre 3 damla (180 µl) O antiserumu ilave edildi ve 50-52°C de rutubetli ortamda bir gece bekletildi. Bu süre sonunda tüp nazik bir şekilde yumuşak hareketlerle karıştırıldı ve siyah zemin üzerinde reaksiyon sonucu değerlendirildi. Granüler çöküntü oluşan tüpler pozitif, homojen bulanıklık oluşan tüpler ise negatif olarak değerlendirildi. Tüpteki aglütinasyonlardan lam üzerine alınarak granüler oluşumlar ayrıntılı bir şekilde değerlendirildi (153).

3.2.2.2. H Antiserumu İle Lateks Aglütinasyon Testi

Chrom agarda üreyen şüpheli kolonilerden iğne uçlu öze yardımı ile bir koloni alınarak yarı katı agara inokule edildi ve bir gece 37 °C’de inkubasyona bırakıldı. Bu süre sonunda pastör pipeti yardımı ile alınan hareketli kültür infüzyon brotha aktararak 37 °C’de 6 saat inkübe edildi ve % 0,5 konsantrasyondaki formaldehit ile fikse edildi. Bu süre sonunda tüpteki broth kültürüne 3 damla (180 µl) H antiserumu ilave edildi ve tüpler 50-52 °C ‘de nemli ortamda 1.5-2 saat (max) inkübe edildi. Daha sonra tüp hafif eğilerek siyah zemin üzerinde yapay ışık altında reaksiyon sonucu değerlendirildi (153).

3.2.3. Moleküler İdentifikasyon

3.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Bakteri DNA’sını elde etmek için GF-1 bakteri ekstraksiyon kiti kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi kit protokolünün önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Kısaca, şüpheli bakterilere ait bir gecelik sıvı kültüründen 1-3 ml alındı ve oda ısısında 6000xg’de 5 dakika santrifüj edildi. Tüpün üstünde biriken supernatant atılarak altta kalan pelletin üzerine 100 µl R1 buffer konuldu ve homojenize edildi. Üzerine 10 µl lizozim (50 mg/ml) konarak 37°C’de 20 dakika inkübe edildi. Süspansiyon 10000 x g’de 3 dakika santrifüj edildi. Supernatant atılarak altta kalan pelletin üzerine 180 µl R2 bufferdan ve 20 µl proteinaz K (20 mg/ml) ilave edilerek homojenize edildi. 60°C’lik su banyosunda 20 dakika inkübasyon sonrasında süspansiyon üzerine 20 µl RNase (20 mg/ml) konuldu. Süspansiyon 37°C’de 5 dakika inkübe edilerek üzerine 440 µl BG buffer ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra 60°C’lik su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Süspansiyon bir dakika oda ısısında dinlendirildikten sonra 200 µl absolut etanol ilave edilerek toplama tüpünün kolon kısmına aktarıldı. 10000xg’de 1 dakika santrifüj

edildikten sonra kolonun filtresinin altına geçen sıvı atılarak kolon yeni bir toplama tüpüne alındı ve üzerine 750 µl yıkama bufferından konuldu ve tekrar 10000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpün altında toplanan sıvı atılarak kalan etanolün tamamen uzaklaşması için ek bir santrifüj yapıldı. Spin kolon 1-1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine, önceden ısıtılmış 50-100 µl elution buffer konuldu. İki dakika oda ısısında beklendikten sonra 10000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon atılarak alttaki sıvı PCR'da hedef DNA olarak kullanılmak üzere -20°C 'de saklandı (153).

3.2.3.2. Multipleks PCR

Multipleks PCR reaksiyon karışımının final konsantrasyonu 50µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımı 5 µl DNA örneği, 5 µl 10 X PCR buffer, 6 µl MgCl₂, 1 µl 10 X dNTP, 0.25 µl int Fc, int Rc primerleri, 0.1 µl PF8, PR8, LP 30, LP 31 primerleri, 0.05 µl LP 43, LP 44 primerleri, 0.2 µl Taq polymerase şeklinde hazırlandı (155). Karışımın her biri 200 µl'lik ısıya dayanıklı DNase-RNase free özel PCR tüplerine 45 µl reaksiyon karışımı 5 µl DNA örneği içerecek şekilde dağıtıldı. Amplifikasyon için tüpler thermal cyclere yerleştirildi. DNA amplikasyonu, 94°C'de 5 dk ön denatürasyon işlemi uygulandıktan sonra 94 °C'de 1 dk, 53°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk 30 siklуста ve 72°C'de 5 dk son uzatma olacak şekilde gerçekleştirildi (153).

3.2.3.3.Unipleks PCR

Çalışmada iki ayrı gen bölgesi için iki farklı unipleks PCR yapıldı.

3.2.3.3.1. FliC

PCR reaksiyon karışımının final konsantrasyonu 50µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımı 5 µl DNA örneği, 5 µl 10 X PCR buffer, 3mM MgCl₂, 200 µM dNTP, her bir fliC primerinden 0.5 µM ve son olarak 1U Taq polymerase şeklinde hazırlandı (155). Karışımın her biri 200 µl'lik ısıya dayanıklı DNase-RNase free özel PCR tüplerine 45 µl reaksiyon karışımı 5 µl DNA örneği içerecek şekilde dağıtıldı. Amplifikasyon için tüpler thermal cyclere yerleştirildi. DNA amplikasyonu, 94 °C'de 3 dk ön denatürasyon işlemi uygulandıktan sonra 94 °C'de 1 dk, 65 °C'de 2 dk, 72°C'de 2 dk 35 siklуста ve 72°C'de 10 dk son uzatma olacak şekilde gerçekleştirildi (153).

3.2.3.3.2. EhlyA

PCR reaksiyon karışımının final konsantrasyonu 50µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımı 5 µl DNA örneği, 5 µl 10 X PCR buffer, 3mM MgCl₂, 200 µM dNTP, her bir EhlyA primerinden 0.2 µM ve son olarak 1U Taq polymerase şeklinde hazırlandı (153). Karışımın her biri 200 µl'lik ısıya dayanıklı DNase-RNase free özel PCR tüplerine 45 µl reaksiyon karışımı 5 µl DNA örneği içerecek şekilde dağıtıldı. Amplifikasyon için tüpler thermal cyclere yerleştirildi. DNA amplikasyonu, 94 °C'de 5 dk ön denatürasyon işlemi uygulandıktan sonra 94 °C'de 1 dk , 53 °C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk 30 siklusa ve 72°C'de 5 dk son uzatma olacak şekilde gerçekleştirildi (153).

3.3. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

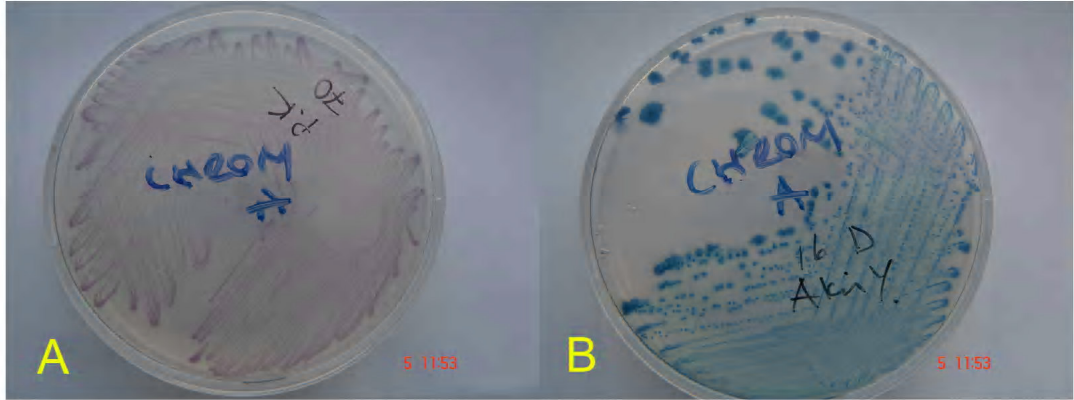
Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde 90 V gerilimde 45 dk elektroforez (ThermoEC250-90) işlemine tabi tutulduktan sonra, UVP jel dökümantasyon işlemi (Vilber Laourmat) kullanılarak görüntülendi (153).

4. BULGULAR

Çalışmada, Kayseri ilindeki farklı bölgeleri temsil edecek şekilde, bir yıllık süre içerisinde kamu ve özel sektöre ait süt sığır yetiştiriciliği yapılan işletmelerdeki çeşitli yaş gruplarına ait sağlıklı sığırlardan 500 adet dışkı ve 500 adet süt örnekleri toplanarak incelendi. 1000 adet numuneye immunomagnetik separasyon işlemi uygulanmış ve süpernatanttan CT-SMAC agar ve CHROM agara ekimleri yapılarak üreyen şüpheli kolonilere, lateks aglütinasyon testi, biyokimyasal testler ve hareket testi uygulandı. Bu koloniler virülens özellikleri açısından moleküler analize tabii tutuldu.

4.1. CT-SMAC Agar ve CHROM Agar EKİM SONUÇLARI

Tespit edilen şüpheli koloniler cefixime tellürite sorbitol Mac Conkey agar (CT-SMAC) ve Chrom agara (CHROM) ekimleri yapıldı ve 37 C’de 24-48 saat inkube edildi. İnkübasyon süresi sonunda CT-SMAC agarda sarı renkli koloniler ve CHROM agarda üreyen pembe renkli veya renksiz koloniler *E. coli* O157:H7 yönünden şüpheli olarak değerlendirildi. Çalışmada yapılan mikrobiyolojik analizler ve biyokimyasal testler sonucunda 500 adet dışkı numunesinden 128’sinde (% 25,6) ve 500 adet süt numunesinin ise 107’sinde (% 21,4) *E. coli* O157 izole edildi.



Sekil 4.1. CHROM agarda pozitif (*E.coli* O157:H7, RHS 232) (A) ve negatif (B) kültürlerin görünümü

4.2. LATEKS AGLÜTINASYON TESTİ

4.2.1. O Antiserumu ile Lateks Aglütinasyon Testi

Chrom agarda üreyen şüpheli kolonilere O antiserumu ile yapılan lateks aglütinasyon testi sonucunda bu örneklerin 7'sinde granüler çöküntünün oluştuğu ve O157 antijeni yönünden pozitif olduğu saptandı.



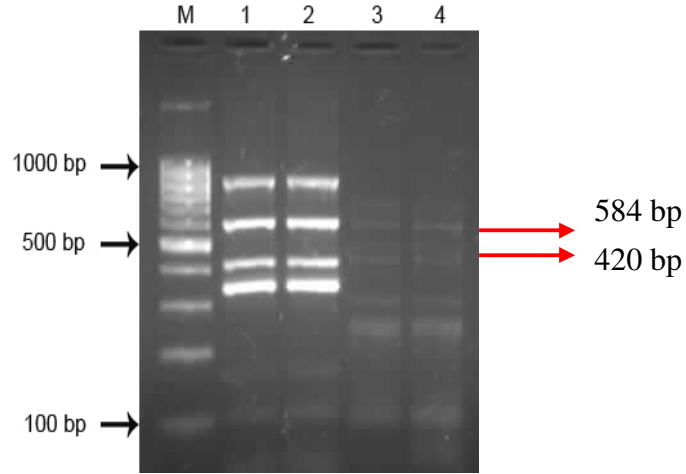
Sekil 4.2. Sığır dışkı ve süt örneklerinden Chrom agarda *E.coli* O157:H7 yönünden şüpheli olarak değerlendirilen kolonilerden O antiserumu ile yapılan latex aglütinasyon testi sonuçları

4.2.2. H Antiserumu ile Lateks Aglütinasyon Testi

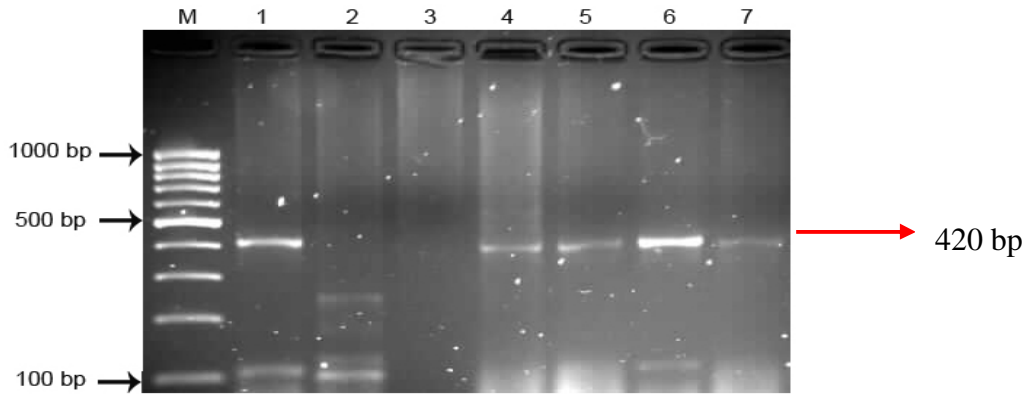
Chrom agarda üreyen şüpheli kolonilere H antiserumu ile yapılan lateks aglütinasyon testi sonucu bu örneklerden hiçbirisinde H 7 antijene rastlanmadı.

4.3. MULTİPLEKS PCR SONUÇLARI

Çalışmada m-PCR reaksiyonu sonucunda yapılan agaroz jel elektroforezinde LPS O157 için 420 bp (base pair), intimin için 840 bp, sigatoksin1 için 348 bp, stx2 için 584 bp büyüklüğünde bant oluşumu beklendi. m-PCR işlemi sonucunda 128 adet sığır dışkı izolatinin 6'sı (% 4,6), 107 süt izolatinin 1'si (%2) *E. coli* O157 olarak identifiye edildi (Şekil 4.3, Şekil 4.4.).



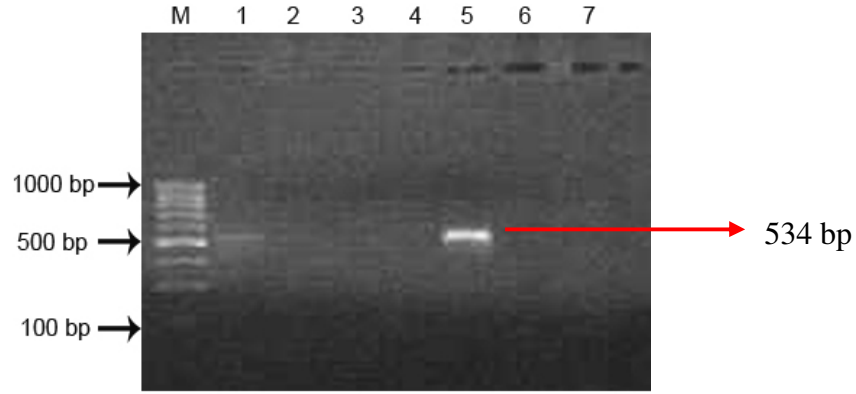
Şekil 4.3. *E.coli* O157:H7 pozitif kontrol suşu (RHS 232) ve sahadan izole edilen şüpheli suşlara uygulanan m-PCR işlemi. M. Marker, 1-2 pozitif kontrol, 3-4 dışkıdan izole edilen iki adet örnekte *rbfO157* ve *Stx2* genlerinin varlığı.



Şekil 4.4. Sahadan izole edilen şüpheli suşlara uygulanan m-PCR sonuçları. M. Marker, 1, 4-7, 4 dışkı ve bir adet süt örneğinde *rbfO157* geninin varlığı.

4.4. UNİPLEKS PCR SONUÇLARI

Çalışmada U-PCR reaksiyonu sonucunda yapılan agaroz jel elektroforezinde H7 için 625 bp, enterohemolizin için 534 bp büyüklüğünde bant oluşumu beklendi. İncelenen örneklerde H7 antijenine ait gene rastlanmaz iken örneklerden bir tanesinde enterohemolizin geni tespit edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *E.coli* O157:H7 pozitif kontrol suşu (RHS 232) ve sahadan izole edilen şüpheli suşlara uygulanan u-PCR işlemi (*EhlyA*). M. Marker, 1. Pozitif kontrol, 5. Bir dışkı örneğinde *EhlyA* geninin varlığı.

4.5. SIĞIR DIŞKI VE SÜTLERİNDEKİ NUMUNELERİNDEKİ *E.COLİ* O157:H7 VE VİRULENS GENLERİN SUŞLAR ARASINDAKİ DAĞILIMI

Çalışmada, 500 adet dışkı numunesinden 128'sinde (% 25,6) ve 500 adet süt numunesinin ise 107'sinde (% 21,4) *E. coli* O157 tespit edildi. İzolatlara uygulanan lateks aglütinasyon testi sonucunda bu örneklerin 7'sinde O157 antijeni tespit edilirken, örneklerin hiçbirinde H7 antijenine rastlanmadı.

mPCR reaksiyonu sonucunda ise m-PCR işlemi sonucunda 128 adet sığır dışkı izolatının 6'sı (% 4,6), 107 süt izolatının 1'si (% 2) *E.coli* O157 olarak tanımlanarak tespit edildi. U-PCR reaksiyonu sonucunda incelenen örneklerde H7 antijenine ait gen tespit edilemedi. Ancak örneklerden bir tanesinde enterohemolizin geni tespit edildi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Sığır dışkı ve sütlerinden izole edilen şüpheli *E.coli* O157:H7 suşlarına uygulanan m-PCR ve u-PCR sonuçları ve virulens genlerin suşlar arasındaki dağılımı.

Örnek no	İlçe ve köyler	Virülens genlerin varlığı					
		m-PCR				u-PCR	
		<i>rbfO157</i>	<i>eaeA</i>	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>ehlyA</i>	<i>fliC</i>
S1 (dışkı)	Elagöz	+	-	-	+	+	-
S2 (dışkı)	Elagöz	+	-	-	-	-	-
S3 (dışkı)	Güneşli	+	-	-	+	-	-
S4 (dışkı)	Güneşli	+	-	-	-	-	-
S5 (dışkı)	Güneşli	+	-	-	-	-	-
S6 (dışkı)	Yeşilhisar	+	-	-	-	-	-
S7 (süt)	Hasanarpa köyü	+	-	-	-	-	-

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Escherichia coli O157, etken ile kontamine hayvansal ürünlerin tüketilmesine bağlı olarak insanlarda hemorajik kolit (HC) ve hemolitik üremik sendrom (HÜS) klinik tablolar oluşturması yanında çok düşük dozlarda alındığında dahi infeksiyon oluşturması sebebiyle önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir (87). Sığırlar *Escherichia coli* O157:H7 için başlıca rezervuarlardır (57).

Bu çalışmada *E. coli* O157:H7 izolasyonunda CT-SMAC besi yerinden yararlanılmıştır. Numuneler ön zenginleştirme amacı ile novobiocinli TSB inokule edildikten sonra inkubasyona alındı. İnkubasyon sonrası ön zenginleştirmede üreyen şüpheli kùltürlere IMS yöntemi kullanıldı. IMS ürünlerinden CT-SMAC agara ve Chrom agara ekilerek etken izolasyonu gerçekteştirildi.

Çalışmada, 500 adet dışkı ve 500 adet süt numunesine IMS işlemleri sonucunda incelenen 500 adet dışkı numunesinden 128'sinde (% 25,6) ve 500 adet süt numunesinin ise 107'sinde (% 21,4) *E.coli* O157 tespit edildi. İzolatlara uygulanan lateks aglütinasyon testi sonucunda bu örneklerin 7'sinde O157 antijeni tespit edilirken, H7 antijenine rastlanmadı. mPCR reaksiyonu sonucunda ise m-PCR işlemleri sonucunda 128 adet sığır dışkı izolatının 6'sı (% 4,6), 107 süt izolatının 1'si (% 2) *E. coli* O157 olarak identifiye

edildi. U-PCR reaksiyonu sonucunda incelenen örneklerde H7 antijenine ait gene rastlanmaz iken örneklerden bir tanesinde enterohemolizin geni tespit edildi.

Etkenin hayvanlardaki prevalansını ortaya koymaya yönelik olarak dünyada ve Türkiye’de pek çok çalışma yapılmıştır. *E.coli* O157 izolasyon oranlarının ülkeler arasında farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir

Chapman ve ark. (117) 4800 sığır dışkısının % 15,7’sinin, Heuvelink ve ark. (154), 540 sığır dışkısı örneğinin %10,6’sının *E. coli* O157 ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Hancock ve ark. (104) ABD’de 11.881 sığırın % 1.8’inde, Chapman ve ark. (155) İngiltere’de 4800 sığırın %12.9 ‘unda, Bornardi ve ark. (156) İtalya’da 450 sığırın %13.1’inde Rogerie ve ark.(157) Fransa’da 851 sığırın % 2.6’sında *E.coli* O157 ‘nin bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada 500 adet sığır dışkısının % 4,6’sında *E. coli* O157 tespit edilmiştir. Sığır dışkı örneklerinden elde edilen değerler araştırmacıların çalışmaları ile kıyaslandığında Hancock ve ark. ile Rogerie ve ark.’nın bulgularından yüksek iken diğer araştırmacıların (Caphman, Heuvelink, Bornardi) bulgularından düşüktür. Bunun nedeni numunelerin alındığı işletmelerdeki personelin hijyenik durumları ile ilgili olabilir.

Avrupa’da en yüksek izolasyon oranına İngiltere’deki sığırlarda rastlanmıştır (1995-96 yılı %15.7, 2001 %12.9). Ülkemizdeki oranlar (%1-5) bir çok Avrupa ülkesinde tespit edilen oranlardan daha düşük olmakla birlikte ABD’de tespit edilenlerden de yüksektir (158).

Okrend ve ark. (115) karışık bakteriyel kültürlerden, et örneklerinden ve doğal kontamine sığır dışkısından *E.coli* O157 izolasyonu için IMS yönteminin hassas olduğunu göstermişlerdir.

Coia ve ark. (159), inceledikleri 500 çiğ süt örneğinde *E. coli* O157 varlığına rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Massa ve ark.’nın (160) çeşitli çiftliklerdeki süt tanklarından topladıkları 100 çiğ süt örneğinde yaptıkları bir çalışmada *E. coli* O157:H7 izolasyonunun gerçekleştirilemediği bildirilmiştir. Benzer şekilde, 1011 çiğ süt örneğinin incelendiği bir çalışmada, immunomanyetik separasyon yöntemi kullanıldığı halde, örneklerin hiç birinden VTEC O157 izolasyonu yapılamadığı belirtilmiştir.

İnek ve keçilere ait toplam 144 çiğ süt örneğinin incelendiği bir çalışmada, izole edilen 12 *E. coli* suşunun 1’nin *E. coli* O157 olduğu bildirilmiştir (161).

Wells ve ark. (75) 1266 sağlıklı süt ineği dışkısı ve sütünde etkeni araştırmışlar ve 18 dışkı ve 1 çiğ süt örneğinde etken saptanmış, Abdul-Raouf ve ark.'nın (162) pastörize edilmemiş 50 inek sütünde *E. coli* O157:H7 izolasyonuna yönelik yaptıkları çalışmada, sütlerin 3'ünde izolasyonun gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada ön zenginleştirme yapılmadan direkt ekim sonrasında izolasyon yapılamazken, modifiye tryptone soy broth'da (mTSB) yapılan ön zenginleştirme sonucu izolasyon yapılabildiği de bildirilmiştir. Süt ineklerinin *E.coli* O157:H7 açısından önemli bir kaynak olduğu görüşü desteklenmiştir. Bu çalışmada ise incelenen 500 adet çiğ süt örneğinin sadece 1 tanesinden (% 2) *E. coli* O157 tespit edildi. Süt örneklerinden elde edilen sonuçlar kıyaslandığında Coia ve ark. (159), Massa ve ark. (160)'nın değerlerinden yüksek, Picozzi ve ark. (161) değerleri ile paralel iken Abdul-Raouf ve ark.'nın (162) bulduğu değerlerden daha düşük oranda olduğu görülmektedir.

Heuvelink ve ark. (154) 1998'de Hollanda'da 1011 çiğ süt örneğin IMS uygulayarak yaptıkları çalışmada VTEC O157 izole edemediklerini bildirmişlerdir. Coia ve ark. (159) Avrupa ve Kuzey Amerika'da yapılan çalışmalar da sığır sürülerinin yaklaşık %4'ünde VTEC O157 için pozitif olduğu bildirilmiştir.

STEC'nin sığırlardaki kolonizasyon oranının %0.1-16 arasında değiştiği ve izolasyon oranının genç sığırlarda yaşlı sığırlara göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir(7, 163)

Türkiye'de Aslantaş ve ark. (153), yaptıkları çalışmada Hatay bölgesinde 565 adet sığır dışkı örneklerinden 77'sinde (%13,6) *E.coli* O157 saptamışlardır. İstanbul bölgesinde 330 sığırdan yapılan araştırmada % 53,9 oranında *E.coli* O157:H7 bulunduğu bildirilmiştir (169).

Yılmaz ve ark. (57) kültür yöntemine göre daha hassas bir yöntem olan immunomanyetik ayırma yöntemini kullanmıştır. Bu çalışmada, 330 sığırın % 4.2 'sinde *E.coli* O157:H7 pozitifliği tespit edilmiş olup genç ve erkek sığırlardaki izolasyon oranlarının daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Aksoy ve ark. (164) Kırıkkale ilindeki sığırlardan aldıkları 502 adet dışkı örneklerinde % 2.5 oranında *E.coli* O157 ve %1.7 oranında ise O157:H7 bulunduğunu bildirmişlerdir.

Sığır ve koyun dışkılarında *E. coli* O157:H7 prevalansının belirlenmesine yönelik bir başka çalışmada ise 406 sığıra ait rektum mukozasından alınan svap örneğinde, izole edilen 10 izolatın 7'sinin (% 1,7) *E. coli* O157:H7, 3'ünün (% 0,7) ise *E. coli* O157 olduğu, ayrıca erkek ve 3 yaşın altındaki hayvanlardan izolasyonun daha yüksek olduğu bildirilmiştir (164). Çabalar ve ark. (165), Van'daki sağlıklı süt ineklerinde yaptıkları bir çalışmada 312 dışkı örneğinden %1.3'ünde *E. coli* O157:H7 saptadıklarını belirtmişlerdir.

Akkuş (126), kontaminasyon kaynağını göstermek amacıyla çalışmasına dahil ettiği 20 genç ve 60 erişkin sığır dışkı örneğinden 4'ünde (% 5) *E. coli* O157:H7 saptadığını, bunlardan 1'inin genç sığır, 3'ünün de erişkin sığır dışkı örneklerine ait olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada *E.coli* O157 izolasyon oranı %2.6 olarak tespit edilmiştir. Sığırlardaki *E.coli* O157 izolasyon oranlarını tespit etmek amacıyla yapılan çalışmalarda farklı oranların bulunması, kullanılan izolasyon yöntemindeki farklılıkların yanı sıra mevsimsel ve coğrafik farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Ülkemizde yapılan bu çalışmalarda tespit edilen izolasyon oranları %1-5 arasında değişmektedir.

Öksüz ve ark.'nın (166) çiğ süt ve çiğ süttten yapılmış peynirlerde *E. coli* O157 insidensine yönelik yaptıkları bir çalışmada 100 çiğ süt örneğinden sadece 1'inde *E. coli* O157 tespit edildiği bildirilmiştir. Bunun sebebi etkenin izole edildiği hayvanın meme başının etken ile kontamine olmasına bağlayabiliriz. Çiğ süt ve peynir örneklerinde enterohemorajik *E. coli*'ye rastlanma sıklığının araştırıldığı bir başka çalışmada, incelenen 20 çiğ süt örneğinin hiçbirinde *E. coli* O157:H7'nin saptanamadığı belirtilmiştir (29).

Bu çalışmada incelenen süt numunelerinin bulguları, Öksüz ve ark. yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Bu çalışma ile ülkemizde ve dünya ülkelerindeki sığırlardaki ve sütlerdeki *E.coli* O157 izolasyon oranlarının belirlenmesine yönelik araştırmalar kıyaslandığında farklı oranların bulunması, kullanılan izolasyon yöntemlerindeki farklılık, coğrafik, hayvanların beslenmesi ve süt sağım esnasındaki hijyenik koşullarının farklılığı yada işletmelerdeki personel temizliği gösterilebilir. Yine bu çalışmadan farklı olarak incelen hayvanların yaş grupları ve cinsiyetleri de oransal değişimde etkili olabilir.

İzolasyon oranlarının mevsimsel farklılıklar gösterdiği ve sporadik vakalara daha çok yaz aylarında rastlandığı belirtilmiştir. O157'nin hareketli olmayan türleri ise daha çok kışın enfeksiyon oluşturmaktadır (164).

Sütün etken ile kontaminasyonu sağım esnasında hijyenik kurallara dikkat edilmemesi ve kros kontaminasyonlar ile gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir. Yine meme başının dışkı ile kontaminasyonu sonucunda sütün etkenle bulaşmış olabileceği de düşünülmektedir.

İneklerde klinik mastitis vakalarında izole edilen *E.coli* suşlarında bazı virülens genlerinin araştırılması amaçlanan bir çalışmada 2000-2005 yılları arasında her biri farklı sürüye ait 100 *E. coli* suşu incelenmiştir. Shiga toksin 1 ve 2 (Stx1 ve Stx2), intimin (eaeA), heat-stable enterotoxin a (Sta), F5 (K99), F41 ve F17 fimbrial genleri kodlayan iki ayrı multipleks PCR uygulanmış PCR testleri sonucunda 9 suş f17 fimbria geni ve sadece 1 suş eaeA geni pozitif bulunmuş. Sonuçlar klinik inek mastitislerinden izole edilen *E. coli* suşlarında araştırılan potansiyel virülens faktörlerinin hiçbirinin yaygın olarak bulunmadığını göstermiş. İneklerde mastitis vakalarından izole edilen *E.coli* suşları arasında PCR yöntemi ile insanlarda hastalık oluşturma ihtimaline sahip shiga toksin üreten *E.coli* (STEC) tespit edilmemiştir (167).

Sonuç olarak, Kayseri ili ve çevresindeki işletmelerdeki süt sığırlarının dışkısında ve sütlerinde *E. coli* O157 belirlenmiştir. Belirlenen kontaminasyon oranının düşük düzeylerde olduğunu, bununla birlikte Kayseri ilinde hijyen kurallarına dikkat edilmesi gerektiği kanısına varılmıştır. Evcil hayvanların özellikle süt sığırların etken için rezervuar olmasından dolayı insan sağlığı açısından önemli bir tehlike oluşturmaktadır. *E. coli* O157 insanlar için önemli sağlık problemlerine neden olduğu ve ürettiği toksinlerden dolayı besin zehirlenmelerine neden olduğu için etkeni taşıyan sütlerin çiğ yada işlenmemiş ürün olarak sunulması tüketici sağlığı yönünden önemli bir risk faktörü olabilir. Yetersiz hijyenik koşullar nedeni ile sütler *E. coli* O157 ile kontamine olmaktadır. Tüm dünyada önemli bir hayvansal gıda olan süt, Türkiye'de genellikle çiğ olarak satışa sunulmaktadır. Çiğ sütlerin *E. coli* O157 ile kontamine olması sonucunda sütün kalitesini ve hijyenini önemli ölçüde bozulmaktadır. Etkenin ısıl işleme duyarlı olması nedeni ile sütlerin pastörize edilmesi etken inaktive edilebilir. Ayrıca tüketici sağlığı açısından HACCP (Hazard Critical Control Point) sisteminin uygulamaya konulması önemlidir. Bütün bu bilgiler ışığında, hayvan sağlığından

başlayarak, tarımsal üretimden, gıdaların işlenmesi ve hazırlanmasına kadar olan prosesin her basamağında kontrol önlemlerinin alınması gerekmektedir Sağımda kullanılan araç ve gereçlerin, sağımdan sonra kullanılan saklama ve taşıma kaplarının temizliğine dikkat edilerek sütte *E. coli* O157 üremesi ve kontrol altına alınabilir ya da en aza indirilebilir. Yine iğ ve pişmiş gıdalardan kaynaklanabilen direkt ve indirekt kros kontaminasyonlar ve personel hijyeni konularında eğitilmesi, bakterinin insanlara geçişini minimuma indirgemedede önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Padhye NV, Doyle MP. *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. J Food Protect 1992; 55: 555-565.
2. Töreci K, "Escherichia türleri" Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, 2002; cilt 2, ss 1564-1574.
3. Liu Y, Gilchrist A, Zhang J, Li XF. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 bacteria in drinking water and river water. Appl. Environ. Microbiol., 2008; 74(5): 1502-7.
4. Emery DA, Nagoraja KV, Shaw DP, Newman JA, Eells DG. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with coliseptisemic chickens and Turkey. Avian Dis., 1992; 36: 504-511.
5. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins 2000; pp 179-180.
6. Whipp SC. Rasmussen MA, Cray WC. Animals as a source of *Escherichia coli* pathogenic for human beings. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1994; 204: 1168-1175.
7. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 142-201.

8. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Veterinary Microbiology and Microbial Disease, Iowa: Blackwell Publishing Professional 2002; p:106-113.
9. Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Akay Ö, İzgür M, Diker SK, Kahraman M, Ilgaz A.: Özel Mikrobiyoloji, Medisan Yayınevi 1997; No:26 Ankara.
10. Bısping W, Amsberg G. Colour Atlas for The Diagnosis of Bacterial Pathogens in Animals. Berlin and Hamburg: Paul Parey Scientific Publishers 1988; pp 160-168.
11. http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli.
12. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Tanı Şafak Matbacılık ,4 .Basım. Ankara 2004.
13. Tunail N. Mikrobiyolojik enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar. İn: Akçelik M, Aydar LY, Ayhan K, Çakır İ, Doğan HB, Gürgün V, Halkman K, Kuleşaan H, Özkaya DF. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Armoni Matbacılık Ltd Şti Ankara, 1999; 59-90.
14. Halkman AK, Noveir MR, Doğan HB. *Ecsherichia coli* O157:H7 serotipi. Orkim Ltd Şti. Ankara 2001; 2-35.
15. İzgür, M. Koli İnfeksiyonları. İn: Kanathı Hayvan Hastalıkları. Ed: M. İzgür, M. Akan: Medisan Yayınevi, Ankara. 2002; pp: 55-59.
16. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins., 2000; pp 179-180.
17. Leclerc H, Schwartzbord L. Dei-Cas E.Mikrobial agents associated with waterborne diseases. Crt. Rev. Microbiol. 2002; 28: 371-409.
18. İzgür M. Fakültatif Anaerobik Gram Negatif Çomaklar. İn: Özel Mikrobiyoloji. Ed: Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS. Medisan Yayınevi, Ankara 1999; pp 45-86.
19. Doyle MP, Zhao T, Meng J, Zhao S. *Escherichia coli* O157:H7. In "Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Eds M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville. ASM Pres, Washington DC 1997; 768 p". pp 171-191.
20. Kuntz TB, Kuntz ST. Enterohemorrhagic *E.coli* infection. Prim Care Update OB/GYNS 1999; 6: 192-196.
21. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. Vet. Res., 1999; 30: 259-284.
22. Bekar M. Enterobactericea Familyası Mikroorganizmaların Genel Karakterleri ve Tanı Yöntemleri. Etlik Vet Kont Arş Enst, Ankara 1997; ss 56-87.

23. Keskintepe H. İnsan ve Hayvanlarda Enteropatojenik *Escherichia coli* infeksiyonları. İ.Ü Vet Fak Derg 1976; 3(2): 30-46.
24. Öngen B. *Escherichia coli* infeksiyonlarında laboratuvar tanısı Aknem Derg 2008; 22(2 Ek): 197-210.
25. Buchanan LR, Doyle MP. Foodborne Disease Significance of *Escherichia coli* O157:H7 and Other Enterohemorrhagic *E.coli* .Food technology 1997; 51(10)
26. Park S, Worobo R, Durst R. *Escherichia coli* O157:H7 As an Emerging Foodborne Pathogen: A Literature Review. Crt. Rev. Food Sci Nutrition 1999; 39(6): 481-502.
27. Mamıl J. Shiga/ verocytotoxins and shiga/ verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. Vet .Res., 1999; 30: 235-257.
28. Thapar N, Sanderson I. Diarrhoea in children; an interface between developing and developed countries. The Lancet 2004; 363: 641-653.
29. Gönül SA, Karapınar M. *Escherichia coli* patojenitesi ve gıdalardaki önemi. Tr. J. Biology., 1994; 18: 47- 60.
30. Karapınar M, Gönül ŞA. Gıda kaynaklı hastalıklar "Gıda mikrobiyolojisi, Yazarlar Ünlütürk A, ve Turantaş F. 1.Baskı. Mengi Tan Basımevi 1998; ss 109-164.
31. Whipp SC. Rasmussen MA, Cray WC. Animals as a source of *Escherichia coli* pathogenic for human beings. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1994; 204: 1168- 1175.
32. Milon A, Oswald E, Rycke JD.Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*.. Vet. Res., 1999; 30: 203- 219.
33. Krishnan C, Fitzgerald VA, Dakin SJ, Behme RJ. Laboratory investigation of outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7. J. Clin. Mikrobiol., 1987; 5(6): 1043-1047.
34. Willke A. *Escherichia coli* ishallerinde etiyoloji ve patogenezi. Ankem Derg., 2008; 22(Ek 2):188-191.
35. Alışarlı M, Akman HN. Perakende satılan kıymaların *E.coli* O157 yönünden incelenmesi YYÜ Vet Fak Derg., 2004;15(1-2): 65-69.
36. Fantelli K, Stephan R. Prevalence and characteristics of shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. İnt. J. Food Microbiol., 2001; 70: 63-69.
37. Scott L, McGee P, Minihan D, et al. The characterization of *E.coli* O157:H7 isolates from cattle faeces and feedlot environment using PFGE. Vet. Microbiol., 2006 (in press).

38. Watt B. *Escherichia coli* O157 a new pathogen? Microbiol Sci 1988; 5: 279.
39. Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E.coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol. Rev., 1991; 13: 60-98.
40. Doyle MP. *Escherichia coli* O157:H7 and its Significance in Foods. Int. J. Food Microbiol., 1991; 12: 289-302.
41. Noveir MR, Halkman AK. A Study on Selective Broths and Agar Media for the Isolation of *E. coli* O157:H7 serotype. TÜBITAK Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi. 2000; 24(5): 459-464.
42. Padhye NV, Doyle MP. Rapid Procedure For Detecting Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Food Appl. Environ. Microbiol., 1991; 57(9): 2693- 2698.
43. Anonymous. Enhanced detection of sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infections, New Jersey, July 1994. CDC MMWR Weekly.1995, 44(22): 417- 418.
44. Kehl SC. Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. J. Clin. Microbiol., 2002; 40: 2711-2715.
45. Ratnam S, March SB, Ahmed R, Bezanson GS, Kasatiya S. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. J. Clin. Microbiol., 1988; 26: 2006-2012.
46. Ware JM, Abbott SL, Janda JM. A new diagnostic problem: isolation of *Escherichia coli* O157:H7 strains with aberrant biochemical properties. Diag. Microbiol. Infect. Dis., 2000; 38: 185-187.
47. Karch H, Bielaszewska M. Sorbitol-fermenting shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. J. Clin. Microbiol., 2001; 39: 2043-2049.
48. Bettelheim KA, Whipp M, Djordjević SP, Ramachandra V. First isolation outside Europe of sorbitol-fermenting verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) belonging to O group O157. J. Med. Microbiol., 2002; 51: 713-714.
49. Doyle MP, Schoeni JL. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. Appl. Environ. Microbiol., 1984; 48: 855- 856.
50. Russell JB, Diez-Gonzales F, Jarvis GN. Invited review: Effects of diet shifts on *Escherichia coli* in cattle. J.Dairy. Sci., 2000; 83: 863- 873.
51. Leyer GJ, Wang LL, Johnson EA. Acid Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 Increases Survival in Acidic Foods. Appl. Environ. Microbiol., 1995; 61(10): 3752-3755.

52. Buchanan RL, Edelson SG. pH Dependent Stationary-Phase Acid Resistance Response of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the Presence of Various Acidulants. J. Food Protect., 1999; 62(3): 211-218.
53. Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E.coli* J. Appl. Microbiol., 2000;88: 729-745.
54. Magnuson BA, Davis M, Hubele S, et al. Ruminant gastrointestinal cell proliferation and clearance of *Escherichia coli* O157:H7. Infect. Immun., 2000; 68: 3808-3814.
55. Chalmers RM, Aird H, Bolton FJ. Waterborne *Escherichia coli* O157. Sym. Ser. Soc. Appl. Microbiol., 2000; 29:124S-132S.
56. Lira WM, Macedo Marin JM. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. J. Appl. Microbiol., 2004; 97: 861-866.
57. Yılmaz, A, Gun H, Yılmaz H. Frequency of *Escherichia coli* O157:H7 in Turkish cattle. J Food Protect., 2002; 10: 1637-1640.
58. Smith HR, Scotland SM. Verocytotoxin Producing strains of *E. coli*. J. Med. Microbiol., 1988; 26: 77-85.
59. Padhye NV, Doyle MP. *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. J. Food Protect., 1992;55: 555-565.
60. Sandvig K, Deurs B. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. EMBO J., 2000; 19(22): 5943-50.
61. Kimmitt PT, Harwood CR, Barer MR. Toxin Gene Expression by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: the Role of Antibiotics and the Bacterial SOS Response. "Emerging Infect. Dis.,". 2000; 6: 458-65.
62. Zhu F, Rogelj S, Kieft TL. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 immunomagnetic separation and real-time PCR. Int. J. Food Microbiol., 2005; 99: 47-57.
63. Osek J. Development of a multiplex PCR approach for the identification of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. J. Appl. Microbiol., 2003; 95: 1217- 1225.
64. Jores J, Rumer L, Wieler LH. Impact of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island on the evolution of pathogenic *Escherichia coli*, Int. J. Med. Microbiol., 2004; 294:103-113.

65. Jarvis KG, Girón JA, Jerse AE, McDaniel TK, Kaper JB. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Protect. Natl. Acad. Sci.*, 1995; 92: 7996-8000.
66. Jerse Y, Kaper B, Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 *Molecular Microbiol.*, 1991 Volume 6, Issue 3 , Pages 411 – 417.
67. Donnenberg MS, Kaper JB, Finlay BB. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol.*, 1997; 5(3): 109-114.
68. Kenny B, Lai LC, Finlay BB, et al. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Molecular Microbiol.*, 1996; 20: 313-323.
69. Lai HL, Huston J, Kuhlmann S, et al. Improved patron distributions from global analysis of recent deep inelastic scattering and inclusive jet data. *Physical Rev. D.*, 1997; 55: 1280-1296.
70. Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ et al. A novel EspA associated surface organelle of Enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *The EMBO J.*, 1998; 17: 2166-2176.
71. Mellies JL, Elliott SJ, Sperandio V, et al. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler) *Molecular Microbiol.*, 1999; 33(2): 296-306.
72. Halkman AK, MR, Doğan HB. Çeşitli Hayvansal Gıda Ürünlerinde *E. coli* O157:H7 Aranması. TÜBİTAK-VHAG- 1192 Nolu Proje. Ankara Basılmamış 1998; ss 75.
73. Wray C, Mclaren IM, Randall LP, Pearson GR. Natural and experimental infection of normal cattle with *Escherichia coli* O157. *Vet. Rec.*, 2000; 147: 65-68.
74. Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, O'Brien AD, Moon HW. Bovine Infection with *Escherichia coli* O157:H7. In: *Escherichia coli* O157 in Farm Animals. Ed: Stewart CS, Flint HJ. Wallingford, UK: CABI Publishing 1999; p: 51-58.
75. Wells JG, Shipman LD, Greene KD, et al. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other shiga-like-toxin-producing *E.coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 1991; 29: 985-989.

76. Garber L, Wells S, Schroeder-Tucker L, Ferris K. Factors associated with fecal shedding of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on dairy farms. J. Food Protect., 1999; 62: 307-312.
77. Wang G, Zhao T, Doyle, MP. Survival and Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Unpasteurized and Pasteurised Milk. J. Food Protect., 1997; 60(6): 610-613.
78. Maule A. Survival of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in Soil, Water and on Surfaces. J. Appl. Microbiol., 1999; 87(1) : ss10.
79. Fukushima H, Hoshina K, Gomyoda M. Long-Term Survival of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 in Bovine Feces. Appl. Environ. Microbiol., 1999; 65(11): 5177-5181.
80. Anon. [http:// www.cfsan.fda.gov/~mow/chap15.html](http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap15.html).
81. Wang G. and Doyle MP. Survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. J. Food Protect., 1998; 61: pp. 662–667.
82. Morgan D, Newman CP, Hutchinson DN, et al. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of yoghurt. Epidemiol. Infect., 1993; 111: 181- 187.
83. Fenlon DR, Wilson J. Growth of *Escherichia coli* O157 in poorly fermented laboratory silage: a possible environmental dimension in the epidemiology of *Escherichia coli* O157. Lett. Appl. Microbiol., 2000; 30: 118-121.
84. Avery LM, Williams AP, Killham K, Jones DL. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in waters from lakes, rivers, puddles and animal-drinking troughs. Sci.The Total Environ., 2008; 339 (2-3): 375-378.
85. Rice EW, and Johnson CH. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle drinking water, J. Dairy. Sci., 2000; 83: pp 2021–2023.
86. McGee P, Bolton DJ, Sheridan JJ, et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in farm water: its role as a vector in the transmission of the organism within herds. J. Appl. Microbiol., 2002; 93 pp: 706–713.
87. Warburton DW, Austin JW, Harrison BH, Sanders G. Survival and Recovery *E.coli* O157:H7 in Inoculated Bottled Water. J.Food Protect., 1998; 61(8): 948-952.
88. Rajkowski KT, Rice EW. Recovery and Survival *E.coli* O157:H7 in Reconditioned Pork-Processing Wastewater. J. Food Protect., 1999; 62 (7): 731-734.

89. Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris J. GEmerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of developed world. *Epidemiol. Rev.*, 1996;18: 29-51.
90. Nelson AM, Horsburg CR. Pathology Emerging of Infection 2. In: Slutkars L, Guarner J, Griffin P, eds. *Escherichia coli* O157:H7. ASM Pres, Washington DC.1998; 259-27.
91. Peacock E, Jacob VW, Fallone SM. *E.coli* O157:H7: Ethiology clicical features complications and treatment.nephrology nursing Journal. 2001;28:5,547-554.
92. Teo Y, Raynor TJ, Ellajosyula KR, Knabel SJ. Synergistic Effect of High Temperature and High pH on the Destruction of Salmonella enteritidis and *E.coli* O157:H7. *J.Food Protect.*, 1996; 59(10): 1023- 1030.
93. Wright JR, Sumner SS, Hackney CR, Pierson MD, Zoecklein BW. Efficacy of Ultraviole Light for Reducing *E.coli* O157:H7 in Unpasteurized Apple Cider. *J. Food Protect.*, 2000; 63: 563-567.
94. Locking ME, O'brien SJ, Reilly WJ, Wright EM, Campbell DM, Coia JE, Browning LM, Ramsay CM. Risk factors for sporadic cases of *Escherichia coli* O157 infection: the importance of contact with animal excreta. *Epidemiol. Infect.*, 2001;127: 215-220.
95. Griffin PM, Tauxe RV. Shiga-like Toxin-Producing *E.coli* Infections, The Epidemiology of Infections Caused by *E.coli* O157:H7, Other Enterohemorrhagic *E.coli* and Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Epidemiol. Rev.*, 1991; 13: 61-91.
96. Rickert K, Albrecht JA, Bullerman LB, Sumner SS. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on broccoli, cucumber and gren pepper. *Dairy. Food Environ. Sanit.*, 2000; 20: 24-28.
97. Swerdlow DL, Woodrijff BA, Brady RC, et al. A water borne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhoea and death. *Ann. Intern. Med.*, 1992; 117: 812-818..
98. Chapman PA, Wright DJ, Higgins R. Untreated milk as a source of verotoxigenic *E.coli* O157:H7. *Vet. Rec.*, 1993a; 133: 171-172.
99. Dorn CR. *Escherichia coli* O157:H7. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1995; 206: 1583-1585.
100. Pell AN. Manure and microbes: Public and animal health problem. *J. Dairy. Sci.*, 1997; 80: 2673-2681.
101. Mead PS, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet.*, 1998; 352: 1207 -1212.

102. Karmali MA, Petric M, Lim C, et al. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 1985; 151: 775-782.
103. Lahti E, Ruoho O, Rantala L, Hänninen ML, Honkanen B T. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in a cattle finishing unit. Appl. Environ. Microbiol., 2003; 69: 554-561.
104. Hancock DD, Besser TE, Rice DH, Dargatz DA, Thomas LA. Epidemiology of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. J Food Protect., 1997; 60: 462-465.
105. Chapman PA, Siddons CA, Wright DJ, et al. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. Epidemiol. Infect., 1993b; 111: 439-447.
106. Syngé BA. (Veterinary significance of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157. World J. Microbiol. Biotech., 2000; 16: 725-732.
107. Anon <http://www.c.d.c.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli.g.htm>.
108. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology. In: GRAY LD, eds. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*. ASM Press, Washington DC 1995; 450-452.
109. Johnson JL, Rose BE, Sharar AK, et al. Methods Used for Detection and Recovery of *E.coli* O157:H7 Associated with a Food-Borne Disease Outbreak. J. Food Protect., 1995; 58(6): 597-603.
110. Remis RS, MacDonald KL, Riley LV, Puhner ND. Sporadic Cases of Hemorrhagic Colitis Associated with *Escherichia coli* O157:H7. Ann. Int. Med., 1984; 101: 624-626.
111. Dundos S, Todd WA. Clinical View of VTEC. J. Appl. Microbiol., 1999; 87(1): S5.
112. Chapman PA. Methods available for the detection of *Escheria coli* O157 in clinical, food and environmental samples. World J. Microbiol. Biotech., 2000; 16: 733-740.
113. Tutenel AV, Pierard D, Vandekerckhove D, Hoof JV, De Zutter L. Sensitivity of methods for the isolation of *Escherichia coli* O157 from naturally infected bovine faeces. Vet Microbiol., 2003; 94: 341- 346.
114. Smith HR, Scotland SM. Isolation and identification methods for *Escherichia coli* O157 and other vero cytotoxin producing strains. J. Clin. Pathol., 1993; 46: 10-17.

115. Okrend AJG, Rose B, Lattuada CP. Use of 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-b-D-glucuronide in MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. J. Food Protect., 1990; 53: 941-943.
116. Tomayasu T. Improvement of the immunomagnetic separation method selective for *Escherichia coli* O157 strains. Appl. Environ. Microbiol., 1998; 64: 376-382.
117. Chapman PA, Malo ATC, Siddons CA, Harkin M. Use of commercial enzyme immunoassays and immunomagnetic separation systems for detecting *Escherichia coli* O157 in bovine fecal samples. Appl. Environ. Microbiol., 1997; 63: 2549-2553.
118. March SB, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey medium for detection *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J. Clin. Microbiol., 1986;23: 869-872.
119. Chapman PA, Siddons CA, Zadik PM, Jewes L. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. J. Med. Microbiol., 1991; 35: 107-110.
120. Zadik PM, Chapman PA, Siddons CA. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. J. Med. Microbiol., 1993; 39: 155-158.
121. Manafi M, Kremsmaier B. Comparative evaluation of different chromogenic/fluorogenic media for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in food. Int. J. Food Microbiol., 2001; 71: 257-262.
122. Noveir MR, Doğan HB, Halkman AK. A note on *Escherichia coli* O157:H7 serotype in Turkish meat products. Meat Sci., 2000; 56: 331-335.
123. March SB, Ratnam S. Latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* serotype O157. J. Clin. Microbiol., 1989; 27: 1675-1677.
124. Beutin L, Prada J, Zimmermann S, Stephan R, Ørskov I, Ørskov F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E.coli* (EPEC). Zbl Bakt Hyg A 1988; 267: 576-588.
125. Farmer JJ, Davis BR. H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J.Clin. Microbiol., 1985; 22: 620-625.
126. Akkuş F. Hazır sığır kıymalarında verotoksin oluşturan *Escherichia coli* O157:H7 izolasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü 1996.
127. Tison DL. Culture Confirmation of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 by Direct Immunofluorescence. J. Clin. Microbiol., 1990; 28(3): 612-613.

128. Boer ED, Heuvelink AE. Methods for the Detection and Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Symp. Ser. Appl. Microbiol., 2000; 29:133S-143S.
129. Feng PCS, Lum R, Chang G. Identification of *uidA* Gene Sequence in Beta-D-glucuronidase negative *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., 1991; 57:320-323.
130. Barrett TJ, Green J.H, Griffin PM, Pavia AT. Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection Antibodies to shiga-Like Toxin 1, shiga-Like Toxin 2 and *Escherichia coli* O157:H7 Lipopoly-saccharide In Human serum. Current Microbiol., 1991; 23: 189-195.
131. Park CH, Vandel NM., Hixon DL. Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 directly from stool specimens. J. Clin. Microbiol., 1996; 34(4):988-990.
132. Blais BW, Booth RA, Phillippe L, Pandian S. Polymacron Enzyme Immunoassay System for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Inoculated into Foods. J. Food Protect., 1995; 60(2):98-101.
133. Çakır I. *Escherichia coli* O157:H7 "Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, Alınmıştır Sim Matbaacılık Ltd. ss 522.
134. Chemaly RF, Prdocop GW, Sarıbaş Z, Arıkan S. Patojen mantarların moleküler yöntemlerle saptanması ve tanımlanması. In: Persing DH, Tenover FC, Versolovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, Ustaçelebi Ş (Editörler). Moleküler Mikrobiyoloji tanı Prensipleri ve Uygulamalar Ankara, Palme Yayıncılık 2006; pp 551-559.
135. Abacıoğlu H. Moleküler yöntemlerde yeni gelişmeler ve yeni teknolojiler. KL;M;K Adana 2001 kitabında ,ss 191-2.
136. Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi.
137. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya 2001:39 Erensoy E. Mantarların saptanmasında moleküler biyolojik yöntemlerin kullanılması XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi kongre kitabı, Antalya 1996; ss 121-122.
138. Liu Y, Gilchrist A, Zhang J, Li XF. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 bacteria in drinking water and river water. Appl. Environ. Microbiol., 2008; 74(5): 1502-7.
139. Swaminathan B, Ghassan NM. Molecular typing methods. In. Diagnostic molecular Microbiology, Principles and Applications. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), ASM Pres, Washington 1992; pp 51-87.

140. McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* Subgroups and Comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. J. Clin. Microbiol., 1999; 37: 417-421.
141. Lin CY, Chen YC, Lo HJ, Chen KW, Li SY. Assessment of *Candida glabrata* Strain Relatedness by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multilocus Sequence Typing. J. Clin. Microbiol., 2007; 45: 2452-2459.
142. İzgür, M. Koli Enfeksiyonları. In: Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Yazarlar, M. İzgür, M. Akan. Medisan Yayınevi, Ankara 2002; ss 55-59.
143. Anonymous. Outbreaks Associated with Fresh and Fresh-Cut Produce. Incidence, growth and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. Food and Drug Adm. Center for Food Safety Appl. Nut. 2001; Chapter IV pp 11-12.
144. Doyle M.P, Cliver DO, *Escherichia coli*, Chapter 13, Cliver DO. Ed, Foodborne Diseases Academic Press, California 1990; pp 209-215.
145. McCabe-Sellers B, Beattie SE. Food safety: emerging trends in foodborne illness surveillance and prevention, J. Am. Diet. Assoc., 2004; 104; 1708-1717.
146. Doyle MP. Foodborne Bacterial Pathogens. In: Doyle MP, Padhye VV, eds. *Escherichia coli* Marcel Dekker. Inc Food Research Institute University of Wisconsin-Madison 1989; 236-270.
147. Mojtaba Y. and Doug K, Are Egg yolk antibodies an alternative to antibiotics? World Poultry., 2007;23(5): 23-25.
148. Radu S, Ling OW, Rusul G, Karim MIA, Nishibuchi M. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. J. Microbiol. Methods., 2001; 46: 131-139.
149. Clavero MRS, Monk JD, Beuchat LR, Doyle MP, Brackett RE. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in Raw Ground Beef by Gamma Irradiation. Appl. Environ. Microbiol., 1994; 60(6): 2069-2075.
150. Rice EW, Johnson CH, Wild DK, Reasoner DJ. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water associated with a waterborne disease outbreak of hemorrhagic colitis. Lett. Appl. Microbiol., 1992; 15: 38-40.
151. Harewood P, Rippey S, Montesalvo M. Effect of Gamma Irradiation on shelf Life and Bacterial and Viral Loads in Hard-Shelled Clams (*Mercenaria mercenaria*). Appl. Environ. Microbiol., 1994;60(7): 2666-2670.

152. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev., 1998; 11: 450-479.
153. Aslantaş Ö, Erdoğan S, Cantekin Z, Gülaçtı İ, Evrendilek GA. Isolation of characterization verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from Turkish cattle. Int. J. Food Microbiol., 2006; 106: 338-342.
154. Heuvelink AE, Bleumink B, Van Den Biggelaar FL, et al. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in Netherlands. J. Food Protect., 1998; 61: 1597-1601.
155. Chapman PA, Malo ATC, Elin M, Ashton R, Harkin MA. *E.coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and raw beef and lamb products in South Yorkshire UK, Int. J. Food Microbiol., 2001; 64: 139-150.
156. Bornardi S, Maggi E, Pizzin G, Morabito S, Caprioli A. Faecal carriage of verocytotoxin producing *E.coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in Northern Italy, Int. J. Food Microbiol., 2001; 66: 47-53.
157. Rogerie F, Marecat A, Gombade S, Dupond F, Beaubois P, Lange M. Characterization of shiga toxin producing *E.coli* and *E.coli* O157 serotype *E.coli* isolated in France from healthy domestic cattle. Int. J. Food Microbiol., 2001; 63: 217-223.
158. Aksoy A, İstanbulluoğlu E, Apan TZ, Yıldırım M, Özarslan B. Kırıkkale İli'nde Sığır ve Koyun Dışkılarında *Escherichia coli* O157:H7 prevalansının Belirlenmesi. Vet hekim Mikrobiol Derg 2005; Cilt 5, ss 3-8, sayı 1-2.
159. Coia, JE. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. FEMS Immun. Med. Microbiol., 1998; 20: 1- 9.
160. Massa S, Goffredo E, Altieri C, Natola K. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8 °C. Lett. Appl. Microbiol., 1999; 28: 89-92.
161. Picozzi C, Foschino R, Heuvelink A, Beumer R. Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol-negative or slow-fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated milk samples in Lombardy region. Lett. Appl. Microbiol., 2005; 40: 491-496.

162. Abdul-Raouf UM, Ammar MS, Beuchat LR. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from some Egyptian foods. Int. J. Food Microbiol., 1996; 29: 423-426.
163. Aksoy A, Apan TZ, Kaçmaz B. Sorbitolü fermente eden ve fermente etmeyen Enterohemorajik *Escherichia coli* O157'nin patolojik, klinik ve mikrobiyolojik özellikleri. Türk Klin Microbiol.Enfek.Derg 2004; 3: 29-38.
164. Aksoy A, Yıldırım M, Kaçmaz B, apan TZ, Göçmen JS. Verotoxin Production in Strain of *Escherichia coli* İsolated from Cattle and Sheep, and Their Resistance to Antibiotics. Turk J. Vet. Anim. Sci., 2007; 31(4): 225-231.
165. Çabalar M, Boynukara B, Gülhan T, Ekin İH. Prevalence of Rotavirus, *Escherichia coli* K99 and O157:H7 in healthy dairy cattle herds in Van, Turkey. Turk J. Vet. Anim. Sci., 2001; 25:191-196.
166. Öksüz Ö, Arici M, Kurultay S, Gümüş T. Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. Food Control., 2004; 15: 453-456.
167. Güler L, Gündüz K Virulence properties of escherichia coli isolated from klinical bovine mastitis Turk J. Vet. Anim. Sci 2007; 31(5): 361-365.
168. Blanco J, Blanco M, Blanco JE, et al, Epidemiology of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in Ruminants. In: Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Ed.: G. Duffy, P. Garvey, D.A. McDowell. Trumbull, Connecticut, USA: Food & Nutrition Press 2001; pp 113-148.
169. Yılmaz A, Gün H, Turan N. Manda ve Manda Karkaslarında *Escherichia coli* O157:H7 Varlığının araştırılması. VI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Elazığ 2004.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşegül YONTAR. 01.05.1975 tarihinde Kayseri’de doğdu. İlkokulu Kılıçarslan ilkokulu, ortaokulu 50. Yıl Dedeman ortaokulu, liseyi Kayseri lisesinde okudu.1993 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner fakültesine girdi. Fakülten 1998 yılında mezun oldu. 2003 yılında Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesinde doktora eğitimine başladı. Halen devam etmektedir. Ağustos 2009 tarihi itibari ile Yahyalı İlçe Tarım Müdürlüğünde Veteriner Hekim olarak çalışmaktadır.