

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BROYLERLERDE *ESCHERICHIA COLI*  
O157’NİN PREVALANSI VE PULSED  
FIELD GEL ELECTROPHORESIS  
(PFGE) YÖNTEMİ İLE  
TIPLENDİRİLMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Recep KALIN**

**2011**

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BROYLERLERDE *ESCHERICHIA COLI*  
O157’NİN PREVALANSI VE PULSED  
FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)  
YÖNTEMİ İLE TİPLENDİRİLMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**RECEP KALIN**

**ELAZIĞ-2011**

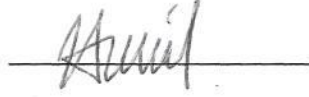
## ONAY SAYFASI



Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

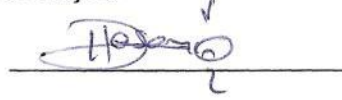


Prof. Dr. Hasan Basri ERTAŞ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden  
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

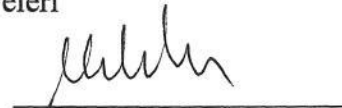
Doç. Dr. Hasan ÖNGÖR



Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

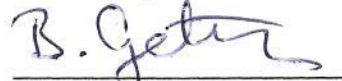
Prof. Dr. Mehmet AKAN



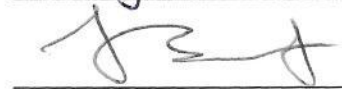
Prof. Dr. Hasan Basri ERTAŞ



Prof. Dr. Burhan ÇETİNKAYA



Prof. Dr. Hakan BULUT



Doç. Dr. Hasan ÖNGÖR



## TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora çalışmamda danışmanlığımı üstlenen ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Hasan ÖNGÖR olmak üzere Anabilim Dalımızın diğer saygıdeğer öğretim üyeleri Prof. Dr. Adile MUZ, Prof. Dr. Hasan Basri GÜLCÜ, Prof. Dr. Burhan ÇETİNKAYA ve Prof. Dr. Hasan Basri ERTAŞ'a teşekkür etmeyi borç bilirim. Doktoram boyunca bilgilerinden yararlandığım ve laboratuvar çalışmalarında deneyim kazanmamda yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Murat KARAHAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Broyler örneklerinin toplanmasındaki katkıları nedeniyle Dr. Bülent TAŞDEMİR, Nejdet TORAMAN, Veteriner Hekim Hıdır ALTINTAŞ, Veteriner Hekim Yener ULUATA ve Gıda Mühendisi Bilal YILDIRIM'a, insan gayta örneklerinin toplanmasındaki katkıları nedeniyle Malatya İ. Ü. Turgut Özal Tıp Merkezi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nilgün DALDAL'a, Arş. Gör. Önder OTLU ve parazitoloji laboratuvarı personeline, Elazığ'da yardımlarını esirgemeyen Dr. Savaş KARATEPE, Biyolog Necati TUT, Naciye ÖZEN, Bülent GÖZTOK ve İnvitro Lab çalışanlarına, bunların yanı sıra Sadet ÇAKMAK, Sinan DERDİYOK ve Mevlüt KARADEMİR'e teşekkür ederim.

Ayrıca altı yıl boyunca maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyerek sıkıntıları aşmamda çok büyük emeği olan eşim Canan KALIN'a, kardeşim Ramazan KALIN ve eşine, ÇELİK, DOĞAN, ORHAN ve YÜKSEL ailelerine sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (FÜBAP) tarafından 1763 numaralı proje olarak desteklenmiştir. Çalışmaya sağladıkları maddi destekten dolayı FÜBAP'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI .....	i
ONAY SAYFASI .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR LİSTESİ .....	ix
1. ÖZET .....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	5
3.1. Diyarejenik <i>Escherichia coli</i> Grupları .....	8
3. 1. 1. Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i> (ETEC).....	10
3. 1. 2. Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i> (EPEC).....	10
3. 1. 3. Enteroagregatif <i>Escherichia coli</i> (EAEC).....	11
3. 1. 4. Enteroinvazif <i>Escherichia coli</i> (EIEC) .....	12
3. 1. 5. Diffuz-adherent <i>Escherichia coli</i> (DAEC).....	12
3. 1. 6. Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i> (EHEC).....	13
3. 2. Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i> O157 .....	14
3. 2. 1. Etiyoloji.....	16
3. 2. 2. Virülens Faktörleri .....	19
3. 2. 2. 1. Shigatoksin.....	20
3. 2. 2. 2. LEE-İntimin .....	21
3. 2. 2. 3. Plazmidler .....	23
3. 2. 2. 4. Enterohemolizin .....	24
3. 2. 3. Patogenezis .....	25
3. 2. 4. Epidemiyoloji.....	28

3. 2. 5. Antibiyotiklere Direnç .....	33
3. 2. 6. Teşhis .....	34
3. 2. 6. 1. Konvansiyonel Yöntemler .....	34
3. 2. 6. 2. Serolojik Yöntemler .....	37
3. 2. 6. 3. İmmunomanyetik Separasyon (IMS) .....	38
3. 2. 6. 4. Moleküler Yöntemler .....	38
3. 2. 6. 4. 1. Alt Tiplendirme .....	39
3. 2. 7. Tedavi .....	42
3. 2. 8. Prognoz .....	44
3. 3. AMAÇ .....	44
4. GEREÇ VE YÖNTEM .....	45
4. 1. Örneklerin Toplanması .....	45
4. 1. 1. Broyler Tavuklarda Örnek Toplanması .....	45
4. 1. 2. İnsan Gayta Örneklerinin Temin Edilmesi .....	46
4. 2. Kültür .....	46
4. 2. 1. İmmunomanyetik Separasyon (IMS) .....	46
4. 3. DNA Ekstraksiyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	47
4. 4. Pulsed Field Gel Elektrophoresis (PFGE) .....	49
4. 4. 1. Ön Hazırlık .....	49
4. 4. 2. Agaroz Kalıpların Dökülmesi .....	50
4. 4. 3. Agaroz Kalıplardaki Hücrelerin Lizisi .....	50
4. 4. 4. Hücre Lizisinden Sonra Agaroz Kalıpların Yıkanması .....	51
4. 4. 5. Agaroz Kalıplardaki DNA'nın <i>Xba</i> I Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi .....	51
4. 4. 6. Agaroz Jel Dökülmesi .....	52
4. 4. 6. 1. Enzimle Kesilmiş Agaroz Parçalarının Tarak Üzerine Yüklenmesi .....	52
4. 4. 6. 2. Enzimle Kesilmiş Agaroz Parçalarının Kuyucuklara Yüklenmesi .....	53
4. 4. 7. Elektroforez .....	54

4. 4. 8. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi.....	54
4. 5. Kültür, PCR ve PFGE Aşamalarında Kullanılan Ayıraçlar .....	55
4. 5. 1. Kültür Aşamasında Kullanılan Besiyeri ve Ayıraçlar.....	55
4. 5. 2. PCR İşleminde Kullanılan Ayıraçlar .....	57
4. 5. 2. 1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayıraçlar .....	57
4. 5. 2. 2. PCR Analizinde Kullanılan Ayıraçlar.....	58
4. 5. 2. 3. PCR Elektroforez İşleminde Kullanılan Ayıraçlar.....	59
4. 5. 3. PFGE İşleminde Kullanılan Ayıraçlar .....	60
4. 6. İstatistiksel Analiz.....	62
5. BULGULAR.....	63
5. 1. Broyler Örneklerinin Bakteriyolojik Kültür Bulguları .....	63
5. 2. İnsan Gayta Örneklerinin Bakteriyolojik Kültür Bulguları .....	65
5. 3. Broyler Örneklerinin PCR Bulguları .....	66
5. 3. 1. <i>E. coli</i> O157 spesifik PCR bulguları.....	66
5. 3. 2. Broyler <i>E. coli</i> O157 izolatlarının virülens genlerine spesifik PCR bulguları .....	67
5. 4. İnsan Gayta Örneklerinin PCR Bulguları .....	69
5. 4. 1. <i>E. coli</i> O157 spesifik PCR bulguları.....	69
5. 4. 2. İnsan <i>E. coli</i> O157 izolatlarının virülens genlerine spesifik PCR bulguları .	71
5. 5. PFGE Bulguları.....	72
6. TARTIŞMA .....	77
7. KAYNAKLAR .....	87
8. ÖZGEÇMİŞ.....	102

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1:</b> <i>E. coli</i> O157'nin ve virülens genlerinin tiplendirilmesinde kullanılan primerler.....	49
<b>Tablo 2:</b> PFGE örnek/enzim sulandırma oranları.....	52
<b>Tablo 3:</b> Broyler örneklerinin kesimhane ve kümeslere göre dağılımı. ....	64
<b>Tablo 4:</b> Sorbitol negatif izolatlarda <i>E. coli</i> O157 identifikasyon oranı. ....	66
<b>Tablo 5:</b> Broylerlerde <i>E. coli</i> O157 pozitif izolatların virülens genlerinin dağılımı .....	68
<b>Tablo 6:</b> İnsan gayta örneklerinin direkt ve IMS ile identifikasyon bulguları. ....	70
<b>Tablo 7:</b> Hastane bazında tespit edilen <i>E. coli</i> O157 identifikasyon bulguları. ...	70
<b>Tablo 8:</b> İnsanlarda <i>E. coli</i> O157 pozitif izolatların virülens genlerinin dağılımı.	71
<b>Tablo 9:</b> <i>E. coli</i> O157 izolatlarının PFGE profilleri. ....	75

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Diyarejenik <i>E. coli</i> grupları .....	9
Şekil 2: <i>E. coli</i> O157:H7 oluşum süreci.....	16
Şekil 3: EHEC virülens faktörleri.....	20
Şekil 4: LEE tip III sekresyon sistemi .....	22
Şekil 5: Broylelerde sorbitol negatif izolatların dağılımı. ....	65
Şekil 6: <i>rfbE</i> -PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jelde görünümü .....	67
Şekil 7: <i>E. coli</i> O157 izolatlarının <i>eae</i> -PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jelde görünümü .....	69
Şekil 8: <i>XbaI</i> enzimi ile kesilen broyle izolatlarına ait PFGE ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jelde görünümü .....	72
Şekil 9: <i>XbaI</i> enzimi ile kesilen insan izolatlarına ait PFGE ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jelde görünümü .....	73
Şekil 10: Broyle ve insan izolatlarının PFGE profilleri. ....	74

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>A/E</b>	:	Attaching/effacing
<b>ABD</b>	:	Amerika Birleşik Devletleri
<b>AIDA-I</b>	:	Adhesin Involved in Diffuse Adherence
<b>APEC</b>	:	Avian pathogenic <i>E. coli</i>
<b>BCIG</b>	:	5-bromo-4-chloro-3-indoxyle- $\beta$ -D-glucuronic acid
<b>BPW</b>	:	Buffered peptone water
<b>CDC</b>	:	Centers for Disease Control and Prevention
<b>CHEF</b>	:	Countour-clamped homogeneous field electrophoresis
<b>CT-SMAC</b>	:	Cefixime-Tellurite Sorbitol MaCConkey Agar
<b>DAEC</b>	:	Diffuz-adherent <i>E. coli</i>
<b>DTE</b>	:	Dithioerythritol
<b>eae</b>	:	İntimin
<b>EAEC</b>	:	Enteroagregatif <i>E. coli</i>
<b>EAggEC</b>	:	Enteroadherent Aggregative <i>E. coli</i>
<b>EHEC</b>	:	Enterohemorajik <i>E. coli</i>
<b>Ehx</b>	:	Enterohemolizin
<b>EIEC</b>	:	Enteroinvasiv <i>E. coli</i>
<b>ELISA</b>	:	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>EMB</b>	:	Eosine Methylene Blue
<b>EPEC</b>	:	Enteropatojenik <i>E. coli</i>
<b>ETEC</b>	:	Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
<b>FDA</b>	:	Food and Drug Administration
<b>flic</b>	:	H7 kodlayan gen
<b>g</b>	:	Gram
<b>Gb3</b>	:	Globotriaosylceramide
<b>HK</b>	:	Hemorajik kolitis
<b>HLB</b>	:	Hücre lizis buffer
<b>HSB</b>	:	Hücre süspansiyon buffer
<b>HUS</b>	:	Hemolitik üremik sendrom
<b>IFA</b>	:	İmmunofloresan antikor
<b>IMS</b>	:	İmmunomanyetik Seperasyon

<b>kb</b>	:	Kilobaz
<b>kDa</b>	:	Kilodalton
<b>LEE</b>	:	Locus of enterocyte effacement
<b>LT</b>	:	Labil toksin
<b>MDa</b>	:	Megadalton
<b>mEMB</b>	:	Modifiye edilmiş EMB
<b>mPCR</b>	:	Multipleks PCR
<b>MR</b>	:	Metil Red
<b>mTSB</b>	:	Modifiye trypticase soy broth
<b>MUG</b>	:	4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide
<b>OMP</b>	:	Outer membrane protein
<b>Pais</b>	:	Pathogenity island
<b>PCR</b>	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PFGE</b>	:	Pulsed Field Gel Electrophoresis
<b>PRS</b>	:	Phenol red sorbitol
<b>RAPD</b>	:	Random amplification of polymorphic DNA
<b>RE</b>	:	Restriksiyon enzimi
<b>rfbE</b>	:	O157 kodlayan gen
<b>RFLP</b>	:	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RPLA</b>	:	Reverse passive latex aglutinasyon
<b>SDS</b>	:	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>SKG</b>	:	SeaKem Gold agaroz
<b>SLTEC</b>	:	Shiga-Like toxin producing <i>E. coli</i>
<b>SMAC</b>	:	Sorbitol MacConkey Agar
<b>ST</b>	:	Stabil toksin
<b>STEC</b>	:	Shigatoksin üreten <i>E. coli</i>
<b>Stx</b>	:	Shigatoksin
<b>SUSS</b>	:	Steril ultra saf su
<b>TBE</b>	:	Tris-borik asit-EDTA
<b>Tir</b>	:	Translocated intimin receptor
<b>TTP</b>	:	Trombotik trombositopenik purpura
<b>USDA</b>	:	United States Department of Agriculture

**VP** : Voges Preskauer  
**VTEC** : Verotoksijenik *E. coli*

## 1. ÖZET

Bu çalışmada; *Escherichia coli* (*E. coli*) O157'nin broyler tavuk örneklerindeki varlığının kültür ve immunomanyetik separasyon (IMS) ile araştırılması, moleküler yöntemlerle karakterize edilerek virülens genlerinin saptanması, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemi ile alt tiplendirmesi ve böylece izolatlar arasındaki genetik ilişkilerin ortaya konması amaçlandı.

Bu amaçla, Elazığ ve Malatya illerindeki üç farklı kanatlı kesimhanesinden 1000 broylere ait karaciğer ve sekum örnekleri ile aynı işletmelerde bulunan 1000 broylere ait karkas örnekleri toplandı. Ayrıca bu çalışmada, broyler izolatları ile insan izolatları arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koymak amacıyla, aynı bölgedeki beş hastaneye ishal şikâyeti ile başvuran hastalardan temin edilen 367 gayta numunesi incelendi. Broyler sekum ve insan gayta örneklerinden direkt ekim ve immunomanyetik seperasyon (IMS) sonrası ekim gerçekleştirilirken, karkas ve karaciğer örneklerine yalnızca direkt ekim uygulandı.

Broyler tavuklarda örneklerin direkt ve IMS sonrası ekiminde saptanan sorbitol negatif izolatların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile incelenmesinde; karaciğerde % 0,1 (1/1000) ve sekumda % 0,4 (4/1000) olmak üzere iç organlardan hayvan bazında % 0,5 oranında *E. coli* O157 tespit edilirken, karkas örneklerinden etken izolasyonu yapılamadı. İnsan gayta örneklerinden ise % 2,7 (10/367) oranında pozitiflik saptandı.

Kümes bazında bakıldığında; kümeslerin % 12'sinde (3/25) etken identifikasyonu yapıldı. *E. coli* O157 pozitif bulunan bu işletmelerden bir tanesi Malatya'da ve iki tanesi Elazığ'da yer alıp, bu kümeslerdeki pozitiflik oranları

sırasıyla % 2 (1/50), % 6,7 (2/30) ve % 4 (2/50) olarak bulundu. Kumes bazındaki pozitiflik oranları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ( $P < 0,001$ ).

Virülens genlerine spesifik PCR ile incelenen beş broyler tavuk ve on insana ait *E. coli* O157 izolatının hiçbirinde H7, shigatoksin 1-2 ve enterohemolizin genleri bulunamadı. Buna karşın, broyler izolatlarının tamamı ve bir adet insan izolatu intimin geni yönünden pozitif olarak tespit edildi.

PFGE analizi sonucunda hem broyler hem de insan izolatlarında birbirinden farklı 4'er profil saptandı. Bu çalışmada elde edilen insan *E. coli* O157 izolatları ile kanatlı orijinli izolatlar arasında herhangi bir genetik ilişki saptanamaması, bulaşma kaynağının kanatlı kökenli olmadığı fikrini desteklemektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, broyler tavukların *E. coli* O157 serotipini taşıdığı tespit edildi. *E. coli* O157'ye bağlı enfeksiyon ve salgınların epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi ve etkin kontrol stratejilerinin geliştirilebilmesi için ruminant türlerinin yanı sıra başta broyler olmak üzere kanatlı hayvanların da incelenmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Broyler, insan, *E. coli* O157, PCR, virülens genleri, PFGE

## 2. ABSTRACT

This study was carried out to investigate the presence of *Escherichia coli* (*E. coli*) O157 in various samples collected from broiler chickens by culture and Immunomagnetic separation (IMS). In addition, the isolates were subjected to molecular characterization in order to determine the presence of virulence genes and were then subtyped by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) method to reveal the genotypic relationships between the strains.

For this purpose, liver and caecum samples collected from 1000 broilers and carcass samples obtained from another 1000 broilers which slaughtered at three different abattoirs located in Malatya and Elazig provinces were examined. Also, faecal samples provided from 367 humans with diarrhea, who applied to five different hospitals in the region, were examined in order to reveal genetic relationships between broiler and human *E. coli* O157 isolates. While all the samples collected from broilers and humans were subjected to direct cultivation, caecum and human fecal samples were also examined by the combination of Immunomagnetic separation (IMS) and culture.

In the Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis of sorbitol negative isolates, *E. coli* O157 was identified from 0.1% (1/1000) and 0.4% (4/1000) of the liver and caecum samples of broiler chickens, respectively. In overall, the agent was detected in 0.5% (5/1000) of internal organ samples of broilers. On the other hand, none of the carcass samples were determined to be positive for *E. coli* O157. The percentage of 2.7% (10/367) was obtained in the PCR examination of human faecal samples.

When the results were assessed at flock base, the identification percentage of *E. coli* O157 was calculated as 12% (3/25). Of the positive flocks, one was located in Malatya and the other two were in Elazig. The positivity rates within these flocks were detected as 2% (1/50), 4% (2/50) and 6.7% (2/30), respectively. The difference between the flocks in terms of the positivity rates were determined to be statistically significant ( $p < 0.001$ ).

The PCR analysis specific for virulence genes showed that none of the broiler (n=5) and human (n=10) *E. coli* O157 isolates possessed H7, shigatoxins 1-2, and enterohemolysin genes, whereas all the broiler isolates and one of the human isolates were positive for intimin gene.

In the PFGE analysis, a total of eight different profiles (four from broiler and four from human isolates) were observed. However, there were no genetic relationships between broiler and human *E. coli* O157 isolates which suggest that broilers do not play significant role in the transmission of infection to humans.

In conclusion, this study showed that *E. coli* O157 was isolated from broilers. It is therefore plausible to suggest that in addition to ruminants, avian species, especially chickens, should be considered for the better understanding of the epidemiology of *E. coli* O157 infection. This will help develop more effective control strategies against infections and outbreaks due to *E. coli* O157.

**Key words:** Broiler, human, *E. coli* O157, PCR, virulence genes, PFGE

### 3. GİRİŞ

*Escherichia coli* (*E. coli*), kanatlı ve memelilerin normal bağırsak florasını oluşturmasının yanı sıra, patojenik özelliğe sahip çok sayıda serogrubu bulunmakta ve virülens özelliklerine göre çeşitli gruplara ayrılmaktadır (42, 59, 66). Kommensal ve patojen suşlar bağırsakta, çevrede ya da konakçıda yaşamlarını sürdürebilirler (82, 109).

*E. coli* ilk olarak Alman araştırmacı, bakteriyolog Theodor Escherich tarafından 1885 yılında ortaya konmuş ve *Bacterium coli commune* ismi ile anılmıştır. Bu organizma için 1895 yılında Migula, 1896'da ise Lehman ve Neumann *Bacterium coli* ismini kullanmışlardır. Castellani ve Chalmers ise 1919 yılında *Escherichia coli* ismini kullanarak etkeni bulan araştırmacının adına ithafen bu ismi vermişlerdir (18, 26, 59).

Günümüzde 16S ribozomal RNA ünitesindeki benzerliğe göre yapılan sınıflandırma sonucunda *E. coli*, *Proteobacteria* bölümünde, *Gammaproteobacteria* sınıfında, *Enterobacteriales* takımında, *Enterobacteriaceae* familyasında *Escherichia* cinsi içerisinde yer almaktadır (18).

Gram negatif özellikteki *E. coli*, 1,1-1,5 x 2,0-6,0 µm boyutlarında, fakültatif anaerobik ve çomak şeklindeki bakterilerdir. Çoğu peritrik flagellaya sahip olan bu etken hareketli olup, buna karşın az da olsa hareketsiz olanlar da bulunmaktadır. Genel amaçlı besiyerlerinden; kanlı agar, nutrient agar ve *Enterobacteriaceae* için diferensiyel-selektif olan MacConkey agar, Eosine Methylene Blue (EMB) agar gibi besiyerlerinde 37 °C'de 24 saat içinde S tipi

koloniler oluştururlar. Sıvı besiyerlerinde 37 °C'de 24 saatte bulanıklık yaparak ürerler.

Laktoz, mannitol, glukoz gibi karbonhidratları asit ve gaz oluşturarak fermente ederler. Laktozu kullanan türler MacConkey agarda pembe renkli koloniler oluştururken, EMB agarda ise yeşil metalik refle veren koloniler şekillendirirler. Bazı suşları kanlı agarda hemoliz oluşturabilirler. İndol ve Metil Red (MR) testlerinde pozitif, üre, Voges Preskauer (VP), H<sub>2</sub>S ve Sitrat testlerinde negatif sonuç verirler. Oksidaz testi negatif sonuç veren *E. coli* nitratları nitritlere indükleyebilirler (19).

*E. coli* suşlarının sınıflandırılmasında organizmanın sahip olduğu antijenik yapılar önemli rol oynamaktadır. *E. coli* suşları arasında antijenik farklılıkların olduğu ilk kez 1921'de Dodgeon tarafından belirtilmiş, sonra 1937'de Lowel *E. coli*'nin kapsül (K) ve somatik (O) olmak üzere iki çeşit antijeni olduğunu ileri sürmüş, 1943 yılında ise flagella (H) antijeni keşfedilmiştir. Bu antijenik farklılıkları temel olarak geliştirilen ve ilk olarak 1944 yılında Kauffman tarafından şematize edilen serolojik sınıflandırma günümüzde modifiye edilmiş hali ile kullanılmaktadır (92, 138). Modifiye Kauffman şemasına göre *E. coli*'ler O, H ve K yüzey antijenlerine göre serogrurlara ayrılmıştır. Buna göre O antijeni ağıısından 170, K antijeni ağıısından 100 ve H antijeni ağıısından 60 kadar serogrur olduğu bildirilmiştir (102).

Somatik antijenleri ısıya dirençli olup lipopolisakkarit yapıda, K antijenleri ise polisakkarit yapıda olup O antijenlerin üzerinde bulunur. Buna bağlı olarak K antijeni ihtiva eden suşlar, O antiserumları ile aglütinasyon yapmazlar (19, 92). K antijenleri iki farklı komponente sahip olup bunlardan K(A) 120 °C'de iki saatte,

K(B) ise 100 °C'de etkisi giderilebilen polisakkarit niteliğindedir. Bu nedenle K antijenine sahip suşların 120 °C'de iki saat ısı uygulandıktan sonra aglütinasyona tabi tutulması gerekmektedir. Flagella antijeni ise hareketli suşlarda bulunan, ısıya dayanıksız protein tabiatında olup aglütinasyonla ortaya konabilir.

Bunların yanı sıra fimbrial (pilus) antijenleri *E. coli*'ler için çeşitli öneme sahiptir. Suşlar arasında ekstrakromozomal genetik elementlerin aktarılmasını sağlama ve bağırsak epitellerine adhezyon yapma özellikleri de bulunmaktadır. Bu antijenler özellikle enteropatojenik *E. coli*'lerin belirlenmesinde kullanılırlar. O, K, H antijenleri bakteri kromozomu tarafından sentezlenirken fimbria antijenleri hem bakteri kromozomu hem de plazmid aracılığı ile sentezlenmektedir. O/H antijenlerinin kombinasyonları serotip olarak ifade edilmektedir (32, 138, 143).

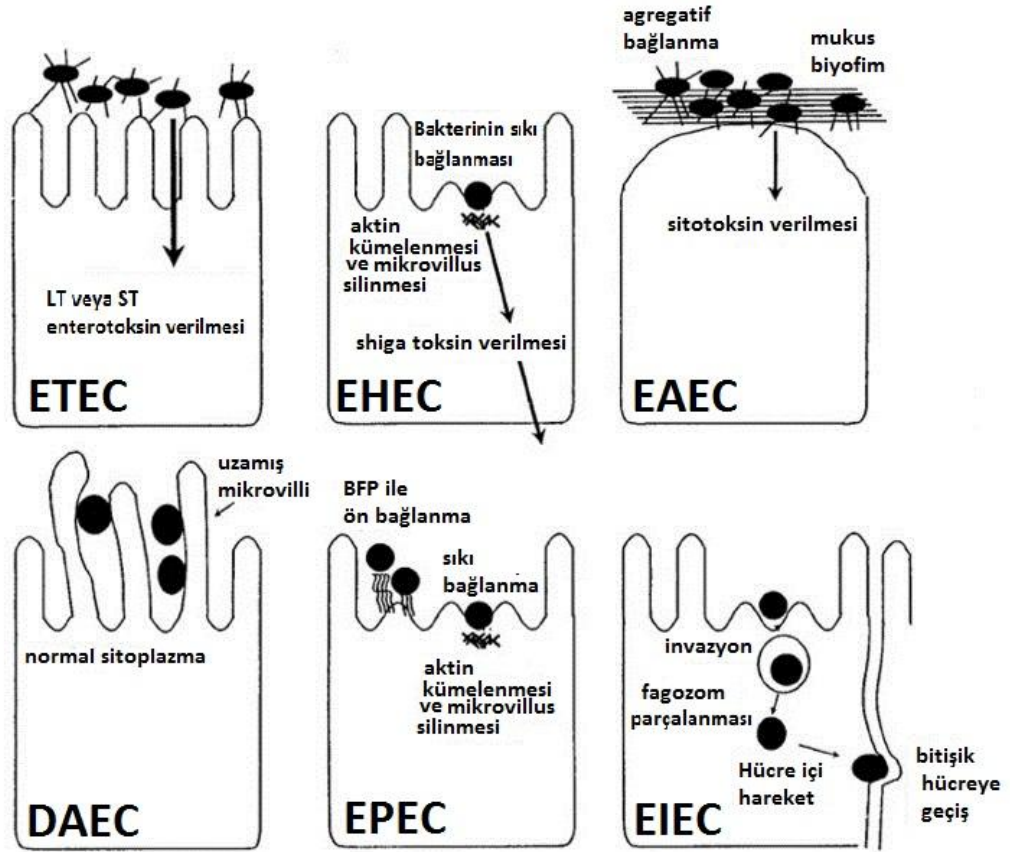
*E. coli* başta insan olmak üzere buzağı, kuzu, domuz yavruları, tay, kedi, köpek ve kanatlılarda birçok hastalığa neden olmaktadır. Ayrıca akut mastitislerin primer etkenleri arasında yer alması açısından süt endüstrisinde önemli kayıplara neden olmaktadır (19, 97). *E. coli* serotipleri kanatlı hayvanlarda enteritis, koliseptisemi, koligranuloma (Hjarre's hastalığı), hava kesesi yangısı, sellulitis, peritonitis, perikarditis, perihepatitis, artrit, omfalitis, salpingitis ve yumurta sarısı (Yolk sac) enfeksiyonlarından izole edilmiştir. Kanatlı patojenik *E. coli* suşları (avian pathogenic *E. coli*, APEC) özellikle genç broylerde enfeksiyonlara neden olurlar. APEC suşları çoğunlukla belli O serogruplarına dahildirler. Tavuklardan en çok izole edilen APEC suşları O1, O2, O35 ve O78'dir (26).

*E. coli* O157:H7 serotipinin kanatlılarda izolasyonuna dair az sayıda veri olmasına karşın, son zamanlarda kanatlılardan bu serotipin izole edilmesi halk sağlığı açısından büyük önem kazanmaktadır (26, 132).

Tüm dünyada genel olarak ishal enfeksiyonları ile anılan diyarejenik *E. coli*'ler O:H antijenik yapıları, diğer virülens faktörleri, hedef hücrede yaptıkları hücresel değişiklikler, sahip oldukları enterotoksin yapısı, ortaya çıkan klinik tablo ve epidemiyolojilerine göre; Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enteroinvasiv *E. coli* (EIEC), Enteroagregatif *E. coli* (EAEC) Diffuz-adherent *E. coli* (DAEC), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1).

### **3.1. Diyarejenik *Escherichia coli* Grupları**

*E. coli*, ilk keşfinden bugüne kadar dikkate değer değişim göstermiş ve bu durumun önümüzdeki yıllarda da devam edeceği tahmin edilmektedir. Eskiden sindirim sisteminin saprofit etkenleri olarak kabul edilirken günümüzde insan ve hayvanlarda ciddi hastalıklara neden olan çok yönlü bir bakteri olarak görülmektedir. Ayrıca, *E. coli*'den kaynaklanan enfeksiyonlar binlerce kişiyi etkileyebilmekte ve ulusal salgınlara neden olabilmektedir.



Şekil 1: Diyarejenik *E. coli* grupları (138).

Ökaryotik hücrelerin protein sentezi, hücre bölünmesi, iyon sekresyonu ve transkripsiyon aşamalarını etkileyen bu etkene ait spesifik virülens faktörleri keşfedilmiştir. Bu faktörler; plazmid, bakteriyofaj, transpozon ve patojenite adaları tarafından kodlanmakta ve bu genomik çeşitlilik ETEC, EHEC, EPEC vs. alt gruplarının kesin çizgilerle ayrılmasını zorlaştırmaktadır. Bu durum etkenin teşhisi, tedavisi ve kontrolü konularında yeni yöntemlerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (73).

Birçok mukozal patojen gibi *E. coli* de mukozada kolonizasyon, konakçı savunmasından kaçma, çoğalma ve konakçıya zarar verme gibi enfeksiyon aşamalarını izlemektedir. Diyarejenik *E. coli* suşlarının sahip olduğu en önemli

özelliklerden biri peristaltik hareketlere rağmen bağırsağın mukozal yüzeyinde kolonize olabilmesi ve floradaki diğer bakterilerle rekabet edebilmesidir (103, 138).

Hemorajik kolitis (HK) ve hemolitik üremik sendrom (HUS) ile seyreden iki salgından *E. coli* O157:H7 serotipinin izole edilmesinden sonra bu etken Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) olarak adlandırılmıştır. EPEC suşlarının Hep-2 hücrelerine bağlanmasını inceleyen bilim adamları, EPEC hakkında bilgiler edinirken aynı zamanda EAEC ve DAEC olmak üzere iki yeni diyarejenik *E. coli* (Şekil 1) keşfetmişlerdir (59).

### **3. 1. 1. Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC)**

ETEC, stabil toksin (ST) ve labil toksin (LT) türlerinden en az birini barındıran etkenler olarak tanımlanmıştır. ETEC suşları ilk olarak domuz yavrularının ölümcül enfeksiyonlarında gözlenmiştir. İnsanlarda ise ilk olarak ishal şikayeti olan çocukların gayta örneklerinde ETEC suşları tespit edilmiş, daha sonra etkenin yetişkinlerde de ishale neden olduğu ortaya konmuştur. ETEC patogeneğinde, etken ince bağırsak mukozasına adhezyon yapıları ile bağlandıktan sonra çoğalarak toksin üretimi ve salınımı gerçekleşir ve bağırsaklarda sekresyon artışına neden olur. Diyare, LT ve ST enterotoksinleri nedeniyle oluşur. Bu suşlar yalnız LT/ST veya her iki toksini birden sentezleyebilirler (123, 172).

### **3. 1. 2. Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC)**

EPEC, bebek diyarelerine neden olan önemli bir etkidir. Daha önceleri O ve H serotiplerine göre sınıflandırılırken günümüzde patojenik özelliklerine göre

sınıflandırılmaktadır. EPEC kökenli enfeksiyonların en önemli özelliği bağlanma ve silinme [attaching-and-effacing (A/E)] ile ortaya çıkan patolojik durumdur. A/E lezyonları sonucu villüslerin yok olmasına bağlı olarak EPEC enfeksiyonlarında emilim olmaz, ishal ve buna bağlı olarak malabsorpsiyon şekillenir (3, 34). Bu gruptaki bakteriler ST ve LT üretmezler. Hasta hayvan ve insanlarda yapılan bağırsak biyopsilerinde A/E lezyonları teşhis edilebilir ve bu lezyonlar hücre kültürlerinde ortaya konabilir. Bu durum bakterinin epitel hücre membranına sıkıca bağlanması ve mikrovililerin yok olması ile karakterizedir (39, 172).

### **3. 1. 3. Enteroagregatif *Escherichia coli* (EAEC)**

Bilim adamları EPEC suşlarının Hep-2 hücrelerine bağlanmasını incelerken iki yeni diyarejenik *E. coli* keşfetmişlerdir. Araştırmacılar, çoğu EPEC suşunun Hep-2 hücrelerine bağlandığını tespit etmişlerdir. Buna karşın EPEC içerisinde yer almayan, Hep-2 hücrelerine bağlanan ve bağlanma fenotipi EPEC'den farklı olan *E. coli*'ler olduğu gözlenmiştir. EPEC, Hep-2 hücrelerine lokal bağlanma yaparak hücre yüzeyinde mikrokoloniler oluştururken, EPEC olmayan ve Hep-2 hücrelerinde mikrokoloniler oluşturmaksızın diffuz olarak bağlanan ve EAF plazmidi taşımayan *E. coli*'ler olduğu saptanmıştır.

Diffuz olarak bağlanan suşlar incelendiğinde bunlardan bir kısmının kümeler (aggregative) halinde bir kısmının da daha yaygın halde Hep-2 hücrelerine bağlanma yaptıkları ortaya konmuştur. Kümeler halinde bağlanma yapan suşlar önceleri Enteroadherent Aggregative *E. coli* (EAggEC) olarak tanımlanmış, daha sonra kısaltılarak Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) olarak

adlandırılmıştır. Diffuz olarak bağlanan suşlar ise Diffuz Adherent *E. coli* (DAEC) olarak isimlendirilmiştir (10, 138).

### **3. 1. 4. Enteroinvazif *Escherichia coli* (EIEC)**

Diyareye neden olan EIEC suşlarının biyokimyasal, genetik ve patojenite yönünden Shigella türleri ile yakın ilişkisi vardır. EIEC suşları genellikle lizin dekarboksilaz negatif, hareketsiz ve laktoz negatif türlerdir (138). EIEC, Shigella ile benzer patojenik özelliğe sahiptir. Diğer enterovirulent tiplerden farklı olarak plazmid ve kromozomal genler aracılığıyla her iki bakteri de bağırsak epiteline invaze olurlar ve ishal patogenezinde rol alırlar (72). Etkenin patogenez aşamaları; epitel hücreye penetrasyon, hücre içi çoğalma, sitoplazma boyunca hareket ve bitişik epitel hücreye uzanma evrelerinden oluşur. Enfeksiyon şiddetlendiğinde ülserasyon ile karakterize güçlü yangısal reaksiyon oluşur. İnvazyon için gerekli genler EIEC ve Shigella'da 140 Megadaltonluk (MDa) plazmid tarafından kodlanır ve bu plazmid pInv olarak adlandırılmaktadır (10, 138).

### **3. 1. 5. Diffuz-adherent *Escherichia coli* (DAEC)**

EAEC ve EPEC suşlarından farklı şekilde Hep-2 hücrelerine diffuz bağlanma gösteren *E. coli* suşları DAEC olarak adlandırılmıştır. Bu suşlarda bulunan F1845 ve AIDA-I (Adhesin Involved in Diffuse Adherence) adlı iki adhesin sayesinde epitel hücrelere diffuz bağlanma gösterirler. DAEC'nin patogenezini hakkında çok az şey bilinmektedir. DAEC suşları, Caco-2 veya Hep-2 hücrelerinde parmak şeklinde çıkıntılar yapmaktadırlar. Hücre içine gömülen bakteri gentamisinden bu şekilde korunabilmektedir. Ancak bu durumun

patogenezdeki rolü bilinmemektedir. DAEC genellikle çocuklarda süreklilik gösteren diyareye neden olmaktadır. Klinik belirtileri konusunda çok bilgi olmamakla beraber yapılan bir çalışmada DAEC ile enfekte hastalarda sulu ishal gözlenirken gaytada kan ve lökosit bulunmadığı bildirilmiştir (10, 49, 138).

### **3. 1. 6. Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC)**

HK ve HUS gibi ciddi rahatsızlıklara neden olan *E. coli* suşları bu grupta yer alırlar. Grubun en önemli üyesi *E. coli* O157:H7 serotipidir (131). EHEC izolatları shigatoksin 1 (*stx*<sub>1</sub>) ve shigatoksin 2 (*stx*<sub>2</sub>) gibi çeşitli toksinler oluşturabilmektedir. LT ve ST üretmeyen bu suşlar A/E lezyonları yapma özelliğine sahiptir. Hastalık tablosunda sulu ve kanlı bir gayta görülürken ateş yoktur (108, 138).

EHEC'den ileri gelen hastalıklar genel olarak Kuzey Amerika kıtası ülkelerinde daha sık görülmekle beraber, günümüzde altı kıtada en az 30 ülkede her geçen gün artan oranda vakalar bildirilmektedir. Sıcak havalarda ve Mayıs-Ekim aylarında vakaların arttığı, hastalığın beş yaş ve daha altındaki çocuklar ile 65 ve daha yukarı yaşlılarda daha ciddi klinik tablolara yol açtığı bildirilmektedir. Enfektif dozunun 10-100 mikroorganizma gibi çok düşük düzeyde olması salgınlara yayılmasında temel etken olduğunu göstermektedir (66, 92).

Etkenin prevalansını etkileyen birçok faktör olduğu bildirilmiştir. Coğrafi bölge, mevsim, hayvanın türü, yaşı ve cinsiyeti, beslenme şekli gibi birçok faktör farklı prevalans değerlerinin çıkmasına neden olmaktadır. Sığırlar diğer ruminantlara, mısır silajıyla beslenen hayvanlar da beslenmeyenlere göre daha yüksek oranda etken taşıyarak bulaşmada önemli rol oynarlar. Yaz aylarında prevalans değerleri daha yüksek çıkmaktadır. Süt inekleri, besiye alınan

boğalardan ve genç hayvanlar yaşlı hayvanlardan daha yüksek taşıyıcılık göstermektedir. Ayrıca kesim yapılan mezbahanın hijyenik koşulları, kesim sonrası etin işlenmesi ve son tüketim safhasına kadar geçen süreçte hijyen kurallarının ihmal edilmesi kontaminasyon riskini artırmaktadır (45).

### **3. 2. Enterohemorajik *Escherichia coli* O157**

Karmali, 1983 yılında Afrika yeşil maymunun böbrek hücrelerinde (Vero hücreleri) letal etki yapan (sitotoksin üretebilen) *E. coli*'nin HUS ile ilişkisi olduğunu belirlemiştir. Kısa bir süre sonra Riley, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) iki kanlı ishal salgınının *E. coli* O157:H7 serotipinden kaynaklandığını ortaya koymuştur. O'Brien, *E. coli* O157:H7'nin *Shigella dysenteriae* 1'e benzeyen bir toksin ürettiğini gözlemlemiştir. Bu gelişmelerin ardından *stx* üreten *E. coli*, insanlarda neden olduğu hastalık tablosu (HK) nedeniyle Enterohemorajik *E. coli* olarak adlandırılmıştır (108).

Etken, ilk olarak 1982 yılında ABD'de Oregon ve Michigan kentlerinde bulunan fast food zincirindeki hamburgerlerin tüketilmesi sonucu ortaya çıkmıştır. Bu salgından sonra 1988'de Minnesota'da 30 lise öğrencisi hastalanırken, 1992-1993 yıllarında dört eyalette (Washington, Idaho, Kaliforniya ve Nevada) dört ölüm gözlemlendiği belirtilmektedir. Bu vakaların incelenmesi sonucu enfeksiyonun hamburger kökenli olduğu ortaya konmuştur.

Kaliforniya'da 1996'da pastörize edilmemiş elma suyu, İskoçya'da ise kontamine sığır etlerinin tüketilmesine bağlı salgın gözlenmiştir. Etkenin 1997 Ağustos ayında Nebraska'da izole edilmesinin ardından, 1999 yılında New

York'ta 1000 kişinin etkilendiği ve ölümlerin gözlendiği bir salgın bildirilmiştir (59).

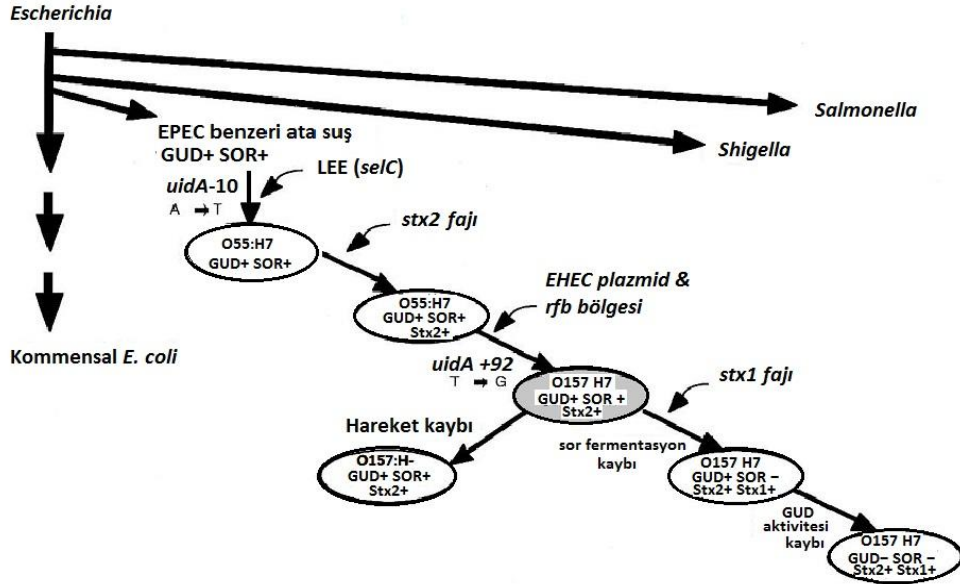
Ayrıca 2000 yılında sudan kaynaklanan enfeksiyon nedeniyle Walkerton ve Ontario'da yedi kişinin öldüğü, 2300 kişinin hastalandığı, 2001 yılında Ontario'da bir huzurevinde 100 vakanın ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Enfeksiyonun kontamine gıda ve suların tüketilmesi ile ve nadir de olsa sıkı temas olan yerlerde insandan insana bulaşma şeklinde gözlendiği bildirilmektedir (42, 59).

Gıdalar ile insanlara bulaşan patojenlerin en önemlilerinden biri olarak kabul edilen *E. coli* O157:H7 serotipi, sadece daha fazla virülense sahip olmasından değil, yeterli ısı işlemini görmemiş kontamine gıdaların tüketilmesine bağlı olarak ciddi salgınlara sebebiyet vermesinden dolayı dünya çapında çok büyük öneme sahip bir mikroorganizmadır (92, 119).

Yapılan genetik çalışmalarda *Escherichia*, *Salmonella* ve *Shigella* cinsleri incelenmiş ve *E. coli* O157:H7 serotipinin EPEC benzeri enterik bir bakteriden köken aldığı öne sürülmüştür (Şekil 2).

Bilim adamları enterik patojenlerde yaptıkları kromozomal incelemelerde, farklı DNA segmentlerinin fonksiyonel virülens faktörlerini kodladığını belirlemiş ve bunları patojenite adası (pathogenity island, Pais) olarak adlandırmışlardır. Bu genlerin çoğunlukla başka mikroorganizmalardan kazanılmış olarak ortaya çıktığı rapor edilmiştir. *E. coli* O157:H7'de 35 kilobaz (kb) büyüklüğünde olan ve enterosit silme lokusu (locus of enterocyte effacement, LEE) adı verilen bir patojenite adası bulunmuştur. Genel hatlarıyla *E. coli* O157:H7'nin, EPEC benzeri bir atadan önce LEE'yi elde ettiği, transdüksiyon ile *stx<sub>2</sub>*'yi kodlayan fajı aldığı, hemolizini

kodlayan plazmidi kazandığı, sonra *stx<sub>1</sub>*'i kodlayan faja sahip olduğu ve en son olarak sorbitol fermantasyonu ve  $\beta$ -glucuronidase aktivitesini yitirerek evrimini tamamladığı düşünülmektedir (40, 92, 145).



Şekil 2: *E. coli* O157:H7 oluşum süreci (145).

### 3. 2. 1. Etiyoloji

*E. coli* O157:H7 serotipini içeren EHEC grubunun patojenik bir sınıf olarak kabul edilmesi iki epidemiyolojik olay sonucunda olmuştur. İlki, Riley tarafından 1983 yılında çıkan salgında bildirilen, abdominal kramp, sulu diyare ve sonrasında kanlı diyare ile seyreden gastrointestinal hastalıktır. Bu hastalık hemorajik kolitis olarak adlandırılmış ve az pişirilmiş kontamine hamburgerlerin tüketilmesi ile ortaya çıkmıştır (112). İkincisi ise Karmali tarafından hemolitik üremik sendrom ile fekal sitotoksin arasındaki ilişkinin ortaya konmasıdır.

HUS; kanlı ishal, akut böbrek yetmezliği, trombositopeni ve mikroanjyopatik hemolitik anemi ile karakterize ve HK'den farklı bir tablo olarak tanımlanmıştır. Bu iki klinik bulgu ve spesifik sitotoksin üretimi bağırsak ve böbrek hastalıkları yapan yeni bir enterik patojenin tanımlanmasına neden olmuştur (138).

Başlangıçta araştırmacılar ETEC grubunda yer almayan ve LT taşımayan ama HeLa hücre kültüründe sitopatik etki yapan *E. coli* serotiplerini keşfetmişlerdir. HeLa hücrelerindeki sitopatik etkinin *Shigella dysenteriae* 1'e karşı hazırlanan antitoksin ile nötralize edildiği saptanmış ve Shigella benzeri toksin taşıyan *E. coli* etkenlerinin Vero hücrelerinde de sitotoksik etki yaptığı ortaya konmuştur (138).

O'Brien, Shigella benzeri toksin ile Vero sitotoksinin aynı olduğunu bulurken, Riley ise salgınlardan izole edilen etkenin *E. coli* O157:H7 olduğunu belirtmiştir. Sonraki çalışmalarda Kanada'da HK hastalarından izole edilen *E. coli* O157:H7 suşlarının Vero hücrelerinde sitotoksik olduğu, başka bir çalışmada ise Vero hücrelerinde sitotoksik olan Shigella benzeri toksin taşıyan *E. coli* etkenlerinin HK ve HUS'ta ortak virülens faktörlerini kullandığı bildirilmiştir (42, 119, 127, 138).

Bu patojenin özelliklerinin keşfedilmesine paralel olarak farklı isimlerle anılması söz konusu olmuştur. Verotoksijenik *E. coli* ya da verotoksin üreten *E. coli* (VTEC) adı, Vero hücrelerinde yaptığı etkiden dolayı verilmiştir. Diğer yandan genetik olarak çok yakın ilişkili olduğu *Shigella dysenteria* tip 1 ile benzer yapıda toksin üretmesinden dolayı Shigella benzeri toksin üreten *E. coli* (Shiga-Like toxin producing *E. coli*, SLTEC) ya da kısaca shiga toksin üreten *E. coli* (shigatoxin producing *E. coli*, STEC) olarak anılmıştır. STEC ve VTEC günümüzde aynı etkeni tanımlamaktadır. Enterohemorajik *E. coli* ise HK ve HUS vakalarından izole edildiği

için *stx* taşıyan, A/E lezyonlarına neden olan ve enterohemolizini kodlayan plazmidi taşıyan suşlara verilen isimdir. EHEC suşları STEC suşlarının bir alt kümesidir (112, 138). Günümüzde insanlarda enfeksiyona neden olan 100'ün üzerinde STEC serotipi tanımlanmış olup, bunların en önemlisi O157:H7 olarak kabul edilmektedir.

STEC O157; Kuzey Amerika, Japonya ve çoğu Avrupa ülkesinde izole edilmektedir. Bunun yanı sıra O157 olmayan STEC suşları (non O157 STEC) Avustralya, Arjantin gibi ülkelerde daha sık gözlenmektedir. VTEC terimi daha çok Avrupalı bilim adamları tarafından, STEC ise Amerikalı bilim adamları tarafından kullanılmakla beraber yaygın olarak STEC ismi kabul görmektedir (66, 134, 149).

EHEC; gıda mikrobiyolojisi, veteriner ve insan hekimliği, moleküler genetik ve halk sağlığı gibi birçok disiplinin çalışma konusudur (108). Diyarejenik *E. coli*'lerin neden olduğu gıda kaynaklı hastalıkların klinik, halk sağlığı ve ekonomik önemi vardır. Sadece *E. coli* O157:H7 serotipinin neden olduğu hastalıkların tedavi giderleri ve işgücü kaybı bedelinin yılda 229-610 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir (15).

ABD Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) verilerine göre sadece ABD'de gıda kaynaklı mikrobiyolojik hastalıklar yılda 76 milyon vakaya neden olmakta, bunlardan 300.000'i tedavi görülürken 5000 ölüm görülmektedir. *E. coli* O157:H7 ise 20.000 vaka ve 250 ölümden sorumlu tutulmaktadır (15).

*E. coli* O157:H7 serotipi diğer *E. coli* 'lerden, sorbitolü geç fermente etmesi,  $\beta$  - glucuronidase enzimine sahip olmaması, buna karşın intimini kodlayan *eae*

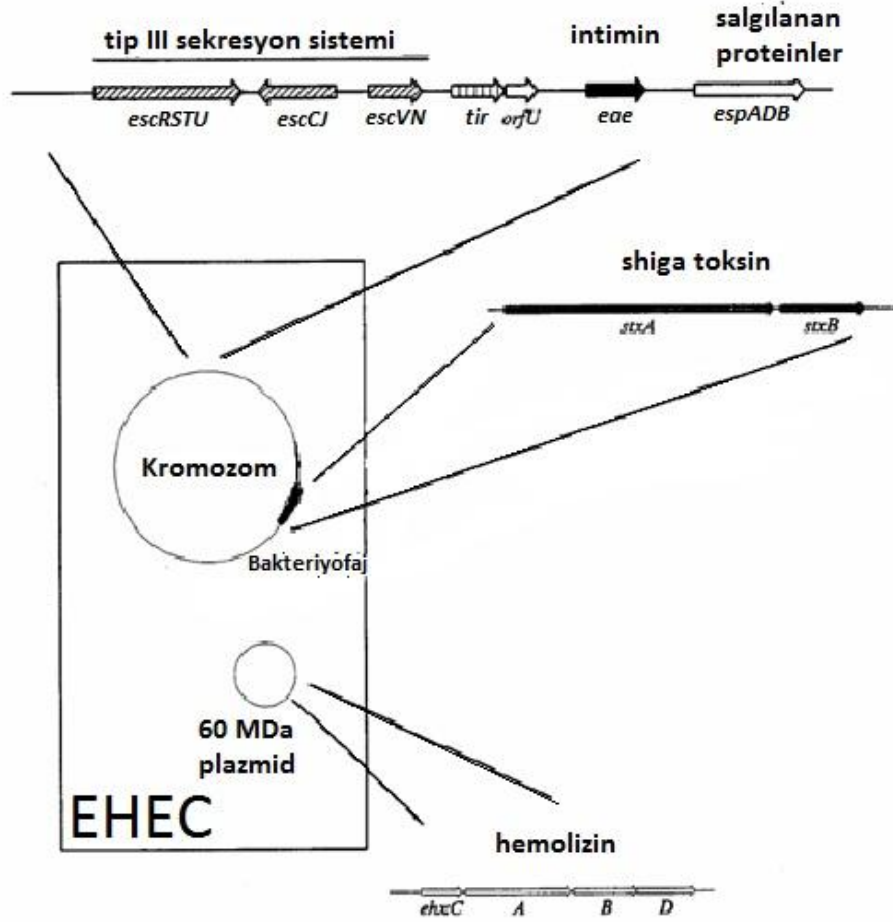
genine sahip olması ve enterohemolizin üretimi ile ayrılır. *E. coli*'lerin % 95'i sorbitolü 24 saat içinde fermente ederken *E. coli* O157:H7 sorbitolü 48 saat içinde fermente edememektedir. Yine *E. coli*'lerin % 97'si  $\beta$ -glucuronidase enzimi içerirken *E. coli* O157:H7 serotipi  $\beta$ -glucuronidase negatiftir (92).

*E. coli* O157:H7 serotipi de diğer *E. coli*'ler gibi optimum olarak 37 °C'de ve pH 7,2'de gelişir. Çeşitli araştırmalar gıda kaynaklı HK vakalarında anahtar rol oynayan *E. coli* O157:H7'nin aside dirençli olduğunu ve bu toleransının midenin kuvvetli asit ortamından rahatlıkla geçmesini sağladığını göstermiştir. Bu bakterinin aside direnci, insanlarda enfeksiyon dozunun çok düşük olmasını etkileyen bir faktör olarak kabul edilmektedir. *E. coli* O157:H7 Salmonella etkenlerine göre asidik ortamlarda daha uzun süre canlı kalabilmekte, pH 1-2 olan insan midesinde yaklaşık 3 saat süren sindirim sırasında canlı kalabilmesi ve buradan bağırsağa geçmesi bu ilişkiyi açıklamaktadır. Benzer şekilde mayonez, fermente etler, peynir gibi asitli gıdalarda diğer patojenler inhibe olurken, *E. coli* O157:H7'nin rahatlıkla gelişebildiği gösterilmiştir. Bu özelliği ile elma suyu ve geleneksel olarak güvenli kabul edilen fermente et ürünlerinde de canlılığını koruyabilmektedir (135, 173).

### **3. 2. 2. Virülens Faktörleri**

EHEC konusunda yapılan bilimsel çalışmaların çoğu etkene ait virülens faktörleri ve bu faktörlerin insanlardaki patojenitesi üzerinedir (Şekil 3). Hastalık tablosunun ortaya çıkmasında *stx* üretimi önemli olmasına rağmen tek başına yeterli değildir. Tam anlamıyla hastalığın şekillenmesi ve yaşamı tehdit edici boyutlara ulaşması için EHEC suşları A/E lezyonlarına ilaveten virülens

faktörlerini kodlayan plazmidlere de sahip olmalıdır. Etkenin patogenezinde rol alan birçok virülens faktörü tanımlanmıştır (42, 52).



Şekil 3: EHEC virülens faktörleri (138).

### 3. 2. 2. 1. Shigatoksin

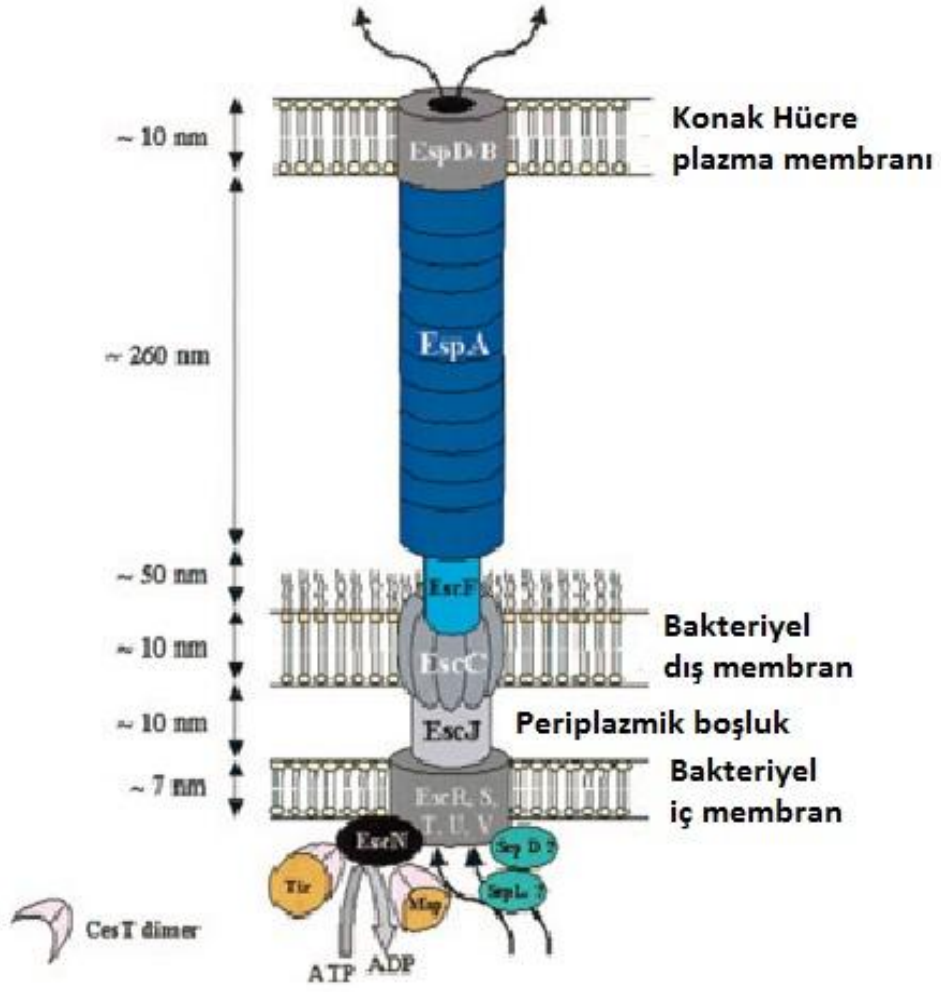
Shigatoksinler EHEC'in temel virülens faktörleridir. Bu toksin hastalarda başta ölüm olmak üzere birçok semptomun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Shigatoksinler, bakteriyofajlar tarafından sentezlenerek *stx*<sub>1</sub> ve *stx*<sub>2</sub> olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. *Stx*<sub>2</sub> grubu, *stx*<sub>1</sub> ve *S. dysenteriae* shigatoksin tip 1 ile % 50-60 homolog sekansa sahiptir. *Stx*<sub>1</sub> ise *S. dysenteriae* shigatoksin tip 1'den bir

amino asit farklıdır ve antijenik olarak bu toksinden ayırt edilemez (66, 87). *Stx<sub>1</sub>* stabil yapıda bir toksin olmasına rağmen *stx<sub>2</sub>* değişkendir ve *stx<sub>2</sub>*, *stx<sub>2c</sub>*, *stx<sub>2d</sub>*, *stx<sub>2e</sub>* ve *stx<sub>2f</sub>* varyantlarını içeren geniş bir listeye sahiptir. STEC suşları, *stx<sub>1</sub>* ve *stx<sub>2</sub>*'yi ayrı ayrı bulundurabildiği gibi her iki toksini birden barındırabilmektedir. Özellikle *stx<sub>2</sub>*, elde edilen izolatlarda daha fazla bulunmaktadır. Toksinlere bağlı komplikasyonlar ise konakçı ve toksinin türüne göre değişmektedir (42, 162, 168).

### 3. 2. 2. 2. LEE-İntimin

EHEC'in epitel hücrelerine bağlanması birçok sinyal aktarım mekanizmasını uyarmaktadır. Bu sinyal aktarımından sorumlu genler 35 kb büyüklüğündeki enterosit silme lokusu olarak adlandırılan (locus of enterocyte effacement, LEE) patojenite adasından (pathogenicity island, pais) kodlanırlar (3). LEE, üç farklı birimden oluşmakta, birincisi efektör molekülleri üreten tip III sekresyon sistemi (Şekil 4), ikincisi tip III sekresyon sisteminde görev alan proteinler (Espa, Esp vs), üçüncüsü ise intimin ve konakçı hücrenin plazma membranına yerleşen ve yer değiştiren intimin reseptörüdür (translocated intimin receptor, Tir) (42).

LEE'nin hem EPEC hem de EHEC suşlarında bulunduğu ortaya konmuştur (82). *E. coli* O157:H7'nin bağırsak kolonizasyonunda rol oynayan ve bağlanma faktörü olarak bilinen 94-97 kilodalton (kDa) büyüklüğündeki bir dış membran proteini olan (outer membrane protein, OMP) intimin, *eae* geni tarafından kodlanır.



**Şekil 4:** LEE tip III sekresyon sistemi (82).

İntiminin iki fonksiyonel rolü olup N terminal ucu (EPEC ve EHEC’de aynı yapıya sahip) bakteri dış membranında çıkıntı şeklinde yapı oluşturur ve dimerizasyonu sağlar. C terminal ucu (bakteriye göre değişkenlik gösterir) ise bakteriden uzayarak konakçı hücrenin plazma membranındaki reseptörlere bağlanır (82). İntiminin C-terminal ucundaki reseptöre bağlanan kısım serotiplere göre değişiklik gösterebilir. Bu nedenle intimin taşıyan EPEC ince bağırsak patojeni iken, EHEC kalın bağırsak patojenidir (42, 138).

LEE'de yer alan *eae* geni, bakterinin mukozal epitel hücrelerine bağlanarak A/E lezyonları oluşturmasını sağlar. A/E başlıca, etkenin bağırsak epitel hücrelerine tutunması, mikrovillilerin silinmesi ve epitel hücre yapısında değişiklikler meydana gelmesi ile karakterizedir. Tek başına A/E lezyonları dahi ishal nedeni olabilir (66).

Sekans ve antijenik çeşitliliğine göre çeşitli intimin alt tipleri ortaya konmuştur. Bunların başlıcaları  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  intimin türleridir. Intimin  $\alpha$  genellikle EPEC suşlarında bulunurken, intimin  $\gamma$  ve  $\epsilon$  EHEC suşlarında bulunmaktadır (42).

LEE pozitif suşlar, enfekte hücrede fonksiyonları bakteri lehine çevirmek için ökaryotik hücreye çeşitli proteinler yollarlar. Bu proteinlerden bir kısmı tip III sekresyon sistemini oluştururken, bir kısmı ise efektör moleküller olarak görev yaparlar (42, 120).

Konakçı hücre membranında bakteriye ait tip III sekresyon sistemi tarafından oluşturulan Tir, intiminin bağlandığı reseptördür. Bu protein (Tir) konakçı hücre membranına yerleşerek amino ( $\text{NH}_3$ ) ve karboksil ( $\text{COOH}$ ) uçları ile intiminin bağlanacağı yapıyı oluşturur. Tir-intimin bağlanması gerçekleştiğinde sonra tirozin fosforilasyonu ve aktin polimerizasyonu sonucu aktin filamentleri kümelenerek etken ile konak hücre arasında daha sıkı bir bağlanma şekillenir. Bu bağlanma ile mikrovillüsler silinir ve bakteri tarafından üretilen efektör proteinler konak hücreye aktarılır. Bu durum bağlanma ve silinme (A/E) ile sonuçlanır (82).

### **3. 2. 2. 3. Plazmidler**

*E. coli* O157:H7 suşları virülensleri açısından önemli olan plazmidlere sahiptirler. Bu plazmidler pO157 olarak adlandırılır ve 93,6-104 kb büyüklüğünde olup, enterohemolizini kodlayan genin büyüklüğü 3,4 kb civarındadır. Plazmidler

tarafından kodlanan ve epitel hücrelerine bağlanmada rolü olan yaklaşık 35 protein tanımlanmış olup, bunlardan fimbriya en önemlisidir.

Plazmidler ETEC suşlarının bağlanmasında görevliyken, EHEC'de bağlanma intimin ile gerçekleşmektedir. Yapılan bir çalışmada insan *E. coli* O157:H7 suşlarının % 99'unda pO157 plazmidi tespit edilirken, O157:H7 olmayan STEC suşlarının % 81'inde bu plazmide rastlanmıştır (138). Almanya'da yapılan bir çalışmada hastalardan izole edilen STEC suşlarının % 90'ında pO157 tespit edilmiştir. Araştırmacılar pO157 bulundurmayan *E. coli* suşlarıyla yaptıkları çalışmada bağlanma oranında düşüş veya hiç bağlanma olmaması gibi bir durum gözlemlemişlerdir. Patogenezisteki rolü tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen enterohemolizini kodlaması ve epitel hücrelerine bağlanmada görev alması nedeniyle bu plazmidlerin bakteri virülensi açısından önemli olduğu belirtilmektedir (42, 138)

#### **3. 2. 2. 4. Enterohemolizin**

*E. coli* O157:H7 suşlarında enterohemolizini kodlayan genler plazmitte yer almaktadır. Bu toksini kodlayan gen *ehxA* geni olup, invaziv *E. coli*'ler tarafından çeşitli tiplerde ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) hemolizinler üretilmektedir. Ancak üretilen hemolizinlerden bir tanesi EHEC'e spesifiktir. Eritrositlere olan etkileriyle tespit edilen ve EHEC suşlarıyla ilişkisi ortaya konan bu hemolizinelere enterohemolizin (EHEC-Ehly veya Ehx) adı verilmiştir. Enterohemolizin üropatojenik *E. coli*, *Mannheimia haemolytica* ve diğer insan patojenlerine ait toksinlerin yer aldığı RTX toksin ailesinde bulunur. Enterohemolizin, hedef ökaryotik hücrenin

sitoplazmik membranından giren ve porlar meydana getiren monomerik yapıdaki por şekillendiren bir toksindir (38, 118, 158).

Enterohemolizin, O157:H7'lerin çoğunda ve O157 olmayan STEC suşlarının bazılarında da bulunmaktadır. Enterohemolizinin rolü kesin olarak bilinmemekle birlikte, bu virülens faktörüne sahip *E. coli* O157:H7 suşları, eritrositleri lize ederek açığa çıkan hemoglobinden sağladığı demir kaynağı sayesinde konakçıda daha fazla üreme yeteneği gösterir (118, 138).

### 3. 2. 3. Patogenezis

Birçok hayvan türünden shigatoksijenik *E. coli* O157 izole edilmesine karşın hayvanlarda, insanlardakine benzer klinik semptomlar bildirilmemiştir. Domuzlarda 1949 yılında ödem hastalığına neden olan bir toksin keşfedilmiş ve ödem hastalığı toksini olarak adlandırılmıştır. Daha sonra shigatoksinlerin keşfedilmesi ile bu toksinin *stx<sub>2e</sub>* alt tipi olduğu tespit edilmiştir. *Stx<sub>2e</sub>* üreten STEC suşları domuzlarda ödem hastalığına neden olurken *stx<sub>1</sub>* toksini üretmezler. Domuzlarda *stx<sub>2</sub>* damarlarda hasara ve hemorajiye neden olarak, etkilenen dokularda ödem oluşturur. STEC suşları en çok sığır, koyun ve keçilerden izole edilmiş olmasına karşın köpek, domuz ve kedilerde de nadiren gözlenmektedir. Ayrıca atlarda, kanatlılarda, sineklerde ve vahşi hayvanlarda da izolasyon bildirilmiştir (4, 66, 155).

İnsanlarda toksijenik özelliği olan EHEC suşları sağlıklı evcil hayvanlarda da bulunmaktadır (110). Yapılan çalışmalara göre EHEC O157:H7 hayvanlarda hastalığa neden olmamaktadır. Özellikle sığırlar O157:H7 ile kolonize olmalarına rağmen herhangi bir hastalık belirtisi tespit edilmemiştir. Bunun nedeni olarak ise

sığırlarda Gb3 reseptörlerinin bulunmaması, etkenin invazyona neden olabilecek özellikte olmaması düşünülmektedir (55).

Yapılan bir çalışmada, bir günlük civcivlere oral yolla *E. coli* O157:H7 ( $10^8$ ) verilerek etkenin kolonizasyonu ve gayta ile atılımı incelenmiştir. Kontrol ve deney grubundaki hiçbir hayvanda diyare, solunum güçlüğü ve ağırlık kaybı gibi herhangi bir klinik belirti tespit edilmemiştir. Etkenin en çok sekuma yerleştiği ve 4-28. günlerde en yüksek sayıda bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca enfekte civcivlerin 90 güne kadar etkeni taşıdığı ortaya konmuştur (28). Başka bir deneysel çalışmada ise etkenin gayta ile atılımının dört ay sonunda en yüksek seviyeye çıktığı ve 10 ay kadar devam ettiği bildirilmiştir (159).

STEC suşları için *stx* üretimi ve konakçıda kolonize olması virülens açısından önemli olmakla birlikte, patogeneizde birçok virülens faktörü rol oynamaktadır. Bütün STEC'ler HK veya HUS'a neden olmayabilir, bahsedilen hastalık tablolarının oluşması için diğer virülens faktörlerine de ihtiyaç duyulabilir (42).

*E. coli* O157:H7'nin insanlarda yapmış olduğu hastalıklar HK, HUS ve trombotik trombositopenik purpura (TTP) olmak üzere üç şekilde görülür (151). Bunlardan HK, 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 kanlı olabilir. Hastalığın ortaya çıkması genellikle 3-9 gün (ortalama 4 gün), hastalık süresi ise 2-9 gündür (66, 92).

Shigatoksin üretimi EHEC hastalıkları için bir ön koşuldur. Toksin intestinal epitel hücrelerini geçebilme yeteneğinde olup, bağırsak, böbrek ve diğer iç organlara giden kılcal damarların endotel hücrelerine ulaşma yeteneğine

sahiptir (170). Glomerül ve beyne ait mikrovasküler endotel hücreleri üzerine etkileri, HUS ve merkezi sinir sistemi bozukluklarına sebep olan protrombotik ve proinflamatuvar etkinlikleri nedeniyle shigatoksinler ishal sonrası komplikasyonları ile hayatı tehdit etmektedir (51).

Shigatoksinler, ökaryotik hücre yüzeyinde bulunan ve spesifik glikolipid reseptörü olan globotriaosylceramide (Gb3) bağlanır. Gb3 *stx<sub>1</sub>* için asıl reseptörken, *stx<sub>2</sub>* ve varyantları Gb4 reseptörlerini kullanır. Nadiren de olsa bazı HUS hastalarından *stx<sub>2</sub>* sentezleyen suşlar izole edilmiştir. İnsanların bazı organları Gb3 yönünden zengin olup bu reseptöre bağlanan toksin, 28S rRNA'yı bloke ederek protein sentezini inhibe eder. Protein sentezindeki bozulma renal endotel hücrelerinin, intestinal epitel hücrelerinin veya Gb3 reseptörüne sahip herhangi bir hücrenin ölmesine sebep olmaktadır. Gb3, insan böbrek hücrelerinde yüksek oranda bulunmakta olup, *stx*'in böbrek endotel hücreleri için sitotoksik olduğu *in vitro* olarak da ortaya konmuştur. Glomerüler endotel hücrelerinde şişkinlik, glomerül içinde trombosit ve fibrin artışı böbreklerde meydana gelen toksine bağlı başlıca değişikliklerdir. *Stx*, glomerüler endotel hücrelerinde hasara, kapillar damarlarda daralmaya, glomerül damarlarında trombosit ve fibrin artışı sonucu tıkanmaya neden olur. Glomerüler filtrasyonun azalması, akut renal yetmezliğe neden olur ve bu HUS için tipik bir durumdur. Daralan damarlar eritrositlere zarar verir ve HUS'ta parçalanmış eritrositler gözlenmesinin sebebi budur. *Stx<sub>2</sub>*, HUS gelişmesinde *stx<sub>1</sub>*'den daha fazla öneme sahip olup bu toksini salgılayan O157:H7 suşlarının, *stx<sub>1</sub>* sentezleyenlerden daha fazla HUS'a neden olduğu rapor edilmiştir (108, 138, 153, 168).

EHEC O157:H7 kökenli ishaller sonucunda, sporadik vakalarda % 2-7, salgınlarda ise % 20 oranında HUS gözlenmektedir. HUS, mikroanjyopatik hemolitik anemi, trombositopeni ve akut böbrek yetmezliğini içeren üç klasik durumdan oluşur. Çocuklarda akut böbrek yetmezliği yapar ve sınırlı tedavi seçeneği olup, hemodiyaliz ve destek tedavisi uygulanmaktadır. Bunların dışındaki tedaviler şikâyetleri ortadan kaldırmakta çok etkili olmamaktadır. Etkilenen çocukların % 3-5'inde ölüm ve % 12-30'unda böbrek yetmezliği, hipertansiyon ve merkezi sinir sisteminde etkilenmeler ortaya çıkmaktadır (66, 87, 92, 138, 147).

TTP'da ise klinik ve patolojik özellikler HUS'a benzer, ancak merkezi sinir sistemi bozukluğu genellikle temel özelliktir. Hastalıkta beyinde kan pıhtısı oluşur ve bu durum genellikle ölüme neticelenir. Bununla beraber *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarında TTP'nin nadir olarak görüldüğü bildirilmektedir (92, 153).

*E. coli* O157:H7 enfeksiyonları gençlerde daha etkilidir. Japonya'da yapılan araştırmalarda gençlerin ve çocukların *E. coli* O157:H7 serotipinin yapmış olduğu hastalıklara duyarlılığı açık bir şekilde gösterilmiştir. Dışkılarında bu bakteriye rastlanan 20 yaş altındaki kişilerin % 80'den fazlası tipik semptomları gösterirken, yine dışkılarında *E. coli* O157:H7 serotipi bulunan 30-46 yaş arasındaki kişilerin % 70'inde tipik semptomlar gözlenmemiştir (92, 168).

### **3. 2. 4. Epidemiyoloji**

*E. coli* O157 sığır, koyun, keçi, domuz, kedi, köpek, piliç, martı gibi pek çok hayvanın gaytasında bulunabilir. Etkenin, insanlara bulaşmasında en önemli kaynağın sığırlar olduğu bildirilmektedir. Birçok ülkedeki sığır işletmelerinde *E.*

*coli* O157'nin % 1-15 oranında tespit edildiği rapor edilmiştir (138, 154). Etkenin epidemiyolojisinde dikkat çeken unsurlar, enfektif dozun düşük olması ve başta sığır olmak üzere sindirim sisteminde etkeni taşıyan hayvanlar aracılığıyla kontamine edilen gıda ve suların tüketilmesidir (33, 75, 163).

Genel olarak besi ve süt sığırları etkenin başlıca rezervuarı olarak kabul edilmesine karşın, çiftlik çevresinde bulunan koyun, geyik, köpek, kuş, sinek, at, yem, su ve insanlardan alınan örneklerden *E. coli* O157 izole edilmesi sığırların etken rezervuarlarından yalnızca birisi olduğu kuşkusunu artırmaktadır (50).

Araştırmaların çoğu sığırlarda gerçekleştirildiğinden, diğer potansiyel rezervuar hayvanların özellikle kanatlıların rolü hakkındaki bilgiler yetersiz kalmaktadır. Sığırlar ve etken izole edilen diğer hayvanlar göz önüne alındığında, etkenin konakçı spesifitesi ve ekolojisi hakkındaki verilerin yetersiz olduğu görülmektedir.

Hancock ve ark. (1998), *E. coli* O157'nin doğada yaygın olmasının, sporadik olarak ruminant ve ruminant dışındaki hayvanlarda kolonize olmasıyla ilgili ekolojik bir hipotez sunmuştur (94). Bu hipoteze göre; *E. coli* birçok mikroorganizma gibi çevrede ve çiftliklerde bulunmaktadır. Bu nedenle sığırlar etkenin konakçılarından birisidir ve diğer türler düşünüldüğünde belki de en düşük öneme sahiptir. Her ne kadar çiftlikler arası bulaşmanın sığırlar aracılığı ile olduğu söylene de bu olay sığır dışındaki hayvanlarla da gerçekleşebilir (94, 122).

*E. coli* O157 prevalansının mevsimsel olarak değiştiği bildirilmiş olup, genelde yaz aylarında etkende artış olduğu gözlenmiştir. Etkenin yayılmasında rol

oyunayan risk faktörleri tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte iklim, yağış, ışımaya periyodu, sürü yönetimi gibi faktörler etkili olabilir (66, 121, 157).

Etken başta sığır olmak üzere domuz, koyun, kanatlı etleri ve yine başta hamburger ve köfte olmak üzere kıyma ile hazırlanan et ürünlerinden sıklıkla izole edilmektedir. Farklı hayvanların dışkılarının, eti farklı düzeylerde kontamine edebileceği gösterilmiştir (7, 30, 92).

Beyaz etin daha sağlıklı olması nedeniyle tüketimi, kırmızı ete göre her geçen gün daha da artmaktadır. Kırmızı et tüketiminin çeşitli nedenlerle (günümüzde et fiyatlarının yükselmesi, besicilikle ilgili problemler) giderek azalmasıyla ortaya çıkan hayvansal protein açığı, tavuk eti üretimindeki artışlarla dengelenmeye çalışılmaktadır. Türkiye’de fert başına düşen piliç eti tüketimi 1990 yılında 3,8 kg iken 2008’de 15,7 kg’a yükselmiştir (11, 12). Bu durumda, *E. coli* O157 ile kontamine tavuk etlerinin tüketilmesinin insan sağlığını ciddi şekilde etkileyebileceği söylenebilir.

Kesim veya işleme esnasında etlerin *E. coli* O157 ile kontamine olması, bu patojenin gıda zincirine girmesine neden olmaktadır (21). Süt ürünlerinde *E. coli* kaynağı çoğunlukla fekal kökenlidir. Bu yüzden özellikle kıyma ve pastörize edilmemiş süt gibi çiğ veya az pişmiş gıdaların tüketilmesi *E. coli* O157:H7’nin en önemli bulaşma yoludur. Son bulgular, sığır gaytasıyla kontamine sebze ve meyvelerin de *E. coli* O157 suşlarının taşınmasına katkı sağladığını ortaya koymaktadır (2, 14).

İnsanlarda *E. coli* O157 enfeksiyonlarından kaynaklanan en büyük salgın 1996 yılında Japonya’nın Sakai Osaka şehrinde meydana gelmiştir. Bu salgında

çoğu öğrenci olan 8000 kişi etkilenmiştir. Etkene maruz kalan 106 çocukta HUS şekillenmiş ve bunlardan üç tanesi ölmüştür (179).

Kuzey Amerika’da 1992-1993 yılı kış mevsimi boyunca Washington, Idaho, Nevada, ve Kaliforniya’yı kapsayan dört batı eyaletinde çoğunluğu çocuk olan 723 kişide *E. coli* O157:H7 enfeksiyonu gözlenmiştir. Çocukların 55’inde HUS belirlenmiş ve bu hastalardan dördü ölmüştür (107).

Avrupa’daki en büyük O157:H7 salgını ise 1996 yılında İskoçya’da görülmüştür. Yalnızca bir kasaptan alınan etken ile kontamine eti tüketen 501 kişi hastalanmış ve bu hastalardan 20’si hayatını kaybetmiştir (54, 125). Kuzey Amerika ve İngiltere’de meydana gelen enfeksiyonlar, hamburger veya sığır eti ürünlerinin tüketilmesiyle meydana gelmiştir (87, 107).

Çeşitli araştırma sonuçları bu bakterinin memeli ve kanatlı hayvanların gaytaları ile ete, süte, toprağa, suya ve dolayısıyla tüm çevreye yayıldığını göstermiştir. Dünya çapındaki enfeksiyonların çok büyük bir bölümü yetersiz pişirilmiş et ve pastörize edilmemiş süt olmak üzere sığır kaynaklı kontamine gıdalar ile olmuştur (61). Yeterince pişirilmemiş kontamine sığır etlerinin ve nadiren de olsa çiğ sütlerin tüketilmesiyle insanlarda bu serotipten kaynaklanan pek çok vakanın görülmesi, sığırların etkenin başlıca rezervuarı olarak kabul edilmesine sebep olmuştur. Sığır etlerinin yanı sıra, domuz ve koyun etlerinden hazırlanan hamburger ve köfte gibi kıymalardan ve piliç karkaslarından etken izolasyonu bildirilmektedir (5).

Amerika’nın üç büyük eyaletinde ve 29 ülkede 2003 yılında yapılan *E. coli* O157 prevalans çalışmasında besi sığırlarından % 13,8, süt sığırlarından % 5,9, domuzlardan % 3,6, koyunlardan % 5,2 ve keçilerden % 2,8 oranında etken izole

edilmiştir (13). Sığırlar başlıca rezervuar kabul edilmekle beraber (93, 180), bu patojeni barındıran koyun, keçi, domuz, köpek, at, kanatlı ve geyikler de potansiyel rezervuarlardır (44, 78, 111, 117).

Doyle ve Schoni (1987), et ve et ürünlerinde yapılan bir çalışmada sığır etlerinde % 3,7, kuzu etlerinde % 2 ve tavuk etlerinde % 1,5 oranında *E. coli* O157 izolasyonu bildirmişlerdir (65).

Hindistan'da 500 tavuk ve 25 güvercinin izlendiği çalışmada iki tavuk ve bir güvercinde *E. coli* O157 izole edilirken (178), Wallace ve ark. (1997), martı orijinli 691 *E. coli* suşundan 13 (% 1,9) tanesinin O157 serotipi olduğunu ortaya koymuştur (176). Oral yolla farklı dozlarda *E. coli* O157 verilerek yapılan bir deneysel çalışmada, tavukların inokülasyondan 10-11 ay sonra kadar etkeni taşıdıkları ortaya konmuştur. Aynı çalışmada 11 ayın sonunda tavukların % 13,9 (14/101)'unun yumurta kabuğundan *E. coli* O157 izole edilirken, yumurta sarısında ve akında etkene rastlanmamıştır (159).

Fransa'da yapılan bir başka araştırmada ise tavuk, sosis ve sığır kıyması incelenmiş ve dört tavuk örneğinde verotoksin oluşturmayan *E. coli* O157 tespit edildiği bildirilmiştir (5). Abdul-Raouf ve ark. (1996) Mısır'da 50 tavuk örneğinin ikisinden *E. coli* O157 izole ederken (1), hindilerle yapılan başka bir çalışmada % 1,4 oranında *E. coli* O157 izole edilmiştir (96).

Türkiye'de etkenin insanlardaki prevalansı hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (91). İlk defa Zarakolu ve ark. (1999), insanlardan O157 izolasyonunu bildirirken (188), kıyma ve hamburgerde ise ilk olarak 1998'de izolasyon yapılmıştır (25). Türkiye'de sığırlarda yapılan çalışmalarda etken

izolasyonunun % 1,3 -16,6 arasında değiştiği rapor edilmiştir (22, 57, 142, 186, 187).

Türkiye’de bağet, göğüs ve kanattan oluşan 190 tavuk karkasıyla yapılan bir çalışmada % 1,1 (2/190) oranında O157 serotipi izole edilmiştir (5). Farklı kanatlı türlerinin gastro-intestinal sistemlerinin incelendiği birçok çalışma tavukların etkenin taşınmasında büyük öneme sahip olduğunu göstermektedir. Başka bir çalışmada, tavuklarda % 6 (3/50), güvercin ve martılarda ise % 4 (2/50) oranında *E. coli* O157 serotipi izole edilmiştir (89). Buna karşılık uluslar arası birçok çalışmada, tavuk (35, 46), devekuşu (124) ve güvercinlerden (60, 148) alınan örneklerde *E. coli* O157 izole edilememiştir.

### **3. 2. 5. Antibiyotiklere Direnç**

Son 20 yılda *E. coli* O157:H7 izolatlarında antibiyotiklere karşı dirençte artış görölmüştür (171). Etkenin farklı hayvan türlerinde hangi antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği konusunda birçok çalışma yapılmıştır (86, 166). Kim ve ark. (2005), 23 antibiyotikle yaptığı çalışmada izolatların % 45,5 oranında iki ya da daha fazla antibiyotiğe direnç gösterdiğini ortaya koymuştur (114). İzolatlar amoksisilin/klavulanik asit ve karbenisiline % 9,1, cephalothine % 18, tetrasikline % 18,2, ampisiline % 27,2 ve eritromisine % 100 direnç göstermiştir. Hindistan’da yapılan bir çalışmada ise ampisiline % 25,4, tetrasikline % 23,8, streptomisine % 14,3 ve cephalothine % 11,1 oranında direnç tespit edilmiştir (114). ABD’de tilmicosine (% 100) Malezya’da bacitracine (% 100), sulphafurazole (% 77), ampisiline (% 57), cephalothine (% 53) ve karbenisiline (% 30) dirençli izolatlar bulunmuştur (167). Japonya’da ampisilin, fosfomycin, kanamycin, ve vancomycin

etkisiz olarak saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda ortak olarak *E. coli* O157'nin ampisilin ve tetrasikline yüksek oranda dirençli olduğu tespit edilmiştir (14, 114, 165, 167).

### **3. 2. 6. Teşhis**

Şüpheli örneklerde *E. coli* O157:H7'nin varlığı genellikle konvansiyonel yöntemlerle araştırılır. Buna göre; materyalde *E. coli* O157:H7'nin varlığının gösterilmesi sırasıyla selektif bir sıvı besiyerinde zenginleştirme, selektif ve ayırt edici bir katı besiyerine ekim, şüpheli kolonilerin biyokimyasal ve/veya lateks aglutinasyon testleri ile *E. coli* O157 olarak belirlenmesi ve son olarak izolatın H7 antijeni içerip içermediğinin belirlenmesi aşamalarından oluşur. *E. coli* O157 olduğu saptanan izolatların shigatoksin analizlerinin de yapılması gerekmektedir (92, 137). Ancak, konvansiyonel teşhis yöntemleri ile yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların alınması, yeni teşhis metotlarının geliştirilmesinin önünü açmıştır. Bu amaçla, immunomanyetik seperasyon (IMS), serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır.

#### **3. 2. 6. 1. Konvansiyonel Yöntemler**

İlk olarak selektif zenginleştirme besiyerlerinde etkenin çoğalması sağlanır. Daha sonra, selektif antibiyotik ve biyokimyasal ajanlardan oluşan supplement eklenmiş Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) besiyerine ekim gerçekleştirilir (45). *E. coli* O157 izolasyonunda çeşitli zenginleştirme besiyerleri kullanılmakta olup, bunlar modifiye tryptic soy broth (mTSB), modifiye *E. coli* broth (mEC) ve Buffered peptone water (BPW) vs. gibi besiyerleridir. Bu

besiyelerine novobiocin, cefixime, cefsulodin, vancomycin gibi antibiyotikler katıldığında daha yüksek sensitivite ile izolasyon gerçekleştirilebilmektedir. Genel olarak 1/9 oranında besiyeri ile homojenize edilen örnek, 41-42 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmakta (48) ve bu sürenin sonunda selektif bir katı besiyerine ekilmektedir (59, 66, 140).

Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi (CDC), kanlı ishal veya HUS görülen hastalardan alınan numunelerin rutin kültür işlemlerinde selektif katı besiyeri olan SMAC'ın kullanılmasını önermektedir. Etkenin hızlı ve güvenilir bir şekilde izolasyon ve identifikasyonu hastalığın teşhisi açısından büyük öneme sahiptir. Çoğu hasta, genellikle HUS semptomları başladıktan sonra hastaneye başvurmakta ve etken yönünden araştırılmaktadır. İshalden sonraki iki gün içinde alınan gayta örneklerinden *E. coli* O157:H7 izolasyonu % 100'e ulaşmaktadır. Üç gün sonra kültür yapıldığında bu oran % 91,7'ye, altıncı günde ise % 33,3'e düşmektedir (15, 138).

Selektif katı besiyeri olarak günümüzde en yaygın kullanılan besiyeri SMAC ve bu besiyerinin çeşitli modifikasyonlarıdır (101, 168). Bu besiyerinin standart MacConkey agardan farkı, bileşiminde laktoz yerine sorbitol bulunmasıdır. *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitolü geç fermente etmesinden dolayı bu besiyerinde renksiz koloniler oluştururken, sorbitolü kullanan bakterilerin oluşturduğu asitlik bir pH indikatörü yardımı ile kolonilerin kırmızı görülmesine neden olmaktadır. Böylece *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol pozitif bakterilerden ayırt edilmektedir (31, 138).

SMAC agar besiyerleri sorbitol reaksiyonlarına dayalı olarak yeterli düzeyde bir ayırt edici özellik sağlamakla beraber, zayıf bir selektiviteye sahiptir ve dolayısıyla hedef bakteri yanında pek çok bakterinin de gelişmesine izin

vermektedir. Bu nedenle SMAC agar besiyeri çeşitli selektif katkıları ile desteklenmekte ve böylece besiyerinde diğer etkenlerin üremesi baskılanarak selektivite kazandırılmaya çalışılmaktadır. Etkenin araştırılmasında, 5-bromo-4-chloro-3-indoxyle- $\beta$ -D-glucuronic acid (BCIG), cefixime ve potasyum tellurite, ramnoz, cefixime ve 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucronide (MUG) katkılı besiyerleri çalışmalarda kullanılmaktadır (90). Bunlardan yeni bir sefalosporin olan cefixime, sorbitol negatif olan *Proteus* sp.'nin inhibisyonu için önemlidir. Tellurit ile desteklendiğinde *E. coli* O157:H7 dışında kalan ve başta yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı olmak üzere diğer yöntemler ile baskılanamayan diğer *E. coli*'leri ve *Aeromonas* sp. türlerini de önemli ölçüde etkilemektedir (59, 66, 92, 136).

SMAC dışında, phenol red sorbitol (PRS) + MUG agar, Levin EMB agar, hemorragic colitis (HC) agar, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) agar, BCM O157 agar, CHROMagar O157, modifiye edilmiş EMB (mEMB) agar, fluorocult *E. coli* O157 agar ve standart enterik agar besiyerleri de çeşitli denemelerde kullanılmıştır (92, 128, 129).

Klasik yöntemlerle *E. coli* O157:H7'nin izolasyonunda yoğun refakatçı flora varlığına bağlı olarak sıklıkla yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir. Benzer şekilde analiz edilen diğer mikroorganizmalarda da olduğu gibi, selektif zenginleştirme ortamı olarak kullanılan besiyerinde *E. coli* O157:H7 serotipi ile aynı düzeyde gelişebilen *E. coli* tip 1, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp. ve *Hafnia alvei* gibi etkenler üreyebilmektedir. Bu besiyerlerinde, diğer etkenlerin hızla çoğalarak *E. coli* O157'yi baskılaması nedeni ile hatalı negatif sonuçlar alınabilmektedir. Hedef bakterinin selektif sıvı ve katı besiyerlerinde gelişebilen refakatçı flora içindeki oranı en düşük % 1 olmalıdır. Bu orandan daha düşük

konsantrasyonlarda bulunacak hedef bakterinin agarda görülmesi ve izolasyonu mümkün olmayabilir (140).

### 3. 2. 6. 2. Serolojik Yöntemler

*E. coli* O157 suşlarının serolojik yöntemlerle belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan test, lateks aglutinasyon testidir. SMAC agarda üretilen sorbitol negatif koloniler, lateks testine tabi tutularak kısa sürede identifikasyona gidilebilir. Bununla birlikte, fekal örneklerde de bulunabilen *Escherichia hermannii* sorbitol negatif olup, *E. coli* O157 antiserumu ile aglutine olabilmekte ve böylece bu iki etken arasındaki serolojik benzerlik yanlış identifikasyon sonuçlarına neden olmaktadır (92).

Sadece “O” antijeni kullanıldığında, diğer bakterilerin lipopolisakkarit antijenlerindeki yapısal benzerlikler nedeni ile yanlış pozitif sonuçlar alınabilmektedir. Esas olarak O157 poliklonal antikor kullanılan yöntemlerde alınan yanlış pozitif sonuçlar bu testlerin yaygın kullanımını kısıtlamıştır. O157 poliklonal antiserumu *Escherichia hermannii*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, *Pseudomonas maltophilia* ve diğer bazı enterik bakteriler ile çapraz reaksiyona girmektedir. Bu çapraz reaksiyondan sorumlu olan genel epitop hücre duvarı lipopolisakkaridinde bulunan 4-amino-4,6-dideoxy- $\alpha$ -D-mannopyranose'dur (92).

STEC O157:H7'nin teşhisinde kullanılan diğer serolojik yöntemler, etkenin O ve H serotipinin ortaya konmasını hedeflemektedir. Bu amaçla; enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), immunofloresan antikor (IFA), reverse passive latex aglutinasyon (RPLA) ve immuno peroksidaz gibi birçok

testin ticari formları bulunmaktadır (70, 115, 144, 175). Ayrıca, *stx*<sub>1</sub> ve *stx*<sub>2</sub> için oluşturulmuş monoklonal antikorları içeren serolojik testler de bulunmaktadır. Bu testlerin geliştirilmesi ve kullanılmaya başlanması daha önemli hale gelmiştir, çünkü O157 olmayan ama *stx* içeren suşlar da bu sayede teşhis edilebilmektedir (56, 59, 84, 139).

### **3. 2. 6. 3. İmmunomanyetik Separasyon (IMS)**

Gıda ve gayta örneklerinden *E. coli* O157:H7'nin izolasyonunda yoğun refakatçi flora varlığına bağlı olarak klasik yöntemlerle sıklıkla yanlış negatif sonuçlar alınmış, benzer şekilde selektif zenginleştirme ortamı olarak kullanılan besiyerlerinde *E. coli* O157:H7 serotipi ile birlikte diğer mikroorganizmaların ürediği gözlenmiştir (79). Buna çözüm olarak direkt örneğe ya da ön zenginleştirme besiyerine, etkene spesifik O157 antikorları ile kaplı manyetik boncukları içeren solüsyon eklenerek etkenin saf olarak izolasyonu amaçlanmıştır. Bu yöntem immunomanyetik separasyon (IMS) olarak adlandırılmakta ve Amerika Birleşik Devletleri Tarım Departmanı (United States Department of Agriculture, USDA), Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) ve CDC tarafından *E. coli* O157:H7'nin izolasyonu için ön zenginleştirmeyi müteakip kullanılması önerilmektedir (8, 15, 16, 17, 66).

### **3. 2. 6. 4. Moleküler Yöntemler**

Son yıllarda genetik materyali hedef alan moleküler yöntemler mikroorganizmaların teşhisi için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan tekniklerden birisi olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bakterilerin teşhisinde

çok önemli bir metot haline gelmiştir (9). PCR, serotipi doğrulamada ve virülens faktörlerini ortaya koymada oldukça güvenilir bir moleküler yöntemdir. PCR ile O157 (*rfbE*) ve H7 (*fliC*)'yi kodlayan genler teşhis edilerek serotip konfirme edilmektedir. Etkene ait virülens genlerinin teşhisinde *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *eae* ve *ehxA* gen bölgelerine spesifik PCR metotları geliştirilmiştir (59, 74). Ayrıca multipleks PCR (mPCR) ve real-time PCR da teşhiste sıklıkla kullanılmaktadır (76). Multipleks PCR, birden çok gen bölgesini çok sayıda primer çifti kullanarak bir defada amplifiye edebilmektedir. Multipleks PCR ile beş primer seti kullanılarak *eae*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *fliC* ve *rfbE* gen bölgeleri amplifiye edilmiştir (100). Real-time PCR ise komplementer DNA'nın hedef DNA ile hibridizasyonu esnasında floresan ışık yayması esasına göre çalışmakta ve florojenik prob sayesinde eş zamanlı olarak amplifikasyonun izlenmesini sağlamaktadır (76, 164).

Microarray yöntemi, binlerce spesifik DNA ve RNA sekansını eş zamanlı olarak ve 1-2 santimetrekarelik küçük bir cam ya da silika lam üzerinde incelemeye yarar. Çok hızlı bir analiz yöntemi olmasına karşın bir takım zorlukları vardır. Malzemeleri pahalı ve sınırlı olup bunun yanısıra uzmanlık isteyen bir teknolojidir. Bu problemlere rağmen bu teknoloji, yakın zamanda çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (41, 64, 104).

### **3. 2. 6. 4. 1. Alt Tiplendirme**

Enfeksiyöz etkenlerin gösterdikleri genetik varyasyonlar antijenitelerini olduğu kadar patojenitelerini de etkilemektedir. Benzer klinik bulguları göstermesine rağmen antijeniteleri ve patojeniteleri farklı alt tipler birçok enfeksiyonda gözlenmektedir. Hastalıklardan izole edilen mikroorganizmaların

tiplendirilmesi sadece etkin sağaltımda değil aynı zamanda koruyucu önlemlerin alınması ve eradikasyon planlarının kısa sürede hazırlanabilmesi açısından da oldukça önemlidir (113, 181).

STEC O157:H7'nin tiplendirilmesinde fenotipik ve genotipik yöntemlerden faydalanılmaktadır. Bir suş diğerlerinden farklı fenotipik ve genotipik yapıya sahip ise farklı bir izolat olarak kabul edilmektedir. Salgınların aydınlatılabilmesi ve vakalar arasındaki ilişkinin belirlenebilmesi için suş tiplendirme çok önemlidir. En çok kullanılan fenotipik metotlar; serotiplendirme (92, 99), faj tiplendirme (66, 138) ve toksin tiplendirme testleridir (66).

Fenotipik ilişkiye bağlı tiplendirme metotlarının, etkenin benzer biyokimyasal özellikleri ve toksin alt tipinin tespit edilememesi gibi nedenlerden dolayı yetersiz kalması, genotipik veya DNA dizilerine bağlı moleküler yöntemlerin gelişmesine yol açmıştır.

Epidemiyolojik çalışmalarda O157:H7 serotipine ait suşların ayrımı için birçok teknik kullanılmaktadır. Diğer patojen bakterilerde olduğu gibi moleküler epidemiyolojik teknikler, EHEC salgınlarının araştırılmasında çok büyük öneme sahiptir. Böylece enfeksiyon kaynağını ortaya koymak mümkün olmaktadır (138). Başlıca genotipik tiplendirme yöntemleri plazmid DNA analizi (20, 66), restriksiyon parçalarının uzunluk polimorfizmleri (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) (39, 138, 156), ribotiplendirme (24, 112), random amplification of polymorphic DNA (RAPD) (98, 114, 152) ve sekans analizleridir (58, 177, 185). Bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajlarının yanı sıra bugün en çok kullanılan ve CDC tarafından tavsiye edilen alt tiplendirme metodu Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemidir (15).

PFGE tekniğinde, saf kültürlerden elde edilen bakteriler eritilmiş agaroz jel içerisinde plug adı verilen kaplarda bloklanır ve bu agaroz blok, önce deterjan ve enzimle muamele edilerek bakterilerin genomik DNA'sı elde edilir ve sonra da spesifik bir restriksiyon enzimi ile kesilir (83). Makro boyutta kesilen DNA fragmentleri dalgalı, değişken, dik elektriksel sahada CHEF (countour-clamped homogeneous field electrophoresis) tekniği kullanılarak agaroz jelde separe edilir. Bu teknikte, otuzdan az DNA fragmenti üretilmekte ve 20 ile 700 kb uzunluğundaki 10-20 fragment elde etmek için standart protokollerde kullanılan restriksiyon enzimi olan *XbaI* önerilmektedir. Elektroforez aygıtında yürütüldükten sonra oluşan görünümü gözlemlemek için jel ethidium bromide ile boyanarak yorumlanmaktadır (67, 85).

PFGE analizinde sonuçların, suşlar arasındaki genetik ve epidemiyolojik ilişkilere göre kategorileri ve bunlara neden olan durumlar dört şekilde ortaya çıkmaktadır (169):

- 1- Karşılaştırılan suşların restriksiyon görünümleri aynı sayıda banda sahip ve bant uzunlukları birbirine uyuyorsa, izolatların genetik olarak identik olduğu kabul edilir.
- 2- İncelenen izolatlar arasında DNA'da tek bir genetik olay (bir ekleme veya çıkma, bir nokta mutasyonu gibi) sonucunda değişiklik saptanıyorsa ve fark 2-3 bant ile sınırlıysa iki suşun yakın ilişkili olduğu kabul edilir.
- 3- Karşılaştırılan iki suş arasında, iki bağımsız genetik olaya bağlı olarak 4-6 bant farklı olarak gözlemlenirse suşların aynı soya ait olmakla birlikte yakın ilişkili olmadığı kabul edilir.

4- Üç veya daha fazla bağımsız genetik olay içeren ve yedi veya daha fazla bant farklılığı gösteren suşlar ise birbiriyle ilgisiz olarak değerlendirilir (67, 169).

PFGE, CDC pulstnet üyeleri tarafından kullanılan bir alt tiplendirme metodudur (15, 85). Vaka izleme, araştırma ve STEC O157:H7 saha izolatlarının epidemiyolojisini belirlemede en yaygın kullanılan alt tiplendirme yöntemidir (133, 182). Karşılaştırmalı çalışmalar göstermiştir ki PFGE, faj tiplendirme, plazmid profilinin belirlenmesi ve toksin tiplendirmeye kıyaslandığında ayırım gücü en yüksek alt tiplendirme metodudur (27).

PFGE, sonuçları tekrarlanabilir bir teknik olup laboratuvarlar arası sonuçlar mukayese edilebilir niteliktedir. Bu tekniğin dezavantajı ise zaman alan ve pahalı bir teknik olmasıdır (27, 116). PFGE'yi iki restriksiyon enzimiyle paralel yapmak ayırım gücünü artırmaktadır, fakat bu durum çok zaman ve iş gücü gerektirmektedir. Epidemiyolojik saha çalışmalarında mümkünse karma alt tiplendirme metotları kullanılması önerilmektedir (23, 43, 66, 138).

### **3. 2. 7. Tedavi**

EHEC'de tedavi, destek tedavisi ile sınırlıdır. EHEC suşları birçok antibiyotiğe duyarlı olmasına rağmen antibiyotik kullanımı tercih edilmemektedir. Retrospektif çalışmalarda, *E. coli* O157:H7 ile enfekte kişilerden antibiyotik kullananlarda HUS riskinin arttığı tespit edilmiştir. Bu nedenle antibiyotik kullanımı EHEC enfeksiyonlarında kontrendike kabul edilmektedir. Antibiyotik kullanımının iki nedenle zararlı olabileceği bildirilmiştir. Alınan antibiyotiklerle bakterinin lize olması, daha fazla toksin açığa çıkmasına neden olabilir veya antibiyotikler diğer kolon bakterilerini öldürerek toksinin daha yüksek oranda

sistemik absorpsiyona uğramasını sağlayabilir (138). *In vitro* çalışmalar, EHEC O157:H7'nin antibiyotik (mitomisin) ile muamele edilmesinin toksin salınımını arttırdığını ortaya koymuştur. Kanser kemoterapotiği olan mitomisinin kullanıldığı kanser hastalarında HUS insidensinin arttığı bildirilmiştir (183). DNA sentezini baskılayan antibiyotiklerin (kinolonlar, tirmetoprim mitomisin) de *in vitro* ve *in vivo* olarak toksin salınımını artırdığı tespit edilmiştir (15, 138, 168, 183).

EHEC enfeksiyonuna bağlı kanlı ishalin hiçbir safhasında bağırsak motilitesini baskılayan ilaçların veya narkotik ilaçların verilmesi tavsiye edilmemektedir. Bu ilaçların verilmesinin HUS ve nörolojik komplikasyonları tetikleyebileceği öne sürülmektedir (168). Ancak böbrek kan akışını hızlandırması için non-steroid antiinflamatuar ilaçların verilmesi ve destek sıvı tedavisi yapılması önerilmektedir (168, 183).

EHEC'ten kaynaklanan böbrek hastalıklarının tedavisinde destek tedavisi uygulanmaktadır. Diyaliz kan filtrasyonu, eritrosit transfüzyonu ve trombosit infüzyonu gibi destek tedavileri önerilmektedir. Daha ciddi tablolarda böbrek nakli de gerekebilir. HUS öncesinde böbreklerin optimum korunması için intravenöz sıvı tedavisi uygulanmasının HUS esnasında daha az böbrek hasarına neden olduğu bildirilmiştir (138, 168, 183).

Japonya Sağlık Bakanlığı, *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarında norflaxacin kullanılmasını önermektedir. Alternatif bir yol olarak 38 bitkiye ait ekstraktların *E. coli* O157:H7 üzerine *in vitro* etkisi araştırılmış ve bitkilerden iki tanesi etkili bulunmuştur (174).

### **3. 2. 8. Prognoz**

Yapılan araştırmalar, çoğu *E. coli* O157:H7 olgusunda klinik Őikâyetlerin ve semptomların bir hafta içinde sona erdiğini ve spontan iyiliŐme meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Hastanede kalma süresi 11 güne kadar çıkabilmesine karşın ortalama yedi gündür. *E. coli* O157:H7 vakalarının % 10'unda HUS gelişebildiği ve böyle vakaların yaklaşık % 5'inde ölüm Őekillendięi bildirilmiştir. İyileŐen HUS hastalarının bazılarında böbreklerde hasar oluŐabildięi, buna karşın çocuklar ve yaşlılarda böbreklerde daha ciddi hasarlara neden olarak bu organın fonksiyonunu yapamadığı rapor edilmiştir (153, 168).

### **3. 3. AMAÇ**

Bu çalışmada; Türkiye'de teşhisi bakımından ciddi sıkıntılar yaşanan ve çok az sayıda laboratuvar tarafından izolasyon ve identifikasyon işlemi gerçekteŐirilen, gerek hayvanlarda gerekse insanlarda taramalar yapılırken göz ardı edilen *E. coli* O157 serotipinin broyler tavuk örneklerindeki varlığının etken izolasyonu ile ortaya konulması, moleküler yöntemlerle karakterize edilerek virülens genlerinin saptanması, PFGE ile alt tiplendirmesinin yapılması ve böylece izolatların genetik ilişkilerinin ortaya konması amaçlandı. Ayrıca bu çalışmada, broyler izolatları ile insan izolatları arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koymak amacıyla, hastanelerden temin edilen ishalleri hastalara ait gayta örnekleri incelendi.

## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4. 1. Örneklerin Toplanması

#### 4. 1. 1. Broyles Tavuklarda Örnek Toplanması

Bu çalışma, Türkiye'nin doğusunda bulunan Malatya ve Elazığ illerindeki üç farklı broyles kesimhanesinden alınan örneklerle gerçekleştirildi. Bu üç işletme Malatya, Elazığ, Diyarbakır ve Adıyaman bölgesinde yaklaşık olarak 30.000 km<sup>2</sup> alanda 450 civarında sözleşmeli üretici (kümes) ile çalışmakta ve günlük ortalama 20.000 adet kesim yapmaktadır. Her kümeste ortalama 12.000 adet broyles yetiştirilmektedir. Kesimi yapılan broylesler başlıca Doğu ve Güneydoğu olmak üzere 25 farklı ilin yanı sıra son zamanlarda Kuzey Irak'ta da tüketime sunulmaktadır (işletme sahipleri ile kişisel görüşme). Örnekler iki ilde (Elazığ, Malatya) bulunan broyles kesimhanesine gelen 25 farklı kümesden alındı. Örneklerin alındığı hayvanlar; Elazığ ve Malatya illerinde toplam 16 farklı yerde lokalize olup, ortalama yaşı 43 günlüktü.

Elazığ ve Malatya illerindeki üç farklı tavuk kesimhanesine Eylül 2009-Nisan 2010 tarihleri arasında birer hafta arayla gidilerek, iç organlar takım halinde steril poşetlere alındı. Elazığ'daki kesimhaneden 500 ve Malatya'daki iki farklı kesimhaneden 250'şer adet olmak üzere toplam 1000 broyles ait örnekler temin edildi. Ayrıca kesim esnasında rastgele olarak toplam 1000 adet broylesden alınan karkas svap örnekleri eppendorf tüplerdeki 20 mg/l novobiocin (Lab M) içeren 1 ml modifiye tryptic soy broth (mTSB) (Merck 1.05459) içinde süspanse edildi.

#### **4. 1. 2. İnsan Gayta Örneklerinin Temin Edilmesi**

Broyler iç organlarının toplandığı tarihler arasında, Malatya’da iki (M ve N) ve Elazığ’da üç (U, S, Ç) olmak üzere beş hastanedeki ilgili birimlere başvurularak ishali hastalara ait toplam 367 gayta numunesi temin edildi. Bu örneklerin 61’i Malatya’daki, 306’sı ise Elazığ’daki hastanelerden temin edildi.

#### **4. 2. Kültür**

Sekum ve karaciğer iç organlardan dikkatli bir şekilde ayrılarak ısıtılan spatül ile yüzeyleri dağlandı. Steril bisturi ve makas kullanılarak yaklaşık 1g alınan örnekler 20 mg/l novobiocin (Lab M) içeren 5 ml modifiye tryptone soya broth (mTSB) (Merck 1.05459) bulunan tüplere inoküle edildi. Aynı şekilde karkas svap örneklerinin süspanse edildiği 1 ml sıvı besiyeri de 5 ml mTSB içine aktarıldı.

İnsan gayta örnekleri de 5 ml mTSB’de iyice süspanse edildi. Ekim yapılan tüm brothlar 41,5 °C’de 24 saat inkubasyonda ön zenginleştirmeye bırakıldı. Bu inkubasyon sonunda brothlar hem direkt hem de immunomanyetik separasyona tabi tutulduktan sonra, 0,05 mg/l cefixime ve 2,5 mg/l tellurite (SR0172, Oxoid) supplement içeren sorbitol MacConkey Agara (CT-SMAC) (Merck 1.09207.0500) ekimleri yapılarak 37 °C’de 24 saat inkube edildi. Bu çalışmada kullanılan SMAC besiyeri BCIG veya MUG içermemektedir.

#### **4. 2. 1. İmmunomanyetik Separasyon (IMS)**

Bu çalışmada sadece broyler sekum ve insan gayta örneklerine IMS uygulandı. Karaciğer ve karkas örnekleri, sekum örneklerine göre daha az bakteri yükü taşıdığından bu örneklere IMS uygulanmadı.

Zenginleştirme yapılan örneklerden 1 ml broth eppendorf tüplere alınarak 20 µl manyetik partiküllerle işaretli anti-*E. coli* O157 antikoruna (Dynabeads anti-*E. coli* O157 Dynal, Oslo) ilave edilip oda sıcaklığında dairesel karıştırıcıyla 25 dakika inkube edildi. Sonra tüpler manyetik konsantratöre (MPC-S, Dynal) kondu ve partiküller çöktürüldü. Üstte kalan sıvı dikkatlice aspire edildikten sonra yıkama yapıldı. Üç yıkamadan sonra, pelete 50 µl distile su eklenerek vortekslendi ve bu süspansiyondan 40 µl CT-SMAC besiyerine ekilerek 37 °C’de 24 saat inkube edildi.

Sorbitolü fermente etmeyen (şeffaf) koloniler seçilerek PCR ile O157 (*rfbE*) geninin ve diğer virülens genlerinin varlığı araştırıldı. *E. coli* O157 olarak tespit edilen izolatlar saf olarak elde edildikten sonra PFGE ile tiplendirildi.

#### **4. 3. DNA Ekstraksiyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

Direkt ekim ve IMS sonrası ekim yapılan CT-SMAC besiyerinde üreyen şüpheli 3-5 koloni alınarak eppendorf tüplerde 300 µl distile su ile homojenize edildi. Sonra her tüpe 300 µl TNES buffer (20 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, % 0,2 SDS) ve 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) eklenerek 56 °C’de 2 saat inkube edildi. Süspansiyon, 10 dakika kaynatıldıktan sonra eşit hacimde fenol katılarak 5 dakika elle kuvvetlice sallandı. On dakika 11,600 g’de santrifüj edilerek üst sıvı dikkatlice bir başka eppendorf tüpe alındı. Üzerine sodyum asetat (toplam hacmin 1/10’u) ve etanol (toplam hacmin 2,5 katı) eklenerek -20 °C’de bir gece çöktürmeye bırakıldı. On dakika santrifüj edilen süspansiyondan elde edilen pelet sırasıyla % 95 ve % 70’lik 300 µl etanol ile iki defa yıkandı ve her

yıkamadan sonra 5 dakika santrifuj edildi. Kurumaya bırakılan pelete son olarak 100 µl distile su eklenerek DNA süspansiyonu elde edildi.

Toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PCR karışımına 5 µl 10X PCR buffer (750 mM Tris-HCl, pH 8,8, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, % 0,1 Tween - 20), 5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, her bir deoxynucleotide triphosphattan 250 µM, 1,25 U Taq DNA Polymerase enzimi (MBI, Fermentas), tüm spesifik oligonükleotid primer çiftinin (Tablo 1) her birinden 20 pmol ve 5 µl hedef DNA ilave edildi. PCR reaksiyonları Techne TC-512 gradient thermalcycler (Techne, İngiltere) cihazında gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonunda 94 °C'de 2 dakika ön denaturasyon aşamasını takiben, toplam 35 PCR siklusu 94 °C'de 1 dakika denaturasyon, 55 °C'de 1 dakika hibridizasyon ve 72 °C'de 1 dakika DNA sentezi olarak gerçekleştirildi. Ayrıca, *stx*<sub>1</sub> ve *stx*<sub>2</sub> genlerinin tespiti için multiplex PCR (m-PCR) kullanıldı.

Amplifiye edilen PCR ürünleri % 1,5'lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dakika süreyle boyandı ve sonuçlar jel dokümantasyon sisteminde gözlemlendi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp'lik DNA ladder (MBI, Fermentas SM 0321) kullanıldı. Tüm PCR uygulamalarında pozitif kontrol olarak referans *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894, ATCC 43895) suşları ve negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

İzolatlarda ilk olarak O157 geninin (O157 *rfbE*) varlığı araştırıldı. Daha sonra *E. coli* O157 pozitif örneklerde, H7 antijenini kodlayan (*fliCh7*), shigatoksin 1 ve 2 (*stx*<sub>1</sub> ve *stx*<sub>2</sub>), bağlanma/silme (*eae*, intimin) ve enterohemolizin (*ehxA*)

genlerinin varlığı bu genlere spesifik primer çiftleri kullanılarak PCR yöntemiyle araştırıldı (Tablo 1).

**Tablo 1:** *E. coli* O157'nin ve virülens genlerinin tiplendirilmesinde kullanılan primerler.

Gen	Primer	Oligonükleotid sekansı (5'-3')	bp	literatür
<i>stx1</i>	VT1-A	CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC	302	(36)
	VT1-B	CGTGGTATAGCTACTGTCACC		
<i>stx2</i>	VT2-A	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	516	(36)
	VT2-B	CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC		
O157 <i>rfbE</i>	O157-AF	AAGATTGCGCTGAAGCCTTTG	497	(62)
	O157-AR	CATTGGCATCGTGTGGACAG		
<i>fliC7</i>	H7-F	GCGCTGTGAGTTCTATCGAGC	625	(81)
	H7-R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC		
<i>eae</i>	eaeAF	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	(146)
	eaeAR	CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
<i>ehxA</i>	HlyA1	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG	1551	(34)
	HlyA4	TCTCGCCTGATAGTGTGGTA		

Ayrıca, *E. coli* O157 pozitif bulunan örneklerden rastgele seçilen dört örnek (iki adet broyler, iki adet insan izolatu) O157 (*rfbE*) genine spesifik PCR ile amplifiye edildikten sonra, elde edilen ürünler sekanslamaya gönderildi.

#### 4. 4. Pulsed Field Gel Elektrophoresis (PFGE)

Bu çalışmada kullanılan PFGE yöntemi CDC PulseNet üyeleri tarafından kullanılan standart protokole göre gerçekleştirildi (43).

##### 4. 4. 1. Ön Hazırlık

Biyokimyasal ve/veya moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış bakterilerden % 5 kanlı triptik soy agar besiyerine (veya kanlı agar) tek

koloni ekimi yapıldı. 37 °C’de 14-18 saat inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edildi ve saf olarak üreyen koloniler kullanıldı.

Tris EDTA (TE) Buffer (10 mM Tris: 1 mM EDTA, pH 8,0) ile % 1 SeaKem Gold (SKG): % 1 SDS agarozu hazırlandı ve kullanılıncaya kadar 55–60 °C’de benmaride bekletildi. Kültür numaraları yazılmış her tüpe (falcon) 2 ml hücre süspansiyon buffer (HSB) (100 mM Tris,100 mM EDTA, pH 8,0) kondu. Agardan bakterileri almak için HSB ile ıslatılmış steril pamuk svap kullanıldı ve svab yavaşça çevrilerek bakteriler buffera aktarıldı. Hücre süspansiyonundaki bakteri yoğunluğu, spektrofotometre yardımıyla 610 nm dalga boyunda 1,35 (1,3-1,4 aralığında) absorbans olacak şekilde ayarlandı.

#### **4. 4. 2. Agaroz Kalıpların Dökülmesi**

Her örnek için 400 µl hücre süspansiyonu alınarak kültür numaraları yazılmış 1,5 ml’lik Eppendorf tüplere dağıtıldı. Her tüpe 20 µl proteinase K (20 mg/ml) eklendi ve pipetle yavaşça karıştırıldı. % 1 SKG agaroz: % 1 SDS karışımından 400 µl hücre süspansiyonuna eklendi ve birkaç kez pipetaj yapılarak karıştırıldı. Karışımın sıcaklığını korumak için tüpler 55-60 °C’ye ayarlı kuru ısı bloğunda (Techne Dri-Block DB-2D, İngiltere) tutuldu. Agaroz-SDS/bakteri karışımından hava kabarcığı oluşmasına izin vermeden kuyucuklara dağıtıldı. Her örnek için iki kalıp dökülerek katılaşması için +4 °C’de 5-10 dakika bekletildi.

#### **4. 4. 3. Agaroz Kalıplardaki Hücrelerin Lizisi**

Kültür numaraları yazılan 50 ml’lik falcon kapaklı tüplere 5 ml Hücre Lizis Buffer (HLB; 50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8,0 + % 1 Sarcosyl) ve 25 µl

Proteinase K (20 mg/ml) dağıtıldı. Donmuş agarozun fazlası bisturi ile kesilerek düzeltildi. Agaroz kalıplar kendi numaralarının yazılı olduğu falcon tüplere atıldı. Tüpler 54 °C çalkalayıcı benmaride 1,5-2 saat inkübe edildi.

#### **4. 4. 4. Hücre Lizisinden Sonra Agaroz Kalıpların Yıkınması**

Tüpler benmariden çıkarılıp ızgaralı kapakla tutularak lizis solüsyonu dikkatlice döküldü. İçinde agaroz kalıp bulunan tüpe, ısısı 50 °C olan steril ultrasaf sudan 10-15 ml eklenerek, 50 °C'ye ayarlı çalkalayıcı benmaride 10-15 dakika bekletildi. Su tamamen dökülüp, su ile yıkama işlemi bir defa daha tekrarlandı. Daha sonra 10-15 ml TE buffer (50 °C) eklenerek 50 °C'ye ayarlanmış çalkalayıcı benmaride 10-15 dakika inkübe edildi. TE buffer döküldü ve TE buffer ile yıkama aşamaları üç defa daha tekrarlandı. Son yıkamadan sonra 5-10 ml TE eklendi. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu. Eğer hemen restriksiyon enzimi ile muamele edilmeyecekse +4 °C'de TE içinde saklandı.

#### **4. 4. 5. Agaroz Kalıplardaki DNA'nın *XbaI* Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi**

10X H buffer [(500 mM Tris-HCl:100 mM MgCl<sub>2</sub>:1000 mM NaCl:10 mM Dithioerythritol DTE)] steril ultra saf su ile 1:10 oranında sulandırıldı. Her eppendorf tüpe 200 µl 1X H buffer dağıtıldı. Agaroz kalıpların her biri ayrı ayrı bir steril petri kabı üzerine alındı. Bir bisturi yardımıyla kalıplar 2 veya 2,5 mm boyunda kesildi ve H buffer içeren tüpe atıldı. Kalan kalıp parçası 5 ml TE içine atılarak +4 °C'de saklandı. Referans suştan 3-4 parça kesildi ve H buffera kondu.

Örnek ve referans suşa ait agaroz parçacıkları çalkalayıcı benmaride 37 °C’de 10 dakika inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda sıvı, mikropipet ile aspire edilerek her tüpe enzim/buffer karışımından (Tablo 2) 200 µl eklenip, çalkalayıcı benmaride 37 °C’de 2 saat inkübe edildi.

**Tablo 2:** PFGE örnek/enzim sulandırma oranları.

Ayıraçlar	µl/örnek
Steril ultra saf su	175
10X H Buffer	20
Enzim (10 U/µl)	5
Toplam hacim	200

#### 4. 4. 6. Agaroz Jel Dökülmesi

##### 4. 4. 6. 1. Enzimle Kesilmiş Agaroz Parçalarının Tarak Üzerine Yüklenmesi

Yüzde 1’lik SKG agaroz 0,5X TBE’de hazırlandı. Alüminyum folyo ile erlenin ağzı kapatıldı ve 55-60 °C’ye ayarlı benmariye kondu.

Jel kaseti, jel platformu ve tarak tutucunun yönü ayarlandı ve dişlerin alt tarafının jel platformuna tamamen değmesi sağlandı. Etkeni içeren agaroz parçaları *XbaI* ile kesildikten sonra benmariden çıkarıldı ve enzim-buffer karışımı uzaklaştırıldı. 200 µl 0,5 X TBE eklenerek oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Agaroz parçaları tüplerden çıkarılıp, tarak yan yatırılarak parçaların her biri ayrı ayrı tarak dişlerinin en ucuna kondu. Referans suş 1, 5, 10 (10 kuyucuklu jelde) numaralı dişlere veya 1, 5, 10, 15 (15 kuyucuklu jelde) numaralı dişlere yüklenirken kalan kuyulara da diğer örnekler yüklendi.

Tarak dişleri üzerindeki fazla buffer, kağıt mendille uzaklaştırılıp parçalar 5 dakika kurumaya bırakıldı. Örnek konulan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi. Kalıpların siyah zeminle aynı düzeyde olması ve hava boşluğu kalmaması sağlandı. Benmariden çıkarılan ve sıcaklığı yaklaşık 55-60 °C olan % 1'lik agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü. Biraz bekleddikten sonra jelin iyice donması için 20 dakika buzdolabına kondu. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarılıp kuyucuklar % 1'lik SKG agarozla doldurularak 3-5 dakika donması beklendi.

#### **4. 4. 6. 2. Enzimle Kesilmiş Agaroz Parçalarının Kuyucuklara Yüklenmesi**

Jel kaseti, jel platformu ve tarak tutucunun yönü ayarlanıp, tarak dişlerinin alt tarafının jel platformundan 2 mm yüksekte kalması sağlandı. Kabarcık oluşturmadan 55-60 °C'deki SKG agarozu kasete döküldü. Birkaç dakika bekleddikten sonra jelin iyice donması için 20 dakika buzdolabında bekletildikten sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. RE ile kesilmiş agaroz kalıpları benmariden çıkarılıp enzim-buffer karışımı uzaklaştırıldı. 200 µl 0,5X TBE eklenerek oda ısısında 5 dakika inkube edildi. Agaroz parçaları tüplerden çıkarıldı ve kuyucuklara uygun şekilde yerleştirildi. Kalıplar kuyucuğun dibine kadar itildi ve kuyucuğun ön duvarına tamamen değmesi sağlanarak hava boşluğu kalmamasına özen gösterildi. Referans suş 1, 5, 10 (10 kuyucuklu jelde) numaralı dişlere veya 1, 5, 10, 15 (15 kuyucuklu jelde) numaralı dişlere yüklenirken kalan kuyulara da

diğer örnekler yüklendi. Kuyucuklar % 1'lik SKG agarozla doldurularak 3-5 dakika donması beklendi.

Her iki yükleme yöntemi de farklı zamanlarda kullanıldı ve iki yöntemde de elektroforeze aynı şekilde devam edildi. Agaroz ile doldurulan kuyucuklar donduktan sonra siyah çerçeve alınarak elektroforez tankına kondu. PFGE tankına 0,5X TBE bufferından 2 L kondu. Soğutma modülü açılarak (14 °C) pompa 70'e (= 1 litre/dakika) ayarlandı ve yaklaşık 30 dakika sirkülasyon yapıldı. TBE ısısı 14 °C'ye düştükten sonra agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılıp, siyah platformla beraber üzerindeki jel kasetten alınarak tankın içindeki çerçeveye yerleştirildi ve tank kapağı kapatıldı. Elektroforez koşulları ayarlanmadan 15 dakika daha sirkülasyon yapılarak jel ile TBE ısısının eşitlenmesi sağlandı.

#### **4. 4. 7. Elektroforez**

CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belçika) uygulanan elektroforez koşulları; başlangıç vuruş süresi 2,2 sn, bitiş vuruş süresi 54,2 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm<sup>2</sup>, sıcaklık 14 °C, süre 20 saat olarak ayarlandı.

#### **4. 4. 8. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi**

Elektroforezden sonra jel, 40 µg ethidium bromid (10 mg/ml) içeren 400 ml ultra saf su içine alındı ve 20 dakika boyandı. Jel görüntüleme sisteminde (infinity 3000 WL, Vilber Lourmat, Fransa) UV ışıktaki DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi ve TIFF formatında kayıt edildi. BioD 1++ (infinity capt software, Vilber Lourmat, Fransa) yazılım sistemi kullanılarak bant profilleri analiz edildi.

#### 4. 5. Kültür, PCR ve PFGE Aşamalarında Kullanılan Ayıraçlar

##### 4. 5. 1. Kültür Aşamasında Kullanılan Besiyeri ve Ayıraçlar

#### **Tryptic Soy Broth, CASO Broth (Casein-pepton Soymeal-peptone Broth) (Merck, Almanya)**

Peptone from casein	17 g
Peptone from soymeal	3 g
Glucose	2,5 g
Sodium Chloride	5 g
Dipotassium hydrogen phosphate	2,5 g

#### **Novobiocin supplement (Lab M, İngiltere)**

Novobiocin	10 mg/vial
------------	------------

30 g CASO broth (Merck 1.05459) 1000 ml distile suda benmari usulü ile ısıtılarak iyice eritilip, otoklavda 121 °C’de 15 dakika tutulduktan sonra soğuması beklendi. Ardından her vial 5 ml steril distile su eklenerek iki vial (20 mg) Novobiocin supplement sulandırılıp 1000 ml sıvı besiyerine eklenip iyice karıştırıldıktan sonra hazırlanan modifiye TSB tüplere dağıtıldı.

#### **Sorbitol MacConkey Agar (SMAC-Agar Basis), (Merck, Almanya)**

Peptone	20 g
Sodium chloride	5 g
Safra tuzları	31,5 g
Sorbitol	10 g

Neutral red	0,03 g
Kristal viyole	0,001 g
Agar-agar	15 g

#### **Cefixime-Tellurite Selective supplement (Oxoid, İngiltere)**

Potassium tellurite	1,25 mg
Cefixime	0,025 mg

25,8 g SMAC (Merck 1.09207.0500) 500 ml distile suda benmari usulü ile ısıtılarak iyice eritildi. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildikten sonra 50 °C’ye soğuması beklendi. Ardından bir vialde iki ml steril distile su eklenerek Cefixime Tellurite Selective supplement (SR172E, Oxoid) sulandırıldı ve 500 ml besiyerine eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra hazırlanan CT-SMAC petrilere dağıtıldı.

#### **Kanlı Agar (Blood Agar Base No 2), (Oxoid, İngiltere)**

Proteose peptone	15 g
Liver digest	2,5 g
Yeast extract	5 g
Sodium chloride	5 g
Agar	12 g

40 g kanlı agar (Oxoid CM0271) 1 L distile su içerisinde eritilip, 121 °C’de 15-20 dakika otoklavlandı. Besiyeri 45-50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 7 steril koyun kanı ilave edildi. Dikkatli bir şekilde karıştırılıp steril petri kutularına 15-20 ml taksim edildi.

**Dynabeads® anti-E.coli O157 (Invitrogen Dynal AS, Oslo,  
Norveç)**

*E. coli* O157'ye karşı oluşturulmuş antikorların adsorbe edildiği, super-paramagnetic, polystyrene mikroskopik boncuklar phosphate buffered saline (PBS) pH 7,4, % 0,1 bovine serum albumin (BSA) ve % 0,02 sodium azide (NaN<sub>3</sub>) ile hazırlanmış süspansiyondur.

**Phosphate Buffered Saline-Tween (PBS Tween):**

0,15 M NaCl, 0,01 M Sodium-phosphate buffer, pH 7,4, % 0,05 Tween-20 hazırlanarak 121 °C'de 15 dakika steril edilerek kullanıldı.

**4. 5. 2. PCR İşleminde Kullanılan Ayıraçlar**

**4. 5. 2. 1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayıraçlar**

**Proteinase K Solüsyonu (100 mg, Sigma, St. Louis, MO, ABD)**

1 ml'sinde 20 mg olacak şekilde steril distile su ile hazırlandı.

**TNES Buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, %  
0,2 Sodyum Dodesil Sülfat-SDS)**

Tris	0,048 g
NaCl	0,175 g
EDTA	0,075 g
SDS	0,04 g
Steril Distile Su	20 ml

Maddeler tartılarak steril distile su ile 20 ml'ye tamamlandı ve her örnek için 300 µl kullanıldı.

#### **4. 5. 2. 2. PCR Analizinde Kullanılan Ayraçlar**

##### **10X PCR Buffer (MBI Fermentas, Litvanya)**

750 mM Tris-HCl (pH 8,8; 25 °C)

200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

% 0,1 Tween 20

Her PCR numunesi için 5 µl kullanıldı.

##### **MgCl<sub>2</sub> (MBI Fermentas, Litvanya)**

25 mM MgCl<sub>2</sub> her PCR numunesi için 5 µl kullanıldı.

##### **dNTP Set (100mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP; MBI Fermentas, Litvanya)**

Her deoksinükleotitten eşit oranda alındı ve steril distile su ile 1/20 oranında sulandırılıp her PCR numunesi için 4 µl kullanıldı.

##### **Taq DNA Polymerase Enzimi (500 U; MBI Fermentas, Litvanya)**

Her PCR numunesi için 1,25 U (0,25 µl) kullanıldı.

##### **Primerler (IDT, Coralville, ABD)**

Çalışmada kullanılan tüm primerler Integrated DNA Technologies (IDT) firmasından temin edildi. Primerler PCR işleminin optimizasyonu

esnasında her PCR numunesi için ortalama 25-50 pmol olacak şekilde ayarlandı.

#### **4. 5. 2. 3. PCR Elektroforez İşleminde Kullanılan Ayıraçlar**

##### **5X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu**

Tris 54,4 g

Borik Asit 27,2 g

EDTA 4,6 g

Yukarıdaki maddeler tartılıp distile su ile 1 L'ye tamamlanarak, pH 8,3'e ayarlandı. Elektroforez solüsyonu olarak 1/5 oranında sulandırılarak kullanıldı.

##### **Agarose LE, (Promega, Madison, ABD)**

PCR ürünlerinin gözlenmesi için hazırlanan agaroz jeli 1X TBE ile % 1,5 oranında hazırlandı.

##### **100 bp DNA Ladder (50 µg/100 µl; MBI Fermentas, Litvanya)**

1/6 oranında sulandırıldı ve agaroz jel kuyucuğuna 5 µl yüklendi.

##### **6X Loading Dye (Yükleme Boyası) Solüsyonu (MBI Fermentas, Litvanya)**

1/5 oranında sulandırıldı ve her 20 µl PCR ürünü için 5 µl kullanıldı.

**Ethidium Bromide (10 mg/ml; AppliChem GmbH, Darmstadt,  
Almanya)**

Ethidium bromide solüsyonundan 0,5 ml alınarak distile su ile 15 ml'ye tamamlandı. Agaroz jelin boyanması için 300 ml distile suya 600 µl ethidium bromide katılarak (0,5 µg/ml) kullanıldı.

**4. 5. 3. PFGE İşleminde Kullanılan Ayıraçlar**

**50 ml 1M Tris Solüsyonu (pH: 8)**

Tris 6,05 g

Steril ultra saf su (SUSS) ile 50 ml'ye tamamlandı.

**200 ml 0,5 M EDTA Solüsyonu (pH: 8)**

EDTA 37,2 g

SUSS ile 200 ml'ye tamamlandı.

**50 ml % 10 Sarcosyl Solüsyonu**

Sarcosyl 5 g

SUSS ile 50 ml'ye tamamlandı.

**250 ml Hücre Süspansiyon Tamponu (100 mM Tris, 100mM  
EDTA pH: 8)**

1 M Tris (pH: 8) 25 ml

0,5 M EDTA (pH: 8) 50 ml

SUSS ile 250 ml'ye tamamlandı.

**1000 ml Tris-EDTA solüsyonu (10 mM Tris, 1 mM EDTA  
pH:8)**

1 M Tris (pH: 8) 10 ml

0,5 M EDTA (pH: 8) 2 ml

SUSS ile 1000 ml'ye tamamlandı.

**100 ml Hücre Lizis Buffer (50 mM Tris, 50 mM EDTA pH: 8 +  
% 1 Sarcosyl)**

1 M Tris (pH: 8) 5 ml

0,5 M EDTA (pH: 8) 10 ml

% 10 Sarcosyl 10 ml

SUSS ile 100 ml'ye tamamlandı.

**25 ml 10X H buffer (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 1000  
mM NaCl, 10 mM Dithioerythritol)**

1 M Tris-HCl 12,5 ml

MgCl<sub>2</sub> 0,238 g

NaCl 1,430 g

DTE 0,0385 g

Yukarıdaki maddeler tartılarak SUSS ile 25 ml'ye tamamlandı.

### **15 ml % 20 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) solüsyonu**

SDS 3 g

Madde tartılarak SUSS ile 15 ml'ye tamamlandı.

### **500 ml 10X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) solüsyonu**

Tris 54,4 g

Borik Asit 27,2 g

EDTA 4,6 g

Yukarıdaki maddeler tartılıp SUSS ile 500 ml'ye tamamlandı.

Elektroforez solüsyonu olarak 1/20 oranında sulandırılarak kullanıldı.

### **Ethidium Bromide (10 mg/ml; AppliChem GmbH, Darmstadt, Almanya)**

Ethidium bromide solüsyonundan 40 µl alınarak 400 ml SUSS'ya katılıp (1 µg/ml) agaroz jel bu solüsyona konarak boyandı.

## **4. 6. İstatistiksel Analiz**

Kültür ve PCR sonuçları değerlendirilerek izolasyon ve identifikasyon oranları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemliliğini ortaya koymak amacıyla Yates corrected  $\chi^2$  testi kullanıldı.  $P < 0,05$  bulunan değerler istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

## 5. BULGULAR

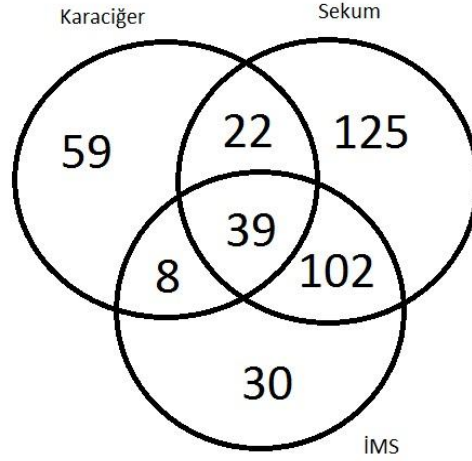
### 5. 1. Broyler Örneklerinin Bakteriyolojik Kültür Bulguları

Elazığ ve Malatya’da bulunan üç farklı kanatlı kesimhanesinden rastgele toplanan 1000 broylere ait iç organ örnekleri (sekum ve karaciğer) ve karkas svab örnekleri mTSB’de ön zenginleştirme yapıldıktan sonra hem direkt hem de IMS ile SMAC besiyerine geçildi. Sorbitol negatif olan izolatlar SMAC besiyerinde saman sarısı renginde, şeffaf görünümlü koloniler oluşturdu.

Bakteriyolojik muayene sonucunda bu şekilde koloni gözlenen izolatlar *E. coli* O157 şüpheli olarak değerlendirildi. Çalışmada örnek toplanan broylerlerin % 38,5’inde (385/1000) sorbitol negatif izolat elde edildi. Direkt ekim sonrası sorbitol negatif etken izolasyon oranı sekum örneklerinde % 28,8 (288/1000) iken karaciğer örneklerinde bu oranın % 12,8 (128/1000) olduğu tespit edildi (Tablo 3). Sekum örneklerinin IMS sonrası kültüründe ise toplam 179 (% 17,9) sorbitol negatif izolat saptanırken bunların 141’inin her iki yöntemde de tespit edildiği, buna karşılık 30 broyler örneğinin sadece IMS kültürde sorbitol negatif koloni oluşturduğu gözlemlendi. Geriye kalan sekiz izolat ise karaciğer örneklerinden yapılan direk ekim sonuçları ile uyumlu bulundu. Kültür bulguları genel olarak değerlendirildiğinde, 39 broylerden alınan tüm örneklerde sorbitol negatif koloniler tespit edildi (Şekil 5). İç organ örnekleri alınan kanatlı kümeslerindeki farklı hayvanlardan toplanan karkas örneklerinde ise % 26 (260/1000) oranında sorbitol negatif izolat elde edildi (Tablo 3).

**Tablo 3:** Broyler örneklerinin kesimhane ve kümelere göre dağılımı.

Kesimhane	Kümes no	Sorbitol negatif örnek/ Alınan toplam örnek (%)			
		Karaciğer	Sekum	IMS	Karkas
I	1	1/30	2/30	1/30	14/30
	2	3/30	11/30	7/30	11/30
	3	8/30	12/30	3/30	10/30
	4	7/30	13/30	7/30	8/30
	5	2/30	11/30	5/30	3/30
	6	5/30	15/30	8/30	1/30
	7	3/30	18/30	21/30	17/30
	8	8/30	26/30	19/30	21/30
	9	2/30	9/30	11/30	17/30
	10	5/30	8/30	12/30	5/30
	11	8/30	12/30	12/30	9/30
	12	6/30	16/30	11/30	11/30
	13	10/50	16/50	10/50	9/50
	14	14/50	10/50	12/50	18/50
	15	15/40	5/40	6/40	13/40
II	16	8/50	22/50	0/50	10/50
	17	3/50	3/50	-/50	11/50
	18	1/50	5/50	-/50	2/50
	19	2/50	14/50	6/50	5/50
	20	3/50	11/50	4/50	7/50
III	21	3/50	5/50	3/50	20/50
	22	3/50	20/50	11/50	10/50
	23	3/50	6/50	3/50	2/50
	24	4/50	8/50	3/50	10/50
	25	1/50	10/50	4/50	16/50
<b>Toplam</b>	<b>25</b>	<b>128/1000</b> <b>(% 12,8)</b>	<b>288/1000</b> <b>(% 28,8)</b>	<b>179/1000</b> <b>(% 17,9)</b>	<b>260/1000</b> <b>(% 26,0)</b>



**Şekil 5:** Broylerlerde sorbitol negatif izolatların dağılımı.

## 5. 2. İnsan Gayta Örneklerinin Bakteriyolojik Kültür Bulguları

Elazığ ve Malatya'daki beş farklı hastaneden alınan ishalleri insanlara ait gayta örneklerinden % 11,7 (43/367) oranında sorbitol negatif koloniler tespit edildi. Bu 43 örneğin 11 tanesi direkt, 3 tanesi İMS ve 29 tanesi hem direkt ve hem de İMS'de paralel olarak izole edildi. Sorbitol negatif izolatların oranı Elazığ'da % 11,1 (34/306) Malatya'da ise % 14,8 (9/61) olarak bulundu. Bulgular hastane bazında değerlendirildiğinde ise; Elazığ'daki U hastanesinde % 16 (24/150), S hastanesinde % 5,2 (5/96) ve Ç hastanesinde % 8,3 (5/60), Malatya'daki M hastanesinde %11,1 (1/9) ve N hastanesinde % 15,4 (8/52) oranlarında sorbitol negatiflik elde edildi. Gerek il ve gerekse hastane bazında elde edilen oranlar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmadı ( $p>0,05$ ).

### 5. 3. Broyler Örneklerinin PCR Bulguları

#### 5. 3. 1. *E. coli* O157 spesifik PCR bulguları

SMAC besiyerinde sorbitol negatif olarak tespit edilen toplam 385 izolattan elde edilen DNA örneklerinin O157 *rfbE* genine spesifik primerler ile PCR amplifikasyonuna tabi tutulmaları sonrasında % 1,3'ünde (5/385) *E. coli* O157'ye spesifik 497 bp uzunluğunda bantlar elde edilerek O157 pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 6). Bulgular hayvan bazında değerlendirildiğinde bu oran % 0,5 (5/1000) olarak hesaplandı. Bu oranlar örnek bazında değerlendirildiğinde ise sekumdan ve karaciğerden direkt yöntem ile izole edilen sorbitol negatif izolatların, O157 *rfbE* genine spesifik primerler ile yapılan PCR incelenmesinde sırasıyla % 1,04 (3/288) ve % 0,8 (1/128) oranında pozitiflik saptandı (Tablo 4). Sekum örneklerinden yapılan IMS ile sorbitol negatif saptanan izolatların O157 *rfbE* genine spesifik primerler ile yapılan PCR incelenmesinde ise % 1,11 (2/179) oranında pozitiflik saptandı. Sekum-IMS de pozitif bulunan örneklerin biri, direkt yöntemle de pozitif bulundu.

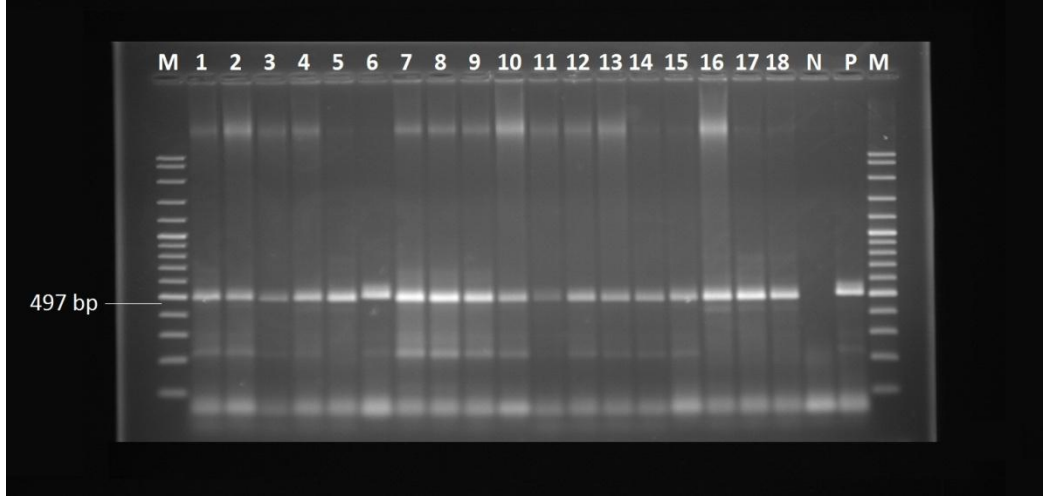
**Tablo 4:** Sorbitol negatif izolatlarda *E. coli* O157 identifikasyon oranı.

Örnek				P değeri
Karaciğer (%)	Sekum (%)	Sekum IMS* (%)	Karkas (%)	
1/128 (0,8)	3/288 (1,0)	2/179 (1,1)	-/260	P >0,05

\* Sekum-IMS de pozitif bulunan örneklerden biri, sekum-direkt yöntemle

de pozitif bulundu.

Sekum örneklerinde direkt ve IMS yöntemi ile tespit edilen *E. coli* O157 pozitiflik oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $P >0,05$ ).



**Şekil 6:** *rfbE*-PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jelde görünümü. M: DNA Ladder (100 bp), 1-6: Broyler izolatları, 7-18: İnsan izolatları, N: Negatif Kontrol, P: Pozitif Kontrol.

Kümes bazında bakıldığında; kümeslerin % 12'sinde (3/25) etken identifikasyonu yapıldı. *E. coli* O157 pozitif bulunan bu işletmelerden biri Malatya'da ikisi Elazığ'da yer alıp, bu kümeslerdeki pozitiflik oranları sırasıyla % 2 (1/50), % 6,7 (2/30) ve % 4 (2/50) olarak bulundu. Kümes bazındaki pozitiflik oranları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ( $P < 0,001$ ).

Karkas örneklerinden direkt yöntemle sorbitol negatif saptanan 260 izolatın O157 *rfbE* genine spesifik primerler ile yapılan PCR incelenmesinde ise pozitiflik saptanmadı.

### **5. 3. 2. Broyler *E. coli* O157 izolatlarının virülens genlerine spesifik PCR bulguları**

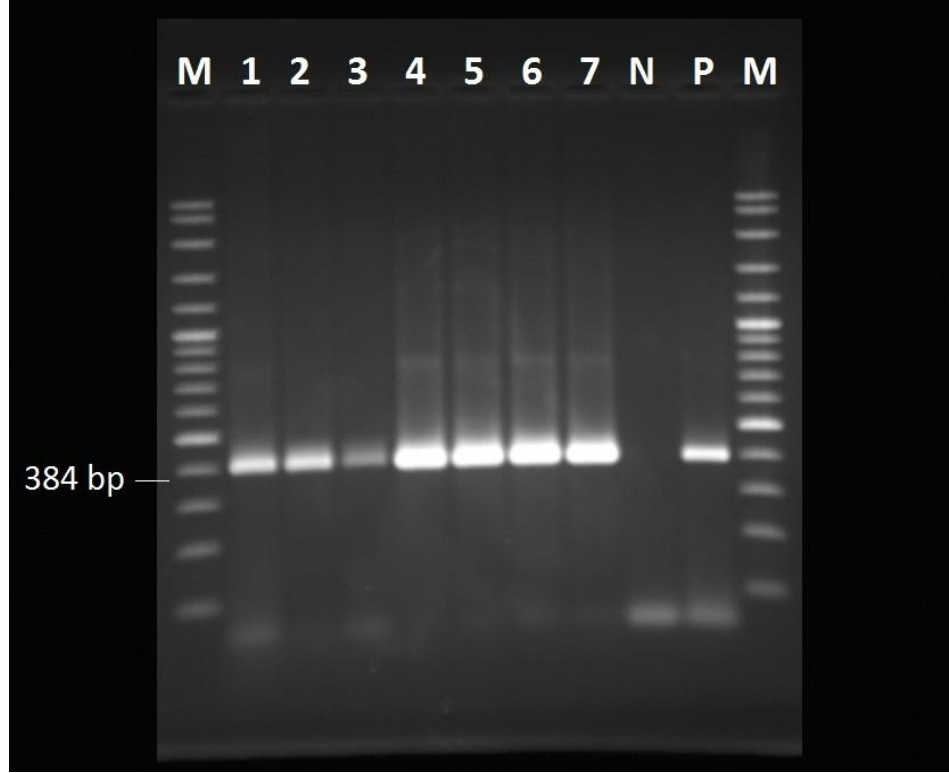
PCR ile *E. coli* O157 olarak saptanan beş broylere ait örnekler virülens genleri yönünden spesifik PCR ile incelendi. Bu örneklerin *fliCh7*, *stx1-stx2*, *ehxA*

ve *eae* virülens genlerine spesifik PCR ile analiz edilmeleri sonunda hiçbir örnekte H7, enterohemolizin, shigatoksin 1 ve 2 genleri tespit edilmedi. Buna karşın örneklerin tamamında *eae* geni yönünde pozitiflik saptandı. (Tablo 5, Şekil 7).

**Tablo 5:** Broylelerde *E. coli* O157 pozitif izolatların virülens genlerinin dağılımı.

Örnekler	PCR ile pozitif bulunan broyler sayısı (%)	O157	<i>rfbe</i>	<i>fliCh7</i>	<i>eae</i>	<i>stx<sub>1</sub></i>	<i>stx<sub>2</sub></i>	<i>ehxA</i>
Karaciğer	1/1000 (0,1)	+	-	+	-	-	-	
Sekum	4/1000 (0,4)	+	-	+	-	-	-	
		+	-	+	-	-	-	
		+	-	+	-	-	-	
Toplam	5/1000 (0,5)	5	-	5	-	-	-	

+ Gen mevcut, - gen yok



**Şekil 7:** *E. coli* O157 izolatlarının *eae*-PCR ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jelde görünümü. M: DNA Ladder (100 bp), 1: İnsan izolatı, 2-7: Broyler izolatları, N: Negatif Kontrol, P: Pozitif Kontrol.

#### **5. 4. İnsan Gayta Örneklerinin PCR Bulguları**

##### **5. 4. 1. *E. coli* O157 spesifik PCR bulguları**

İnsan örneklerinden hem direkt hem de IMS yöntemleri ile sorbitol negatif olarak tespit edilen izolatların O157 *rfbE* genine spesifik primerler ile yapılan PCR analizi neticesinde, % 23,3 (10/43) oranında *E. coli* O157 tespit edildi (Şekil 6). Bu pozitiflik toplam birey bazında hesaplandığında % 2,7 (10/367) olarak belirlendi.

Direkt ve IMS yöntemi ile sorbitol negatif tespit edilen örneklerin O157 *rfbE* genine spesifik primerler ile yapılan PCR analizi neticesinde sırasıyla %

22,5 (9/40) ve % 9,4 (3/32) oranında pozitiflik tespit edildi. IMS ile toplam pozitif bulunan üç *E. coli* O157 izolatın ikisi direkt yöntemle de belirlendi (Tablo 6).

İnsan gaytalarından IMS ve direkt yöntemle alınan pozitiflik oranları karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ( $P > 0,05$ ).

**Tablo 6:** İnsan gayta örneklerinin direkt ve IMS ile identifikasyon bulguları.

İller	Direkt (%)	IMS (%)	Toplam (%)
Elazığ	5 /306 (1,6)	3/306 (1)	8/306 (2,6) *
Malatya	4/61 (6,6)	-/61	4/61 (6,6)
<b>Toplam</b>	<b>9/367 (2,5)</b>	<b>3/367 (0,8)</b>	<b>10/367 (2,7)*</b>

\* İki örnek hem direkt hem de IMS yöntemi ile pozitif bulundu.

Bulgular hastane bazında değerlendirildiğinde, iki hastanede *E. coli* O157 tespit edildi. Bu iki hastaneden toplanan örneklerin % 5'inde (10/202) etken identifikasyonu gerçekleştirildi. Pozitif örneklerin % 4'ü (6/150) U hastanesinden ve % 7,7'si (4/52) ise N hastanesinden elde edildi (Tablo 7).

**Tablo 7:** Hastane bazında tespit edilen *E. coli* O157 identifikasyon bulguları.

Hastane		P değeri
U (%)	N (%)	
6/150 (4)	4/52 (7,7)	$P > 0,05$

Kanatlı ve insan örneklerinden tespit edilen toplam 15 *E. coli* O157 izolatı içerisinde rastgele seçilen 4 örneğin (2'si kanatlı, 2'si insan izolatı) dizi analiz sonuçlarının PubMed-BLAST'teki depolanmış dizi analizleri ile karşılaştırılmaları neticesinde; insan ve kanatlı izolatlarının % 98-99 (CP001368.1, AF163333.1),

%98-99 (AF00163336.1, CP001368.1) oranında *E. coli* O157 ile homolojiye sahip olduğu belirlendi.

#### 5. 4. 2. İnsan *E. coli* O157 izolatlarının virülens genlerine spesifik PCR bulguları

O157 *rfbE* genine spesifik PCR ile pozitif olarak tespit edilen 10 insan izolatının; *fliCh7*, *stx<sub>1</sub>/stx<sub>2</sub>*, *ehxA* ve *eae* genlerine spesifik PCR ile analizi neticesinde örneklerin hiç birinde H7, enterohemolizin, Shigatoksin 1 ve 2 genleri tespit edilmedi (Tablo 8). Buna karşılık bir izolatta intimin geni yönünden pozitif sonuç elde edildi (Şekil 6, Şekil 7).

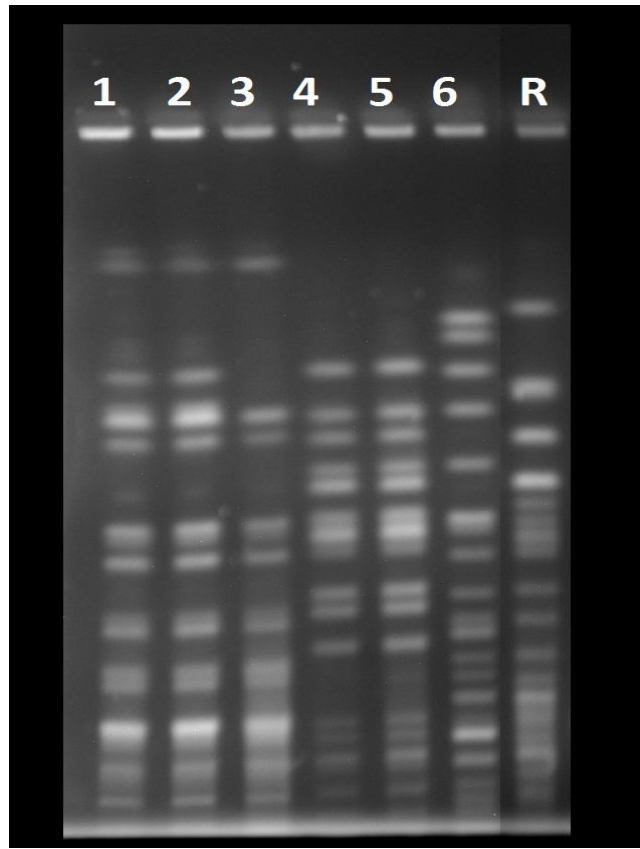
**Tablo 8:** İnsanlarda *E. coli* O157 pozitif izolatların virülens genlerinin dağılımı.

Örnekler	PCR ile pozitif bulunan örnek sayısı (%)	<i>O157 rfbE</i>	<i>fliCh7</i>	<i>eae</i>	<i>stx<sub>1</sub></i>	<i>stx<sub>2</sub></i>	<i>ehxA</i>
Gayta	10/367 (2,7)	+	-	+	-	-	-
		+	-	-	-	-	-
		+	-	-	-	-	-
		+	-	-	-	-	-
		+	-	-	-	-	-
		+	-	-	-	-	-
		+	-	-	-	-	-
		+	-	-	-	-	-
		+	-	-	-	-	-
Toplam	10(2.7)	10	-	1	-	-	-

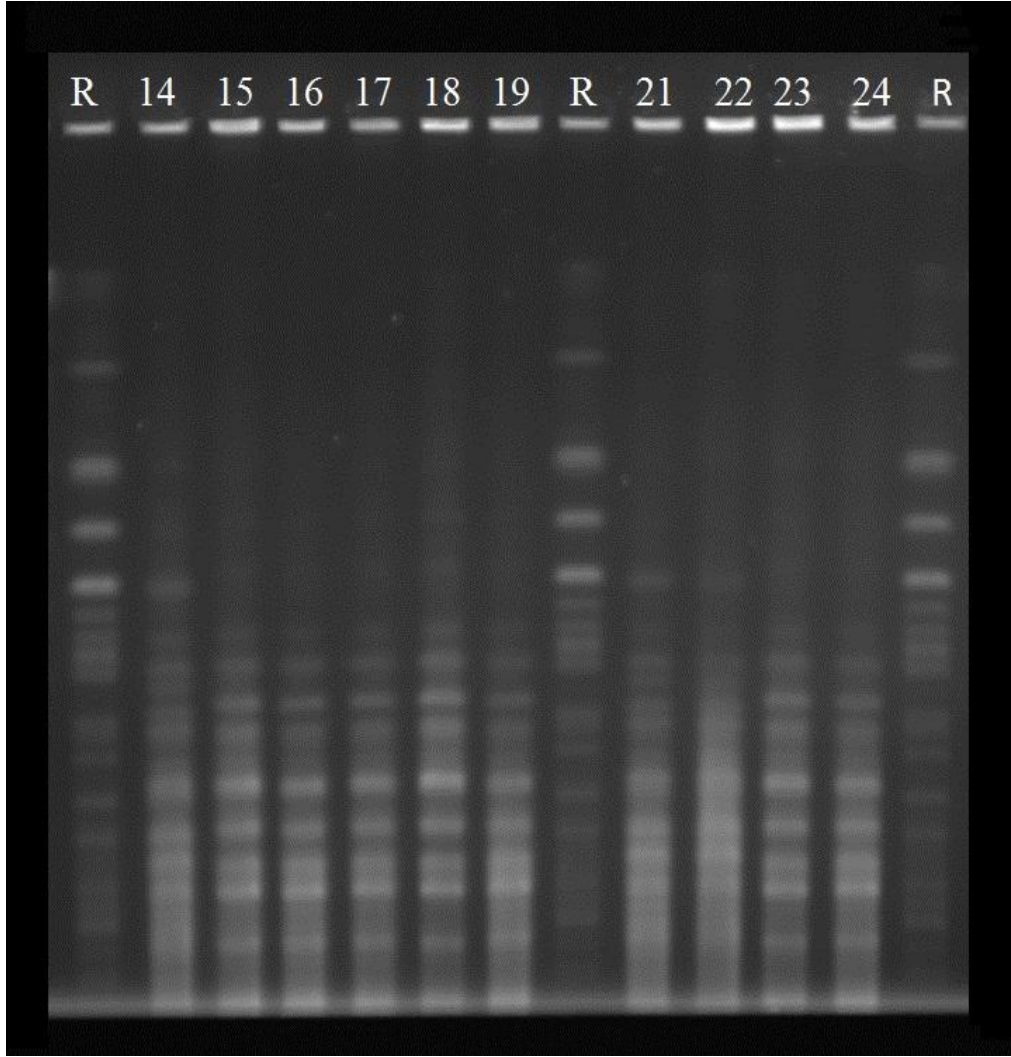
+ Gen mevcut, - gen yok

### 5. 5. PFGE Bulguları

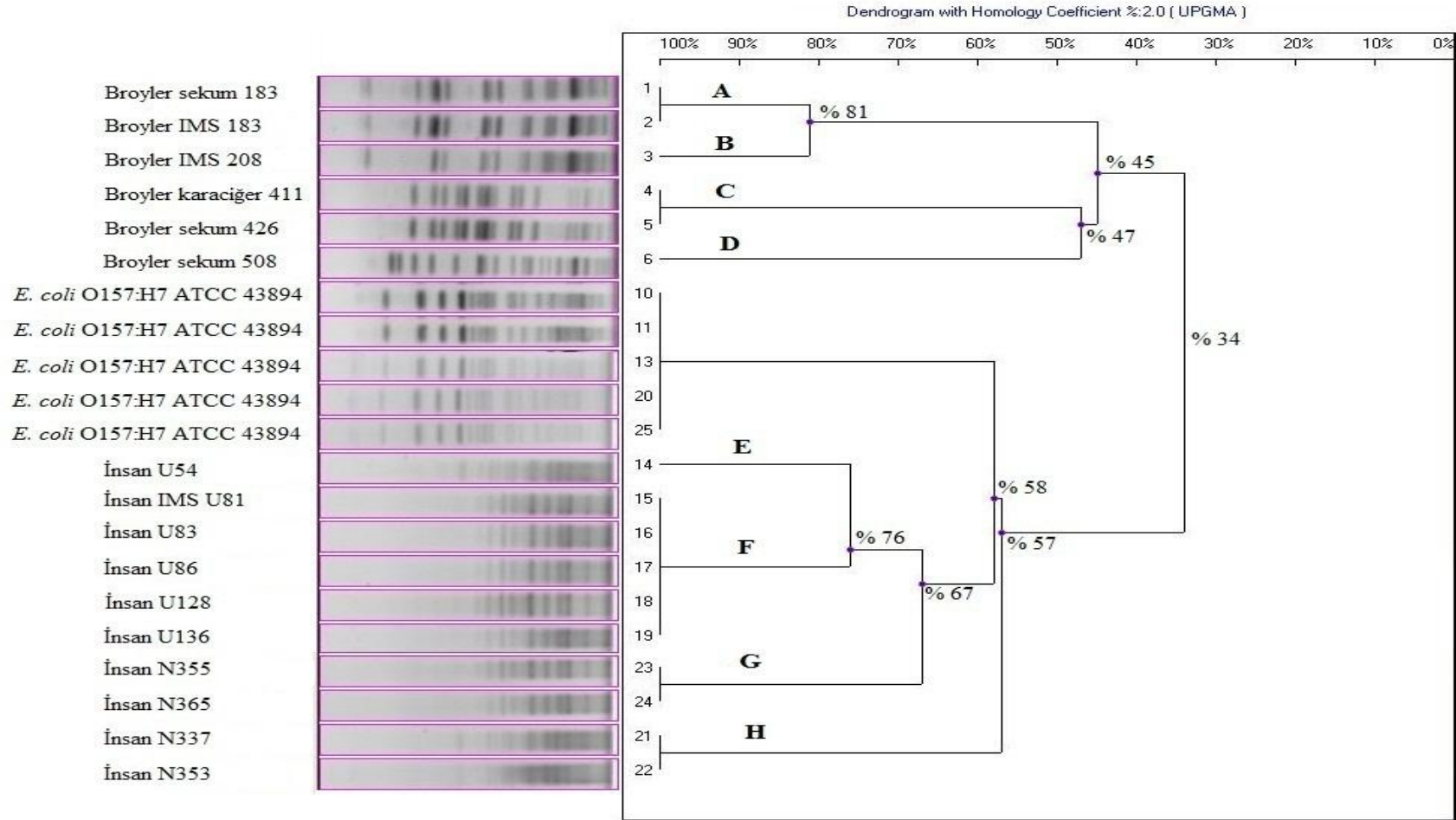
*E. coli* O157 olarak identifiye edilen broyler ve insan izolatları CDC tarafından önerilen yöntemle göre *Xba*I enzimi ile PFGE analizine tabi tutuldu (Şekil 8, 9). PFGE analizi sonucunda hem broyler hem de insan izolatlarında birbirinden farklı 4'er profil tespit edildi (Şekil 10).



**Şekil 8:** *Xba*I enzimi ile kesilen broyler izolatlarına ait PFGE ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jelde görünümü. 1: 183 sekum, 2: IMS 183, 3: İMS 208, 4: 411 Karaciğer 5: 426 sekum, 6: 508 sekum R: *E. coli* O157:H7 ATCC 43894.



**Şekil 9:** *Xba*I enzimi ile kesilen insan izolatlarına ait PFGE ürünlerinin ethidium bromide ile boyanmış agaroz jelde görünümü. 14: U54, 15: IMSU81, 16: U83, 17: U86, 18: U128, 19: U136, 21: N337, 22: N353, 23: N355, 24: N365, R: *E. coli* O157:H7 ATCC 43894.



Şekil 10: Broyles ve insan izolatlarının PFGE profilleri.

Broyler izolatlarındaki profiller (A, B, C, D) ile insan izolatlarındaki profiller (E, F, G, H) karşılaştırıldığında, bu iki türdeki *E. coli* O157 izolatlarının identik olmadığı görüldü.

Broyler izolatlarından, hem direkt hem de IMS ile tespit edilen 183 nolu örnek aynı profile sahip olup (profil A), 411 ve 426 nolu örnek özdeş (profil C), 183 (A) ve 208 nolu örnekler ise (B) yakın ilişkili bulundu. Broyler örneklerinde dört profil ve benzerliklerine göre de üç grup saptandı (A/B, C ve D) (Tablo 9).

**Tablo 9:** *E. coli* O157 izolatlarının PFGE profilleri.

Örnek Türü	İl	Kaynak	İzolat/no	PFGE profili	
Broyler	Elazığ	7 nolu kümes	Sekum 183	A	
		7 nolu kümes	IMS 183	A	
		7 nolu kümes	IMS 208	B	
		14 nolu kümes	Karaciğer 411	C	
		14 nolu kümes	Sekum 426	C	
	Malatya	16 nolu kümes	Sekum 508	D	
İnsan	Elazığ		U54	E	
			IMSU81	F	
		U	U83	F	
		Hastanesi	U86	F	
			U128	F	
	Malatya			U136	F
				N355	G
		N	N365	G	
		Hastanesi	N337	H	
			N353	H	

A/B, C ve D profilleri karşılaştırıldığında; A ve B grubundaki izolatların yakın ilişkili (% 81) olduğu ve aynı kümesden tespit edildiği belirlendi. Buna karşın A/B, C ve D grubundaki izolatlar karşılaştırıldığında herhangi bir ilişki saptanamadığı görüldü.

U isimli hastaneden, sırasıyla profil E (U54) ve F (U81, U83, U86, U128, U136) olmak üzere iki farklı profil tespit edildi.

N isimli hastaneden elde edilen dört izolatta, profil G (N355 ve N365) ve H (N337 ve N353) olmak üzere iki farklı profil görüldü.

E ve F profiline sahip izolatlar muhtemel ilişkili (% 76) olarak saptanırken, E/F, G ve H profillerine sahip izolatlar ilişkisiz olarak tespit edildi (Şekil 10).

## 6. TARTIŞMA

İnsanlarda *E. coli* O157 kaynaklı enfeksiyonların ortaya çıkmasında hayvansal gıdalar büyük önem taşımaktadır. Etken, özellikle çiğ et ve bu etlerden hazırlanmış çiğ veya az pişirilmiş et ürünlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Başta sığır olmak üzere keçi, koyun ve domuz etlerinde etkenin bulunması insan sağlığı açısından risk oluşturmaktadır (45, 65). Son yıllarda kanatlı et ve ürünlerinin de bu etkenin insanlara bulaşmasında rol oynadığına dair çalışmalar bulunmakla birlikte, bu hayvanlarda O157 serotipinin izolasyonuna yönelik yeterli veri mevcut değildir (30, 65). Bu konuyla ilgili kantitatif veri sağlamayı hedefleyen bu çalışmada, Elazığ ve Malatya illerindeki kanatlı kesimhanelerinden temin edilen broyler tavuk örnekleri ile aynı bölgedeki hastanelere ishal şikayeti ile başvuran insan numunelerinde *E. coli* O157'nin varlığının konvansiyonel yöntemlerle araştırılması, elde edilen izolatların moleküler karakterizasyonu ve PFGE ile tiplendirmesi gerçekleştirilerek izolatlar arasındaki genetik ilişkiler belirlendi.

Türkiye'de *E. coli* O157 ile ilgili çalışmalar çoğunlukla sığır, daha az olarak koyun ve mandalarda etkenin çeşitli yöntemlerle tespitine yönelik olup, sığırlarda hastalığın prevalansının % 1,3-13,6 oranında değiştiği bildirilmiştir (22, 57, 89, 161). Mandalarda yapılan bir çalışmada % 3,7 oranında etken izole edilirken (161), bu oranın koyunlarda % 25'in (89) üzerine kadar çıktığı rapor edilmiştir. Yüksek oranlarda *E. coli* O157 varlığını bildiren çalışmaların önemli bir bölümünde, spesifitesi düşük ve dolayısıyla yanlış pozitif sonuç verme ihtimali yüksek olan yöntemlerin kullanıldığına altını çizmek gerekir. Buna karşılık,

Avrupa’da ise sığırlarda *E. coli* O157 prevalansının % 0-15,7 arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (47, 63). Sığırlarda *E. coli* O157 izolasyon oranının Fransa’da % 13,3 (9), İngiltere’de ise % 12,9 (44) olduğu rapor edilmiştir. Koyunlarda yapılan çalışmalarda ise İspanya’da % 0,4 (37) İtalya’da % 7,1 (77) ve İngiltere’de % 7,4-15,7 (44, 46) oranlarında *E. coli* O157 serotipi tespit edilmiştir. Kore’de yapılan çalışmalarda besi sığırlarında % 1,7, süt sığırlarında % 6,7 ve domuzlarda % 0,3 oranında etken izole edilirken (105, 106), Japonya’da sığırlarda bu oran % 1,5 olarak ortaya konmuştur (80). ABD’de farklı türdeki hayvanlarda etkenin prevalansının incelendiği bir çalışmada; sığırlarda % 2,9, atlarda % 1,1, köpeklerde % 3,1, kuşlarda % 0,5 ve sineklerde % 3,3 oranında etken izole edildiği bildirilmiştir (94).

Yukarıda bahsedilen ve ağırlıklı olarak ruminant türlerinde gerçekleştirilen çalışmaların yanı sıra *E. coli* O157 serotipinin kanatlı hayvanlardaki potansiyelini araştıran çalışmalar da bulunmaktadır. Tavuklarda yapılan çalışmalarda, Slovakya’da % 9,3 (150), Hindistan’da % 0,4 (178), Hollanda’da ise broylerlerde % 0,3, yumurtacı tavuklarda % 0,1 ve hindilerde % 1,3 oranında *E. coli* O157 tespit edilmiştir (96, 160). Buna karşın İngiltere, Kore ve Hollanda’da yapılan farklı çalışmalarda tavuklarda *E. coli* O157’nin izole edilemediği bildirilmiştir (46, 96, 105). Çalışmalar arasındaki bu farklılık; tercih edilen metot, örnek sayısı ve kaynağı, coğrafi bölge, mevsim, işletme standartları ve bölgedeki *E. coli* O157 enfeksiyonlarının yaygınlık derecesiyle ilgili olabilir.

Türkiye’de farklı kanatlı türlerinde konvansiyonel yöntemlerle yapılan bir araştırmada etken izolasyon oranının % 4-6 arasında değiştiiği bildirilmiştir (89), Bu çalışmada ise rastgele örnekleme ile toplanan 1000 adet broyler tavuk

örneğinin % 0,5'inde *E. coli* O157 izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirildi. Bu oranın diğer çalışmalarda bildirilen oranlardan oldukça düşük olduğu görülmektedir. Ancak, broyler yetiştiriciliğinde kapalı kümes sistemi kullanıldığı için, bu türe yönelik yapılan çalışmalardan elde edilen verilerin kümes bazında yorumlanmasının daha mantıklı olacağı düşünülmektedir. Bu durumda, çalışma kapsamındaki kümeslerin % 12'sinden *E. coli* O157'nin izole edilmesi, bu etkenden kaynaklanan enfeksiyonun broylerlerdeki potansiyelini ortaya koyması açısından önem arz etmektedir.

Sadece etken izolasyonuna dayalı çalışmalarda, sorbitol negatif koloniler *E. coli* O157 dışındaki etkenler tarafından da oluşturulabileceği için, azımsanmayacak düzeylerde hatalı pozitif sonuçlarla karşılaşılabilir (92, 130). Nitekim kanatlı türlerinde yüksek oranlarda *E. coli* O157 varlığı bildiren çalışmaların önemli bir bölümünün sadece etken izolasyonu ve serolojik veya biyokimyasal testlerle identifikasyona yönelik olması (89, 96, 150), bu olasılığı desteklemektedir. Buna karşılık, bu tez çalışmasında konvansiyonel kültür yöntemine ek olarak daha güvenilir olan IMS ve moleküler yöntemler kullanıldı.

Bu çalışmada kullanılan besiyerinin,  $\beta$  glucuronidase enzim substratı olan BCIG/MUG içermemesi bir dezavantaj teşkil edebilir. *E. coli* O157, sorbitol ve  $\beta$  glucuronidase negatif olma özelliği ile diğer *E. coli*'lerden ayırt edilmektedir. Bununla birlikte, Ongor ve ark. (2007), yaptıkları bir çalışmada hem sorbitol hem de  $\beta$  glucorinadase negatif izolatların PCR ile incelenmesinde yüksek oranda yanlış pozitiflik tespit edildiğini bildirmişlerdir (142). Bu nedenlerden dolayı, O157 araştırmalarında kültüre paralel olarak IMS yönteminin kullanılması önerilmektedir (15, 16, 45). Nitekim bu çalışmada, 1000 broyler tavuktan direkt

ve IMS yöntemi ile tespit edilen 385 *E. coli* O157 şüpheli sorbitol negatif izolatanın PCR ile incelenmesi neticesinde sadece beş izolatta (% 1,3) pozitiflik saptanması dikkat çekmektedir.

*E. coli* O157'nin teşhisinde IMS yönteminin kullanılmasının izolasyon oranını arttırdığı bildirilmesine karşın (141, 184), bazı çalışmalarda refakatçi floradan (*Proteus*, *E. hermannii*, *Salmonella* O grup N) dolayı IMS'de de yanlış pozitif sonuçlar alındığı gözlemlenmiştir (80, 142). Bu çalışmada da, IMS sonrası kültürde şüpheli olarak kabul edilen 179 sorbitol negatif izolatanın PCR ile konfirmasyonunda sadece iki örnekte pozitif sonuç elde edilmesi yanlış pozitiflik ihtimalini doğurmaktadır. Bunun yanı sıra, direkt ekimde sorbitol negatif olarak bulunan 355 broyler örneğinin yalnızca dört tanesi *E. coli* O157 olarak teyit edildi. *E. coli* O157 pozitifliği her iki yöntemle de % 1,1 (2/179, 4/355) olarak hesaplandı ve dolayısıyla yöntemler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık elde edilmedi. Bu çalışmada IMS yönteminin *E. coli* O157 izolasyon oranını artırmada yetersiz kalması, gıda kökenli örneklerle kıyaslandığında gayta örneklerinin bakteri yükünün daha fazla olmasından kaynaklanmış olabilir.

Dünyanın farklı bölgelerinde çeşitli hayvan et ve et ürünleri ile karkas örnekleri *E. coli* O157 yönünden incelenmiş ve değişik sonuçlar rapor edilmiştir. Sığır et ve et ürünlerinde yapılan çok sayıdaki çalışmada, etken prevalansının en düşük oranda % 0,4 ile İtalya'da ve en yüksek oranda % 4,3 ile Çek Cumhuriyeti'nde elde edildiği rapor edilmiştir (53, 126). Buna karşılık işlenerek tüketime sunulan kanatlı etlerinde yapılan sınırlı sayıdaki araştırmalarda; Çek Cumhuriyeti'nde % 8 (126), Mısır'da % 4 (1) ve ABD'de % 1,5 (65) oranlarında

etken izolasyonu bildirilmiştir. Kore’de yürütülen bir çalışmada ise tavuk etlerinde *E. coli* O157 saptanamamıştır (105).

Türkiye’de çeşitli hayvan karkas örneklerinin incelendiği çalışmalarda sığırlarda % 3,6 ve tavuklarda % 1,1 oranında etken tespit edilmiştir (5, 88). Ülkemizin farklı yörelerinde sığır et ve et ürünlerinde yürütülen çalışmalarda *E. coli* O157 izolasyon oranlarının % 2-6 arasında değiştiği rapor edilmiştir (6, 69). Baran ve Gülmez (2003) tarafından yürütülen bir çalışmada ise sığır etlerinde % 6 oranında *E. coli* O157 izole edilirken, tavuk etlerinde etken izole edilemediği bildirilmiştir (25). Bu çalışmada da incelenen 1000 adet broyler karkas örneğinde *E. coli* O157 izole edilemedi. Karkas örneklerinde etken tespit edilememesi, daldırma tanklarına Salmonella ve diğer etkenlerin bulaşmasını engellemek için kullanılan klorun etkisinden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca bu çalışmada incelenen karkas örnekleri yıkamadan hemen sonra svaplar ile alınmasına karşın, diğer çalışmalarda genellikle satışa sunulan ürünlerden (etin işlenmesi, transportu, depolanması veya kontamine et ürünleri ile bir arada bulunması) örnek alınması farklı bulguların elde edilmesinde rol oynayabilir.

Sindirim sisteminde patojen etkeni barındıran hayvanlar, başta et ve et ürünleri olmak üzere birçok hayvansal ürünün farklı düzeylerde kontaminasyonuna neden olmakta ve bu şekilde tüketime sunulan ürünler ciddi bir risk oluşturmaktadır. Kontaminasyon, kesimden etin işlenip satışa sunulmasına kadar birçok aşamada gerçekleşebilir. Bu çalışmada elde edilen beş izolatin dördü sekumdan, bir tanesi ise karaciğerden tespit edildi. Sekum örneklerinden daha yüksek oranda pozitiflik saptanması diğer çalışma bulguları ile paralellik arz etmektedir (29, 159). Deneysel çalışmalarda etkenin sekuma kolonize olduğu ve

burada uzun süre kaldığı bildirilmiştir (159). Dolayısıyla, kanatlı et ürünlerinin işlenmesi esnasında sekumun yırtılması, hem karkas hem de daldırma tanklarını kontamine ederek insan sağlığı açısından risk oluşturabilir.

İnsanlara *E. coli* O157 bulaşmasının en önemli kaynağı tüketime sunulan kontamine et ve et ürünleri olup, sığırlar başlıca rezervuar olarak rapor edilmiştir (93, 180). İnsanlarda *E. coli* O157 enfeksiyonlarında etkenin sahip olduğu shigatoksinler, enterohemolizin ve intimin önemli rol oynamaktadır (34, 168). Shigatoksijenik *E. coli* O157 zoonoz olup insanlarda HK, HUS ve TTP gibi ciddi hastalıklara neden olmaktadır. Bir bakım evinde tavuk etlerinin tüketilmesine bağlı olarak ishal gözlenen hastalardan shigatoksijenik *E. coli* O157 izolasyonu rapor edilmiştir (29). Etkenin tek başına intimine sahip olması dahi A/E özelliği nedeniyle insanlarda ishal sebebi olabilir (3, 36). Kanatlı kökenli izolatlarda bu virülens genlerinin varlığını bildiren oldukça sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Pilipçinec ve ark. (1999), lateks aglutinasyon testi ile incelediği 216 kloakal svap örneğinin 20'sinde *E. coli* O157 tespit etmiş ve bunların 19'unda *stx* genlerinin bulunduğunu bildirmişlerdir (150). Buna karşın, 500 adet tavuk gaytasının incelendiği başka bir çalışmada bu genlere rastlanmamıştır (178). Ayrıca hindilerde yapılan bir çalışmada elde edilen altı izolatın sadece bir tanesinde *stx*, *eae* ve *ehx* genleri tespit edilmiştir (96). Bu çalışmada ise, broyler tavuklardan elde edilen beş *E. coli* O157 izolatının hiçbirinde *stx<sub>1</sub>-stx<sub>2</sub>*, *ehxA* ve *fliCh7* virülens genleri tespit edilemedi. Buna karşın bu izolatların tümü *eae* geni yönünde pozitif olarak belirlendi. Bu nedenle broyler et ve et ürünlerinin insanlar için potansiyel risk taşıdığı söylenebilir.

Dünyada sporadik vakalarda % 2-7, salgınlarda ve HUS vakalarında ise % 20 oranında *E. coli* O157 izolasyonu bildirilmiştir. Etken, 10 yaşın altındaki çocuklarda HUS'a neden olurken, yetişkinlerde HK ve TTP vakaları gözlenmektedir. HUS görülen çocukların % 3-5'inde ölüm ve % 12-30'unda ise böbrek yetmezliği, hipertansiyon ve merkezi sinir sisteminde hasar ortaya çıkmaktadır (87, 138, 147). Ancak bu klinik tabloların ortaya çıkması için *stx*'in dolaşım sistemine girmesi ve hedef organdaki reseptörüne bağlanması gerekir. Buna karşılık, birçok *E. coli* O157 olgusunda semptomların kısa sürede sona erdiği ve spontan iyileşmelerin olduğu bildirilmektedir (153, 168). Türkiye'de *E. coli* O157'nin insanlardaki prevalansı hakkında yeterli veri bulunmamaktadır (91). İlk defa Zarakolu ve ark. (1999) tarafından çocuklarda yapılan bir çalışmada % 0,4 oranında etken izolasyonu bildirilmiştir (188). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, ülkemizde insanlarda *E. coli* O157 prevalansının % 0-4 arasında değiştiği rapor edilmiştir (68, 71, 91, 95). Bu çalışmada ise ishallerden alınan insanlardan alınan gayta örneklerinde % 2,7 oranında etken izole edildiği görüldü.

İnsan gayta örnekleri de hem direkt ekim hem de IMS yöntemleri ile incelendi ve broyler örneklerine benzer şekilde direkt ekim yönteminde dokuz örnek pozitif bulunurken, IMS yönteminde sadece üç örnekte pozitiflik belirlendi. Bu durumun da insan gaytasında bulunan refakatçi floradan veya metot tercihinden kaynaklanmış olabileceği ve dolayısıyla çalışmada kullanılan IMS metodunun insan örneklerinde de direkt kültür yöntemine ekstra bir katkı sağlamadığı görüldü. Sonuç olarak PCR bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde, bu çalışmada gerek broyler ve gerekse insan örneklerinin incelenmesinde

kullanılan IMS yönteminin sensitivitesinin düşük olduğu ve dolayısıyla hatalı negatif sonuç ihtimalinin yüksek olduğu kanaatine varıldı.

İnsanlarda HUS ve HK vakalarında yapılan çalışmalarda etkenin çoğunlukla *fliCh7*, *stx1-stx2*, *ehxA* ve *eae* virülens genlerine sahip olduğu bildirilmiştir (34, 168). Bu çalışmada, ishal şikayeti ile hastaneye başvuran insanlardan elde edilen 10 *E. coli* O157 izolatının spesifik PCR ile analizi sonucunda hiçbir örnekte H7, enterohemolizin, shigatoksin 1 ve 2 genleri tespit edilmedi. Buna karşın örneklerin yalnızca birinde *eae* geni yönünde pozitiflik saptandı. Birçok araştırmacı *E. coli* O157'ye bağlı klinik tabloların oluşmasıyla intimin varlığı arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir (3, 146). Bağırsaklarda bağlanma ve silinme yapan intimin, diğer virülens faktörleri olmadan da hastalarda ishal nedeni olabilir. Bununla birlikte herhangi bir virülens geni taşımayan diğer dokuz izolatın sağlık açısından sorun teşkil etmeyeceği söylenebilir.

PFGE, *E. coli* O157 suşlarının genetik ilişkilerinin ortaya konmasında ve salgınların epidemiyolojisinin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntemdir. Bu çalışmada broyler ve insan izolatları CDC tarafından önerilen yöntemle göre *XbaI* enzimi ile PFGE analizine tabi tutuldu. PFGE analizi sonucunda hem broyler hem de insan izolatlarında birbirinden farklı 4'er profil tespit edildi. Broyler profilleri (A, B, C ve D) karşılaştırıldığında; A ve B grubundaki izolatların yakın ilişkili (% 81) olduğu ve aynı kümeden elde edildiği belirlendi. Buna karşın A/B, C ve D grubundaki izolatlar karşılaştırıldığında herhangi bir ilişki saptanamadığı görüldü. Bu durumun kanatlılarda, farklı bulaşma kaynağından veya aynı bulaşma

kaynağında farklı genotipik profile sahip *E. coli* O157 izolatlarından ileri geldiği söylenebilir.

İnsan izolatlarında U (profil E ve F) ve N (profil G ve H) isimli hastanelerin her birinden ikişer olmak üzere toplam dört farklı PFGE profili elde edildi. E ve F profiline sahip izolatlar muhtemel ilişkili (% 76) olarak saptanırken, E/F, G ve H profillerine sahip izolatlar ilişkisiz olarak tespit edildi. Bu çalışmada elde edilen insan *E. coli* O157 izolatları ile broyler orijinli izolatlar arasında herhangi bir genetik ilişki saptanamaması, bulaşma kaynağının kanatlı kökenli olmadığı fikrini desteklemektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, broyler tavukların *E. coli* O157 serotipini taşıdığı tespit edildi. Bu durum, birçok işletmenin yakınlarında sığır yetiştiriciliği yapılmasından veya broylerlerin yem, su vs. ile etkeni çevreden almasından kaynaklanmış olabilir. Bu çalışmada elde edilen insan *E. coli* O157 izolatları ile broyler orijinli izolatlar arasında herhangi bir genetik ilişki saptanamaması, bulaşma kaynağının kanatlı kökenli olmadığı görüşünü desteklemektedir. Bununla birlikte, ishal şikayeti ile hastaneye başvuran insanların gayta numunelerinde etkene rastlanması, kontaminasyon riskini minimize etmek için gerekli hijyenik tedbirlerin alınmasını ve standartlara uyulmasını zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmada, insanlar için *E. coli* O157 kaynağının kanatlı kökenli olarak görülmemesine karşın birden fazla bulaşma kaynağı veya aynı bulaşma kaynağında farklı genotipik profile sahip *E. coli* O157 izolatları ile enfeksiyona yakalanmış olabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla muhtemel enfeksiyonların önüne geçebilmek için broyler etleri gibi tüketime sunulan et ürünlerinin iyi pişmiş olarak tüketilmesine dikkat edilmelidir.

*E. coli* O157'ye bağlı enfeksiyonlar ve salgınlar açısından etkin kontrol stratejileri geliştirilebilmek için ruminant türlerinin yanı sıra başta broyler olmak üzere kanatlı hayvanların da bu etkenin varlığı ve virülens özellikleri yönünden incelenmesinin daha faydalı olacağı düşünülmektedir. Böylece, günümüzde beyaz et tüketiminin kırmızı ete göre gittikçe yaygınlaştığı da göz önüne alındığında, hem kanatlı sektörü açısından hem de halk sağlığı açısından daha güvenilir ve doğru veriler elde edilerek koruma ve kontrol çalışmaları planlanabilecektir. Bu nedenle, farklı kanatlı türlerini ve daha geniş coğrafyaları kapsayan uzun vadeli prospektif çalışmalar ile etkenin epidemiyolojisinin ayrıntılı bir Şekilde irdelenmesine gereksinim duyulmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Abdul-Raouf UM, Ammar MS, Beuchat LR. (1996). Isolation of *E. coli* O157:H7 from Some Egyptian Foods. *Int J Food Microbiol.* 29: 423-426.
2. Ackers ML, Mahon BE, Leahy E, Goode B, Damrow T, Hayes PS, Bibb WF, Rice DH, Barrett TJ, Hutwagner L, Griffin PM, Slutsker L. (1998). An Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Leaf Lettuce Consumption. *J Infect Dis.* 177:1588-1593.
3. Adu-Bobie J, Frankel G, Bain C, Goncalves AG, Trabulsi LR, Douce G, Knutton S, Dougan G. (1998). Detection of Intimins alpha, beta, gamma, and delta, Four Intimin Derivatives Expressed by Attaching and Effacing Microbial Pathogens. *J Clin Microbiol.* 36 (3): 662-668.
4. Ahmad A, Nagaraja TG, Zurek L. (2007). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to Cattle by House Flies. *Prev Vet Med.* 80 (1): 74-81.
5. Akkaya L, Atabay HI, Kenar B, Alisarli M. (2006). Prevalence of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 on Chicken Carcasses Sold in Turkey. *Bull Vet Inst Pulawy.* 50: 513-516.
6. Aksu H, Özgen-Arun Ö, Aydın A, Uğur M. (1999). *Escherichia coli* O157:H7'nin Hayvansal Kökenli Çeşitli Gıda Maddelerinde Varlığı. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg.* 30 (2): 77-81.
7. Alişarlı M, Akman HN. (2004). Perakende Satılan Kıymaların *Escherichia coli* O157 Yönünden İncelenmesi. *YYÜ Vet Fak Derg.* 15: 65-69.
8. Aminul-Islam M, Heuvelink AE, Talukder KA, De Boer E. (2006). Immunoenrichment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from Animal Faeces and Raw Meats by Using Dynabeads Anti-*E. coli* O157 and the VIDAS System. *Int J Food Microbiol.* 109(1-2): 151-156.
9. Andral B, Aspan A, Pérelle S, Fach P. (2004). PCR Detection of Virulence Genes and Molecular Epidemiology of STEC O157 Isolates from French Abattoirs. *Vet Rec.* 155 (12): 365-368.
10. Anonim. (2010). Christine A Wanke Diarrheagenic *Escherichia coli* Erişim: ([http://proxy.westernu.edu:2068/utd/content/topic.do?topicKey=gi\\_infec/9831&selectedTitle=1~150&source=search\\_result](http://proxy.westernu.edu:2068/utd/content/topic.do?topicKey=gi_infec/9831&selectedTitle=1~150&source=search_result)). Erişim tarihi: 22.10.2010.
11. Anonim. (2010). Erişim ([http://www.tarim.gov.tr/uretim/Hayvansal\\_Uretim,Tavukculuk.html](http://www.tarim.gov.tr/uretim/Hayvansal_Uretim,Tavukculuk.html)). Erişim tarihi: 10.01.2011.
12. Anonim. (2010). Erişim: (<http://www.besd-bir.org/turkiyekanatliistatistikleri.htm>). Erişim tarihi: 10.01.2011.
13. Anonim. (2010). *E. coli* O157. Erişim: (<http://www.about-ecoli.com>). Erişim tarihi: 07.09.2010.

14. Anonim. (2010). CDC Multistate outbreak. Erişim: (<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol7no6/breuer.htm>). Erişim tarihi: 12.10.2010.
15. Anonim. (2010). *Escherichia coli* O157. Erişim: (<http://www.cdc.gov>). Erişim tarihi: 20.09.2010.
16. Anonim. (2010). *Escherichia coli* O157. Erişim: (<http://www.fda.gov>). Erişim tarihi: 16.10.2010.
17. Anonim. (2010). *Escherichia coli* O157. Erişim: (<http://www.usda.gov>). Erişim tarihi: 10.10.2010.
18. Anonim. (2010). Taxonomy. Erişim: (<http://www.chem.missouri.edu/TannerGroup/people/white/NCBI%20taxonomy%20browser/ecoli.htm>). Erişim tarihi: 10.10.2010.
19. Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, Leloğlu N, Kahraman M, Ilgaz A, Diker KS. (1997). Özel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi: 26. Dördüncü Baskı, Ankara.
20. Arda M. (2000). Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın serisi: 45. İkinci baskı, Ankara.
21. Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris JG Jr. (1996). Emerging Foodborne Pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as A Model of Entry of A New Pathogen into the Food Supply of the Developed World. *Epidemiol Rev.* 18: 29-51.
22. Aslantaş O, Erdoğan S, Cantekin Z, Gülaçtı I, Evrendilek GA. (2006). Isolation and Characterization of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from Turkish Cattle. *Int J Food Microbiol.* 106: 338-342.
23. Avery SM, Liebana E, Hutchison ML, Buncic S. (2004). Pulsed Field Gel Electrophoresis of Related *Escherichia coli* O157 Isolates Associated with Beef Cattle and Comparison with Unrelated Isolates From Animals, Meats and Humans. *Int J Food Microbiol.* 92 (2): 161-169.
24. Avery SM, Liebana E, Reid CA, Woodward MJ, Buncic S. (2002). Combined Use of Two Genetic Fingerprinting Methods, Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Ribotyping, for Characterization of *Escherichia coli* O157 Isolates From Food Animals, Retail Meats, and Cases of Human Disease. *J Clin Microbiol.* 40 (8): 2806-2812.
25. Baran F, Gülmez M. (2003). The Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in the Ground Beef and Chicken Drumsticks. *Internet Journal of Food Safety.* 2: 13-15. Erişim: (<http://www.foodhaccp.com/internetjournal/ijfsv2-5.pdf>). Erişim Tarihi: 10.08.2010.
26. Barnes HJ, Vaillancourt JP, Gross WB. (2003). Colibacillosis. "Disease of Poultry 11. Edition" Saif YM (editör). Iowa State press. Iowa. Sayfa: 631-656.
27. Barrett TJ, Gerner-Smidt P, Swaminathan B. (2006). Interpretation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns in Foodborne Disease Investigations and Surveillance. *Foodborne Pathog Dis.* 3 (1): 20-31.
28. Beery JT, Doyle MP, Schoeni JL. (1985). Colonization of Chicken Cecae by *Escherichia coli* Associated with Hemorrhagic Colitis. *Appl Environ Microbiol.* 49 (2): 310-315.

29. Best A, La Ragione RM, Cooley WA, O'Connor CD, Velge P, Woodward MJ. (2003). Interaction with Avian Cells and Colonisation of Specific Pathogen Free Chicks by Shiga-toxin Negative *Escherichia coli* O157:H7 (NCTC 12900). *Vet Microbiol.* 29; 93(3): 207-222.
30. Best A, La Ragione RM, Sayers AR, Woodward MJ. (2005). Role for Flagella but not Intimin in the Persistent Infection of the Gastrointestinal Tissues of Specific-Pathogen-Free Chicks by Shiga Toxin-Negative *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* 73 (3): 1836-1846.
31. Bettelheim KA, Beutin L. (2003). Rapid Laboratory Identification and Characterization of Verocytotoxigenic (Shiga Toxin Producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *J Appl Microbiol.* 95 (2): 205-217.
32. Bettelheim KA. (1996). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: A New Problem, An Old Group of Organisms. *Aust Vet J.* 73: 20-26.
33. Beutin L, Knollmann-Schanbacher G, Rietschel W, Seeger H. (1996). Animal Reservoirs of *Escherichia coli* O157:[H7]. *Vet Rec.* 139 (3): 70-71.
34. Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Mora A, Dahbi G, Coira MA, Blanco J. (2004). Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Human Patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J Clin Microbiol.* 42 (1): 311-319.
35. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J. (1997). Production of Toxins (Enterotoxins, Verotoxins and Necrotoxins) and Colicins by *Escherichia coli* Strains Isolated from Septicemic and Healthy Chickens: Relationship with in vivo Pathogenicity. *J Clin Microbiol.* 35 (11): 2953-2957.
36. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI, Blanco J. (2004). Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Cattle in Spain and Identification of A New Intimin Variant Gene (eae-xi). *J Clin Microbiol.* 42 (2): 645-651.
37. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, Hermoso J, Alonso MP, Dahbi G, González EA, Bernárdez MI, Blanco J. (2003). Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Healthy Sheep in Spain. *J Clin Microbiol.* 41(4): 1351-1356.
38. Blanco M, Padola NL, Krüger A, Sanz ME, Blanco JE, González EA, Dahbi G, Mora A, Bernárdez MI, Etcheverría AI, Arroyo GH, Lucchesi PM, Parma AE, Blanco J. (2004). Virulence Genes and Intimin Types of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle and Beef Products in Argentina. *Int Microbiol.* 7 (4): 269-276.
39. Botelho BA, Bando SY, Trabulsi LR, Moreira-Filho CA. (2003). Identification of EPEC and non-EPEC Serotypes in the EPEC O Serogroups by PCR-RFLP Analysis of the fliC Gene. *J Microbiol Methods.* 54 (1): 87-93.

40. Brabban AD, Hite E, Callaway TR. (2005). Evolution of Foodborne Pathogens Via Temperate Bacteriophage-mediated Gene Transfer. *Foodborne Pathog Dis.* 2 (4): 287-303.
41. Bugarel M, Beutin L, Martin A, Gill A, Fach P. (2010). Micro-array for the Identification of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Seropathotypes Associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in Humans. *Int J Food Microbiol.* 142 (3): 318-329.
42. Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Emerging Issues on Virulence and Modes of Transmission. *Vet Res.* 36 (3): 289-311.
43. CDC. (2010). One-Day (24-28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* Serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Erişim: ([http://www.cdc.gov/PULSENET/protocols/ecoli\\_salmonella\\_shigella\\_protocols.pdf](http://www.cdc.gov/PULSENET/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf)). Erişim tarihi: 28.06.2010.
44. Chapman PA, Cerdán Malo AT, Ellin M, Ashton R, Harkin MA. (2001). *Escherichia coli* O157 in Cattle and Sheep at Slaughter, on Beef and Lamb Carcasses and in Raw Beef and Lamb Products in South Yorkshire, UK. *Int J Food Microbiol.* 64 (1-2): 139-150.
45. Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. (2001). Comparison of Culture, PCR and Immunoassays for Detecting *Escherichia coli* O157 Following Enrichment Culture and Immunomagnetic Separation Performed on Naturally Contaminated Raw Meat Products. *Int J Food Microbiol.* 68 (1-2): 11-20.
46. Chapman PA, Siddons CA, Cerdan Malo AT, Harkin MA. (1997). A 1-year Study of *Escherichia coli* O157 in Cattle, Sheep, Pigs and Poultry. *Epidemiol Infect.* 119: 245-250.
47. Chapman PA, Siddons CA, Cerdan Malo AT, Harkin MA. (2000). A One Year Study of *Escherichia coli* O157 in Raw Beef and Lamb Products. *Epidemiol Infect.* 124 (2): 207-213.
48. Charimba G, Hugo CJ, Hugo A. (2010). The Growth, Survival and Thermal Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in a Traditional South African Sausage. *Meat Sci.* 85 (1): 89-95.
49. Charimba G. (2004). The Incidence, Growth and Survival of Diarrhoeagenic *Escherichia coli* in South African Meat Products. Master of Science Degree Thesis, University of the Free State 1-131.
50. Cho S, Fossler CP, Diez-Gonzalez F, Wells SJ, Hedberg CW, Kaneene JB, Ruegg PL, Warnick LD, Bender JB. (2007). Antimicrobial Susceptibility of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Organic Dairy Farms, Conventional Dairy Farms, and County Fairs in Minnesota. *Foodborne Pathog Dis.* 4 (2): 178-186.

51. Cieslak PR, Noble SJ, Maxson DJ, Empey LC, Ravenholt O, Legarza G, Tuttle J, Doyle MP, Barrett TJ, Wells JG, McNamara AM, Griffin PM. (1997). Hamburger-associated *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Las Vegas: A Hidden Epidemic. *Am J Public Health*. 87 (2):176-180.
52. Clawson ML, Keen JE, Smith TP, Durso LM, McDanel TG, Mandrell RE, Davis MA, Bono JL. (2009). Phylogenetic Classification of *Escherichia coli* O157:H7 Strains of Human and Bovine Origin Using A Novel Set of Nucleotide Polymorphisms. *Genome Biol*. 10 (5): R56.
53. Conedera G, Dalvit P, Martini M, Galiero G, Gramaglia M, Goffredo E, Loffredo G, Morabito S, Ottaviani D, Paterlini F, Pezzotti G, Pisanu M, Semprini P, Caprioli A. (2004). Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 in Minced Beef and Dairy Products in Italy. *Int J Food Microbiol*. 96 (1): 67-73.
54. Cowden JM, Christie P. (1997). Scottish Outbreak of *Escherichia coli* O157. *Health Bull Edinb*. 55: 9-10.
55. Cray WC Jr, Moon HW. (1995). Experimental Infection of Calves and Adult Cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*. 61: 1586-1590.
56. Cristancho L, Johnson RP, McEwen SA, Gyles CL. (2008). *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* in White Veal Calves. *Vet Microbiol*. 126 (1-3): 200-209.
57. Çabalar M, Boynukara B, Gülhan T, Ekin İH. (2001). Prevalence of Rotavirus, *Escherichia coli* K99 and O157:H7 in Healthy Dairy Cattle Herds in Van, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*. 25: 191-196.
58. Deisingh AK, Thompson M. (2001). Sequences of *E. coli* O157:H7 Detected by A PCR-acoustic Wave Sensor Combination. *Analyst*. 126 (12): 2153-2158.
59. Deisingh AK, Thompson M. (2004). Strategies for the Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Foods. *J Appl Microbiol*. 96 (3): 419-429.
60. Dell’Omo G, Morabito S, Quondam R, Agrimi U, Ciuchini F, Macrì A, Caprioli A. (1998). Feral Pigeons as A Source of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Vet Rec*. 142: 309-310.
61. Denny J, Bhat M, Eckmann K. (2008). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with Raw Milk Consumption in the Pacific Northwest. *Foodborne Pathog Dis*. 5 (3): 321-328.
62. Desmarchelier PM, Bilge SS, Fegan N, Mills L, Vary JC Jr, Tarr PI. (1998). A PCR Specific for *Escherichia coli* O157 Based on the rfb Locus Encoding O157 Lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol*. 36 (6): 1801-1804.
63. Dontorou A, Papadopoulou C, Filioussis G, Apostolou I, Economou V, Kansouzidou A, Levidiotou S. (2004). Isolation of A Rare *Escherichia coli* O157:H7 Strain from Farm Animals in Greece. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 27 (3): 201-207.

64. Dowd SE, Ishizaki H. (2006). Microarray Based Comparison of Two *Escherichia coli* O157:H7 Lineages. BMC Microbiol. 15; 6:30.
65. Doyle MP, Schoeni JL. (1987). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Retail Fresh Meats and Poultry. Appl Environ Microbiol. 53: 2394-2396.
66. Dunn JR. (2003). The Epidemiology of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in Louisiana Dairy Cattle, Beef Cattle, and White-Tailed Deer. A Dissertation Submitted to the Graduate Faculty of Louisiana State University and Agriculture and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. Louisiana State University 1-60.
67. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, Aktas E, Gursoy NC, Caliskan A. (2009). The Optimization of A Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for the Typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* Jpn J Infect Dis. 62 (5): 372-377.
68. Ekşi F, Karşılıgil T, Bayram A. (2007). Çocukluk Yaş Grubu İshallerinde *Escherichia coli* O157:H7'nin Araştırılması. Van Tıp Dergisi. 14 (1):15-18.
69. Elmali M, Ulukanli Z, Yaman H, Tuzcu M, Genctav K, Cavli P. (2005). A Seven-Month Survey for the Detection of *Escherichia coli* O157:H7 from Ground Beef Samples in the Markets of Turkey. Pak J Nutr. 4: 158-161.
70. El-safey EM, Abdul-Raouf UM. (2003). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Some Egyptian Foods. ASSIUT J Agric Sci. 34 (6): 373-379.
71. Erdoğan H, Erdoğan A, Levent B, Kayali R, Arslan H. (2008). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: Case Report. Turk J Pediatr. 50 (5): 488-491.
72. Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, Lopez-Hernandez D, Santos JJ, Rosado JL, DuPont HL, Long KZ. (2009). Association of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with Infection and Diarrhea Among Mexican Children and Association of Atypical Enteropathogenic *E. coli* with Acute Diarrhea. J Clin Microbiol. 47 (1): 93-98.
73. Evans Jr DJ, Evans DG. (2010). *Escherichia coli* in Diarrheal Disease Erişim: ([http://www.bf.lu.lv/grozs/Mikrobiologijas/Mediciniska\\_mikrobiol/E.coli%20in%20diarrheal%20disease.doc](http://www.bf.lu.lv/grozs/Mikrobiologijas/Mediciniska_mikrobiol/E.coli%20in%20diarrheal%20disease.doc)). Erişim tarihi: 15.07 2010.
74. Fagan PK, Hornitzky MA, Bettelheim KA, Djordjevic SP. (1999). Detection of Shiga-like Toxin (stx1 and stx2), Intimin (eaeA), and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Hemolysin (EHEC hlyA) Genes in Animal Feces by Multiplex PCR. Appl Environ Microbiol. 65 (2): 868-872.
75. Feng P. (1995). *Escherichia coli* serotype O157:H7: Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants. Emerg Infect Dis. 1 (2): 47-52.
76. Fitzmaurice J, Glennon M, Duffy G, Sheridan JJ, Carroll C, Maher M. (2004). Application of Real-time PCR and RT-PCR Assays for the Detection and Quantitation of VT 1 and VT 2 Toxin Genes in *E. coli* O157:H7. Mol Cell Probes. 18 (2): 123-132.

77. Franco A, Lovari S, Cordaro G, Di Matteo P, Sorbara L, Iurescia M, Donati V, Buccella C, Battisti A. (2009). Prevalence and Concentration of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in Adult Sheep at Slaughter from Italy. *Zoonoses Public Health*. 56 (5): 215-220.
78. Fratamico PM, Bhagwat AA, Injaian L, Fedorka-Cray PJ. (2008). Characterization of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Swine Feces. *Foodborne Pathog Dis*. 5 (6): 827-838.
79. Fu Z, Rogelj S, Kieft TL. (2005). Rapid Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Immunomagnetic Separation and Real-time PCR. *Int J Food Microbiol*. 99 (1): 47-57.
80. Fukushima H, Seki R. (2004). High Numbers of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Found in Bovine Faeces Collected at Slaughter in Japan. *FEMS Microbiol Lett*. 238 (1): 189-197.
81. Gannon VP, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. (1997). Use of the Flagellar H7 Gene as A Target in Multiplex PCR Assays and Improved Specificity in Identification of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains. *J Clin Microbiol*. 35 (3): 656-662.
82. Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. *Infect Immun*. 73 (5): 2573-2585.
83. Gautom RK. (1997). Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Typing of *Escherichia coli* O157:H7 and Other Gram-Negative Organisms in 1 Day. *J Clin Microbiol*. 35 (11): 2977-2980.
84. Ge B, Zhao S, Hall R, Meng J. (2002). A PCR-ELISA for Detecting Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbes Infect*. 4 (3): 285-290.
85. Gerner-Smidt P, Scheutz F. (2006). Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*: the PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathog Dis*. 3 (1): 74-80.
86. Gow SP, Waldner CL. (2009). Antimicrobial Resistance and Virulence Factors stx1, stx2, and eae in Generic *Escherichia coli* Isolates from Calves in Western Canadian Cow-Calf Herds. *Microb Drug Resist*. 15 (1): 61-67.
87. Griffin PM, Tauxe RV. (1991). The Epidemiology of Infections Caused by *Escherichia coli* O157:H7, Other Enterohemorrhagic *E. coli*, and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Epidemiol Rev*. 13: 60-98.
88. Gun H, Yilmaz A, Turker S, Tanlasi A, Yilmaz H. (2003). Contamination of Bovine Carcasses and Abattoir Environment by *Escherichia coli* O157:H7 in Istanbul. *Int J Food Microbiol*. 84 (3): 339-344.
89. Gülhan T. (2003). Sağlıklı Görünen Hayvanların Dışkılarından İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarının Biyokimyasal, Enterotoksijenik ve Verotoksijenik Özelliklerinin Belirlenmesi. *YYÜ Vet Fak Derg*. 14 (1): 102-109.

90. Gülmez, M, Baz E, Güven A. (2004). The Use of Novobiocine and Cefixime-Tellurite in Broth and Cefixime-Tellurite, Salicine, Rhamnose and MUG in Agar Medium for the Detection of *Escherichia coli* O157:H7 from Ground Beef. Turkish J Vet Anim Sci. 28: 753-759.
91. Güney C, Aydoğan H, Saracli MA, Basustaoglu A, Doganci L. (2001). No Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 Strains from Faecal Specimens of Turkish Children with Acute Gastroenteritis. J Health Popul Nutr. 19 (4): 336-337.
92. Halkman AK, Noveir MR, Doğan HB. (2001). *Escherichia coli* O157:H7 Serotipi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Ankara 1-36.
93. Hancock DD, Besser TE, Kinsel ML, Tarr PI, Rice DH, Paros MG. (1994). The Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in Dairy and Beef Cattle in Washington State. Epidemiol Infect. 113: 199-207.
94. Hancock DD, Besser TE, Rice DH, Ebel ED, Herriott DE, Carpenter LV. (1998). Multiple Sources of *Escherichia coli* O157 in Feedlots and Dairy Farms in the Northwestern USA. Prev Vet Med. 35 (1): 11-19.
95. Hascelik G, Akan OA, Diker S, Baykal M. (1991). Campylobacter and Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Associated Gastroenteritis in Turkish Children. J Diarrhoeal Dis Res. 9 (4): 315-317.
96. Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis JTM, Van den Biggelaar FLAM, Van Leeuwen WJ, De Boer E. (1999). Isolation and Characterization of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 from Slaughter Pigs and Poultry. Int J Food Microbiol. 52: 67-75.
97. Holland RE, Walker RD, Sriranganathan N, Wilson RA, Ruhl DC. (1999). Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Healthy Dogs. Vet Microbiol. 70 (3-4): 261-268.
98. Hopkins KL, Hilton AC. (2001). Optimization of Random Amplification of Polymorphic DNA Analysis for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157. Lett Appl Microbiol. 32 (3): 126-130.
99. Houser BA, Donaldson SC, Padte R, Sawant AA, DebRoy C, Jayarao BM. (2008). Assessment of Phenotypic and Genotypic Diversity of *Escherichia coli* Shed by Healthy Lactating Dairy Cattle. Foodborne Pathog Dis. 5 (1): 41-51.
100. Hu Y, Zhang Q, Meitzler JC. (1999). Rapid and Sensitive Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Bovine Faeces by A Multiplex PCR. J Appl Microbiol 87: 867-876.
101. Hussein HS, Bollinger LM. (2008). Influence of Selective Media on Successful Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Food, Fecal and Environmental Samples. Foodborne Pathog Dis. 5 (3): 227-244.
102. İzgür M. (2006). Enterobakteri İnfeksiyonları. "Veteriner Mikrobiyoloji" Aydın N, Paracıkloğlu J (editörler). İlke-Emek yayınları Ankara. Sayfa 109-127.

103. Jacobsen L, Durso L, Conway T, Nickerson KW. (2009). *Escherichia coli* O157:H7 and Other *E. coli* Strains Share Physiological Properties Associated with Intestinal Colonization. *Appl Environ Microbiol.* 75 (13): 4633-4635.
104. Jin HY, Tao KH, Li YX, Li FQ, Li SQ. (2005). Microarray Analysis of *Escherichia coli* O157:H7. *World J Gastroenterol.* 11 (37): 5811-5815.
105. Jo MY, Kim JH, Lim JH, Kang MY, Koh HB, Park YH, Yoon DY, Chae JS, Eo SK, Lee JH. (2004). Prevalence and Characteristics of *Escherichia coli* O157 from Major Food Animals in Korea. *Int J Food Microbiol.* 95 (1): 41-49.
106. Kang SJ, Ryu SJ, Chae JS, Eo SK, Woo GJ, Lee JH. (2004). Occurrence and Characteristics of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in Calves Associated with Diarrhoea. *Vet Microbiol.* 98 (3-4): 323-328.
107. Karch H, Bielaszewska M, Bitzan M, Schmidt H. (1999). Epidemiology and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 34: 229-243.
108. Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in Human Medicine. *Int J Med Microbiol.* 295 (6-7): 405-418.
109. Kariuki S, Gilks C, Kimari J, Obanda A, Muyodi J, Waiyaki P, Hart CA. (1999). Genotype Analysis of *Escherichia coli* Strains Isolated from Children and Chickens Living in Close Contact. *Appl Environ Microbiol.* 65: 472-476.
110. Kataoka Y, Irie Y, Sawada T, Nakazawa M. (2010). A 3-year Epidemiological Surveillance of *Escherichia coli* O157:H7 in Dogs and Cats in Japan. *J Vet Med Sci.* 72 (6): 791-794.
111. Keene WE, Sazie E, Kok J, Rice DH, Hancock DD, Balan VK, Zhao T, Doyle MP. (1997). An Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Traced to Jerky Made from Deer Meat. *JAMA.* 277: 1229-1231.
112. Keskimäki M. (2001). Shiga Toxin-Producing and Other Diarrhoeagenic *Escherichia coli* in Finland: Pheno- and Genotypic Epidemiology. Academic dissertation. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology. 1-68.
113. Kim J, Nietfeldt J, Ju J, Wise J, Fegan N, Desmarchelier P, Benson AK. (2001). Ancestral Divergence, Genome Diversification, and Phylogeographic Variation in Subpopulations of Sorbitol-Negative, Beta-Glucuronidase- Negative Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *J Bacteriol.* 183: 6885-6897.
114. Kim JY, Kim SH, Kwon NH, Bae WK, Lim JY, Koo HC, Kim JM, Noh KM, Jung WK, Park KT, Park YH. (2005). Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 Using Different Detection Methods and Molecular Determination by Multiplex PCR and RAPD. *J Vet Sci.* 6 (1): 7-19.
115. Koitabashi T, Vuddhakul V, Radu S, Morigaki T, Asai N, Nakaguchi Y, Nishibuchi M. (2006). Genetic Characterization of *Escherichia coli* O157: H7/- Strains Carrying the stx2 Gene but Not Producing Shiga Toxin 2. *Microbiol Immunol.* 50 (2): 135-148.

116. Krause U, Thomson-Carter FM, Pennington TH. (1996). Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Comparison with that by Bacteriophage Typing. *J Clin Microbiol.* 34: 959-961.
117. Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ. (1996). *Escherichia coli* O157:H7 in Microbial Flora of Sheep. *J Clin Microbiol.* 34: 431-433.
118. Law D, Kelly J. (1995). Use of Heme and Hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and Other Shiga- Like-Toxin-Producing *E. coli* Serogroups. *Infect Immun.* 63: 700-702.
119. Law D. (2000). The History and Evolution of *Escherichia coli* O157 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli*. *World J Microb Biot.* 16: 701-709.
120. Law D. (2000). Virulence Factors of *Escherichia coli* O157 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli*. *J Appl Microbiol.* 88 (5): 729-745.
121. Lee GY, Jang HI, Hwang IG, Rhee MS. (2009). Prevalence and Classification of Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Fresh Beef, Poultry, and Pork in Korea. *Int J Food Microbiol.* 134 (3): 196-200.
122. LeJeune JT, Besser TE, Hancock DD. (2001). Cattle Water Troughs as Reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol.* 67 (7): 3053-3057.
123. Levine MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML. (1983). New Knowledge on Pathogenesis of Bacterial Enteric Infections as Applied to Vaccine Development. *Microbiol Rev.* 47 (4): 510-550.
124. Ley EC, Morishita TY, Brisker T, Harr BS. (2001). Prevalence of *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli* on Ostrich Carcasses and the Susceptibility of Ostrich-origin *Escherichia coli* Isolates to Various Antibiotics. *Avian Dis.* 45: 696-700.
125. Liddell KG. (1997). *Escherichia coli* O157: Outbreak in Central Scotland. *Lancet* 349: 502-503.
126. Lukášová J, Abraham B, Cupáková S. (2004). Occurrence of *Escherichia coli* O157 in Raw Material and Food in Czech Republic. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 51 (2): 77-81.
127. Mainil JG, Daube G. (2005). Verotoxigenic *Escherichia coli* from Animals, Humans and Foods: Who's Who? *J Appl Microbiol.* 98 (6): 1332-1344.
128. Manafi M, Kremsmaier B. (2001). Comparative Evaluation of Different Chromogenic/Fluorogenic Media for Detecting *Escherichia coli* O157:H7 in Food. *Int J Food Microbiol.* 71 (2-3): 257-262.
129. Manafi M. (2000). New Developments in Chromogenic and Fluorogenic Culture Media. *Int J Food Microbiol.* 60 (2-3): 205-218.
130. Manna SK, Manna C, Batabyal K, Das B, Golder D, Chattopadhyay S, Biswas BK. (2010). Serogroup Distribution and Virulence Characteristics of Sorbitol-Negative *Escherichia coli* from Food and Cattle Stool. *J Appl Microbiol.* 108 (2): 658-665.
131. Mead PS, Griffin PM. (1998). *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet.* 352 (9135): 1207-1212.

132. Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss R 3rd, Lehoux B, Fairbrother JM. (2003). Role of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Bacterial Interaction with Chicken Heterophils and Macrophages. *Infect Immun.* 71 (1): 494-503.
133. Meyer-Broseta S, Bastian SN, Arne PD, Cerf O, Sanaa M. (2001). Review of Epidemiological Surveys on the Prevalence of Contamination of Healthy Cattle with *Escherichia coli* Serogroup O157:H7. *Int J Hyg Environ Health.* 203: 347-361.
134. Michino H, Araki K, Minami S, Takaya S, Sakai N, Miyazaki M, Ono A, Yanagawa H. (1999). Massive Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection in School Children in Sakai City, Japan, Associated with Consumption of White Radish Sprouts. *Am J Epidemiol.* 150 (8): 787-796.
135. Mutaku I, Erku W, Ashenafi M. (2005). Growth and Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Fresh Tropical Fruit Juices at Ambient and Cold Temperatures. *Int J Food Sci Nutr.* 56 (2): 133-139.
136. Müller EE, Ehlers MM. (2005). Biolog Identification of Non-Sorbitol Fermenting Bacteria Isolated on *E. coli* O157 Selective CT-SMAC Agar. *Water SA.* 31 (2): 247-251.
137. Nam HM, Murinda SE, Nguyen LT, Oliver SP. (2004). Evaluation of Universal Pre-enrichment Broth for Isolation of *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* from Dairy Farm Environmental Samples. *Foodborne Pathog Dis.* 1 (1): 37-44.
138. Nataro JP, Kaper JB. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11: 142-201.
139. Normanno G, Parisi A, Dambrosio A, Quaglia NC, Montagna D, Chiocco D, Celano GV. (2004). Typing of *Escherichia coli* O157 Strains Isolated from Fresh Sausage. *Food Microbiol.* (21): 79-82.
140. Noveir MR, Halkman AK. (2000). A Study on Selective Broths and Agar Media for the Isolation of *E. coli* O157:H7 Serotype. *Turk J Vet Anim Sci.* 24: 459-464.
141. Okrend AJG, Rose BE, Lattuada CP. (1992). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 Using O157 Specific Antibody-Coated Magnetic Beads. *J Food Prot.* 55: 214-217.
142. Ongor H, Kalin R, Cetinkaya B. (2007). Investigations of *Escherichia coli* O157 and Some Virulence Genes in Samples of Meat and Faeces from Clinically Healthy Cattle in Turkey. *Vet Rec.* 161: 392-394.
143. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. (1977). Serology, Chemistry and Genetics of O and K Antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev.* 41 (3): 667-710.
144. Park CH, Vandel NM, Hixon DL. (1996). Rapid Immunoassay for Detection of *Escherichia coli* O157 Directly from Stool Specimens. *J Clin Microbiol.* 34 (4): 988-990.
145. Park S, Worobo RW, Durst RA. (2001). *Escherichia coli* O157:H7 as An Emerging Foodborne Pathogen: A literature review. *Crit Rev Biotechnol.* 21(1): 27-48.

146. Paton AW, Paton JC. (1998). Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111* and *rfbO157*. J Clin Microbiol. 36: 598-602.
147. Paton JC, Paton AW. (1998). Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. Clin Microbiol Rev. 11: 450-479.
148. Pedersen K, Clark L, Andelt WF, Salman MD. (2006). Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in Rock Pigeons Captured in Fort Collins, Colorado. J Wildl Dis. 42 (1): 46-55.
149. Piérard D, Muyldermans G, Moriau L, Stevens D, Lauwers S. (1998). Identification of New Verocytotoxin Type 2 Variant B-Subunit Genes in Human and Animal *Escherichia coli* Isolates. J Clin Microbiol. 36: 3317-3322.
150. Pilipčinec E, Tkáčiková L, Naas HT, Cabadaj R, Mikula I. (1999). Isolation of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 from Poultry. Folia Microbiol (Praha). 44 (4): 455-456.
151. Pomajzl RJ, Varman M, Holst A, Chen A. (2009). Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) Incidence and Etiologies at A Regional Children's Hospital in 2001-2006. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 28 (12): 1431-1435.
152. Radu S, Ling OW, Rusul G, Karim MI, Nishibuchi M. (2001). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Multiplex PCR and Their Characterization by Plasmid Profiling, Antimicrobial Resistance, RAPD and PFGE Analyses. J Microbiol Methods. 46 (2) :131-139.
153. Razzaq S. (2006). Hemolytic Uremic Syndrome: An Emerging Health Risk. Am Fam Physician. 74 (6): 991-996.
154. Rey J, Sánchez S, Blanco JE, Hermoso de Mendoza J, Hermoso de Mendoza M, García A, Gil C, Tejero N, Rubio R, Alonso JM. (2006). Prevalence, Serotypes and Virulence Genes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Ovine and Caprine Milk and Other Dairy Products in Spain. Int J Food Microbiol. 107 (2): 212-217.
155. Rice DH, Hancock DD, Besser TE. (2003). Faecal Culture of Wild Animals for *Escherichia coli* O157:H7. Vet Rec. 152 (3): 82-83.
156. Samadpour M. (1995). Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by Restriction Fragment Length Polymorphism Using Shiga-like Toxin Genes. J Clin Microbiol. 33 (8): 2150-2154.
157. Sargeant JM, Sanderson MW, Smith RA, Griffin DD. (2003). *Escherichia coli* O157 in Feedlot Cattle Feces and Water in Four Major Feeder-Cattle States in the USA. Prev Vet Med. 61 (2): 127-135.
158. Schmidt H, Beutin L, Karch H. (1995). Molecular Analysis of the Plasmid Encoded Hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL 933. Infect Immun. 63: 1055-1061.

- 159.Schoeni JL, Doyle MP. (1994). Variable Colonization of Chickens Perorally Inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and Subsequent Contamination of Eggs. *Appl Environ Microbiol.* 60: 2958-2962.
- 160.Schouten JM, Van De Giessen AW, Frankena K, De Jong MC, Graat EA. (2005). *Escherichia coli* O157 Prevalence in Dutch Poultry, Pig Finishing and Veal Herds and Risk Factors in Dutch Veal Herds. *Prev Vet Med.* 70 (1-2): 1-15.
- 161.Seker E, Yardimci H. (2008). First Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Faecal and Milk Specimens from Anatolian Water Buffaloes (*Bubalus bubalus*) in Turkey. *J S Afr Vet Assoc.* 79 (4): 167-170.
- 162.Shaikh N, Tarr PI. (2003). *Escherichia coli* O157:H7 Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages: Integrations, Excisions, Truncations, and Evolutionary Implications. *J Bacteriol.* 185 (12): 3596-3605.
- 163.Silagyi K, Kim SH, Lo YM, Wei CI. (2009). Production of Biofilm and Quorum Sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its Transfer from Contact Surfaces to Meat, Poultry, Ready-to-eat Deli, and Produce Products. *Food Microbiol.* 26 (5): 514-519.
- 164.Singh J, Batish VK, Grover S. (2009). A Scorpion Probe-based Real-time PCR Assay for Detection of *E. coli* O157:H7 in Dairy Products. *Foodborne Pathog Dis.* 6 (3): 395-400.
- 165.Solomakos N, Govaris A, Angelidis AS, Pournaras S, Burriel AR, Kritas SK, Papageorgiou DK. (2009). Occurrence, Virulence Genes and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* O157 Isolated from Raw Bovine, Caprine and Ovine Milk in Greece. *Food Microbiol.* 26 (8): 865-871.
- 166.Srinivasan V, Nguyen LT, Headrick SI, Murinda SE, Oliver SP. (2007). Antimicrobial Resistance Patterns of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H7- from Different Origins. *Microb Drug Resist.* 13 (1): 44-51.
- 167.Stelling JM, Travers K, Jones RN, Turner PJ, O'Brien TF, Levy SB. (2005). Integrating *Escherichia coli* Antimicrobial Susceptibility Data from Multiple Surveillance Programs Emerging Infectious Diseases Erişim: (<http://www.cdc.gov/eid>. 11 (6). Erişim tarihi: 06.08.2010.
- 168.Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. (2005). Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* and Haemolytic Uraemic Syndrome. *Lancet.* 365 (9464): 1073-1086.
- 169.Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. (1995). Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol.* 33 (9): 2233-2239.
- 170.Thorpe CM, Hurley BP, Acheson DW. (2003). Shiga Toxin Interactions with the Intestinal Epithelium. *Methods Mol Med.* 73: 263-273.
- 171.Thorsteinsdottir TR, Haraldsson G, Fridriksdottir V, Kristinsson KG, Gunnarsson E. (2010). Prevalence and Genetic Relatedness of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli*

- Isolated from Animals, Foods and Humans in Iceland. *Zoonoses Public Health*. 57 (3): 189-196.
172. Torres AG, Zhou X, Kaper JB. (2005). Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains to Epithelial Cells. *Infect Immun*. 73 (1): 18-29.
173. Ukuku DO, Zhang H, Huang L. (2009). Growth Parameters of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, and Aerobic Mesophilic Bacteria of Apple Cider Amended with Nisin-EDTA. *Foodborne Pathog Dis*. 6 (4): 487-494.
174. Voravuthikunchai S, Lortheeranuwat A, Jeeju W, Sririrak T, Phongpaichit S, Supawita T. (2004). Effective Medicinal Plants Against Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Ethnopharmacol*. 94: 49-54.
175. Wales AD, Clifton-Hadley FA, Cookson AL, Dibb-Fuller MP, Laragione RM, Pearson GR, Woodward MJ. (2002). Production of Attaching-Effacing Lesions in Ligated Large Intestine Loops of 6-Month-Old Sheep by *Escherichia coli* O157:H7. *J Med Microbiol*. 51: 755-763.
176. Wallace JS, Cheasty T, Jones K. (1997). Isolation of Vero Cytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 from Wild Birds. *J Appl Microbiol*. 82: 399-404.
177. Wang L, Rothmund D, Curd H, Reeves PR. (2000). Sequence Diversity of the *Escherichia coli* H7 fliC Genes: Implication for a DNA-based Typing Scheme for *E. coli* O157:H7. *J Clin Microbiol*. 38 (5): 1786-1790.
178. Wani SA, Samanta I, Bhat MA, Nishikawa Y. (2004). Investigation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Avian Species in India. *Lett Appl Microbiol*. 39: 389-394.
179. Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Itoh K, Tamura K. (1996). Outbreaks of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Infection by Two Different Genotype Strains in Japan. *Lancet*. 348: 831-832.
180. Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN, Downes FP, Martin ML, Griffin PM, Ostroff SM. (1991). Isolation of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 and Other Shiga-Like-Toxin-Producing *E. coli* from Dairy Cattle. *J Clin Microbiol*. 29: 985-989.
181. Whittam TS, Wolfe ML, Wachsmuth IK, Orskov F, Orskov I, Wilson RA. (1993). Clonal Relationships Among *Escherichia coli* Strains That Cause Hemorrhagic Colitis and Infantile Diarrhea. *Infect Immun*. 61: 1619-1629.
182. Willshaw GA, Smith HR, Cheasty T, O'Brien SJ. (2001). Use of Strain Typing to Provide Evidence for Specific Interventions in the Transmission of VTEC O157 Infections. *Int J Food Microbiol*. 66: 39-46.
183. Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI. (2000). The Risk of the Hemolytic-Uremic Syndrome After Antibiotic Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 Infections. *N Engl J Med*. 342: 1930-1936.

184. Wright DJ, Chapman PA, Siddons CA. (1994). Immunomagnetic Separation As A Sensitive Method for Isolating *Escherichia coli* O157 from Food Samples. *Epidemiol. Infect.* 113: 31-39.
185. Yamamoto T, Taneike I. (2000). The Sequences of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Yersinia pestis* That are Homologous to the Enteraggative *E. coli* Heat-stable Enterotoxin Gene: Cross-Species Transfer in Evolution. *FEBS Letters.* 472 (1): 22-26.
186. Yılmaz A, Gun H, Yılmaz H. (2002). Frequency of *Escherichia coli* O157:H7 in Turkish Cattle. *J Food Prot.* 65: 1637-1640.
187. Yılmaz A, Gun H, Ugur M, Turan N, Yılmaz H. (2006). Detection and Frequency of *VT1*, *VT2* and *eaeA* Genes in *Escherichia coli* O157 and O157:H7 Strains Isolated from Cattle, Cattle Carcasses and Abattoir Environment in Istanbul. *Int J Food Microbiol* 1: 213-217.
188. Zarakolu P, Akbaş E, Levent B, Gözalan A. (1999). İshalli Çocuk Hastalardan İzole Edilen Bakteriyel Patojenlerin Dağılımı. *Flora* 4: 190-194.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Recep KALIN  
**Doğum Yeri:** Kahramanmaraş/Elbistan  
**Doğum Tarihi:** 03.07.1979  
**Yazışma Adresi:** Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı, 23119, Elazığ / Türkiye.  
**Medeni Hali:** Evli  
**Yabancı Dil:** İngilizce (ÜDS-65)  
**Telefon:** **GSM:** 0 505 681 18 74 **İş:** 0 424 237 00 00 / 4011  
**Faks:**  
**e-posta:** recep.kalin@gmail.com

### EĞİTİM DURUMU

Mezuniyet Yılı	Derece	Kurum	Öğrenim Alanı
1983-1988	İlkokul	Kümbet İlkokulu- Elbistan/Kahramanmaraş	-
1989-1996	Ortaokul-Lise	Elbistan Anadolu Lisesi- Elbistan/Kahramanmaraş	-
1998-2003	Y. Lisans	Fırat Üniversitesi	Veteriner
2005-2011	Doktora	Fırat Üniversitesi	Mikrobiyoloji

### DOKTORA

**Doktora Tez Konusu** Broylerlerde *Escherichia coli* O157'nin Prevalansı ve Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Yöntemi ile Tiplendirilmesi (2011)

**Doktora Danışmanı** Doç. Dr. Hasan ÖNGÖR 'Atık Yapmış Koyunlarda Brusellozis'in Teşhisinde ELISA ile Diğer Serolojik Testlerin Karşılaştırılması' Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD

### Üyesi Olduğu Meslek Kuruluşları :

Veteriner Mikrobiyoloji Derneği  
Elazığ Bölgesi Veteriner Hekimler Odası

### Verdiği Seminer ve Konferanslar

Enterohemorajik *Escherichia coli* O157:H7 (2007) Doktora Semineri

## ULUSLARARASI HAKEMLİ DERGİDEKİ YAYINLARI

- 1- Ongor H, **Kalin R** and Acik MN. (2011). Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* from Goats with Nasal Discharge by Culture and Polymerase Chain Reaction (PCR). Pak Vet J, 31(x): xxx.
- 2- Macun HC., Ocal N., Karahan M., Yagci BB., Kalender H., **Kalin R**. (2010). Endemic Contagious Agalactia in Sheep and Goats: Clinical Evaluation, Treatment and Vaccination. J. Anim. Vet. Adv. 9 (14): 1918-1924.
- 3- Karahan M., **Kalin R**, Atil E., Çetinkaya B. (2010). Detection of Mycoplasma bovis in Cattle with Mastitis and Respiratory Problems in Eastern Turkey. Vet Rec.166: 827-829.
- 4- Ongor H., Karahan M., **Kalin R**., Bulut H. and Cetinkaya B. (2010). Detection of avian metapneumovirus subtypes in turkeys using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in Turkey. Vet Rec. 166: 363-366.
- 5- Çetinkaya B., **Kalin R**., Karahan M., Atil E., Manso-Silvan L., Thiaucort F. (2009). Detection of contagious caprine pleuropneumonia in East Turkey Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 28 (3): 1037-1044.
- 6- Ongor H., **Kalin R**., Karahan M., Çetinkaya B., Akan M. (2009). Detection of Mycoplasma Species in Turkeys by Culture and Polymerase Chain Reaction. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 28 (3): 1103-1109.
- 7- Ongor H., **Kalin R**., Karahan M., Cetinkaya B., McAuliffe L., Nicholas RA. (2008). Isolation of Mycoplasma bovis from Broiler Chickens in Turkey. Avian Pathology, 18: 1-2.
- 8- Ongor H., **Kalin R**., Cetinkaya B. (2007). Investigations of Escherichia coli O157 and some virulence genes in samples of meat and faeces from clinically healthy cattle in Turkey. The Veterinary Record 161: 392-394.
- 9- Ozen A, **Kalin R**, Yerlikaya H, Seker I, Cetinkaya B. (2004). Evaluating the curriculum of the veterinary school of firat university, Turkey, in terms of professional and technical skills. J Vet Med Educ., 31: 281-288.
- 10- Cetinkaya B, Karahan M, Atil E, **Kalin R**, De Baere T, Vaneechoutte M. (2002) Identification of Corynebacterium pseudotuberculosis Isolates from Sheep and Goats by PCR. Veterinary Microbiology 88(1): 75-83.

## BİLDİRİ, POSTER ve SUNULAR

- 1- Çetinkaya B., Karahan M., **KALIN R**., Atil E. “Türkiye’nin Doğusundaki Ruminant Mikoplazmalarının Biyoçeşitliliği: Aşı ve Kontrol Stratejileri için

Uygulamalar” Çağrılı Tebliğ, IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Lefkoşa, KIBRIS, 4-12, Ekim, 2010.

2- Öngör H., **KALIN R.**, Karahan M., Çetinkaya B., McAuliffe L., Nicholas RJA. “Türkiye’de Broylerlerden *Mycoplasma bovis* İzolasyonu” IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Lefkoşa, KIBRIS, 104-105, Ekim, 2010.

3- Öngör H., **KALIN R.**, Karahan M., Çetinkaya B., Akan M. “Hindilerde Mikoplazma Türlerinin Kültür ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Saptanması” IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Lefkoşa, KIBRIS, 106-107, Ekim, 2010.

4- Öngör H., Karahan M., **KALIN R.**, Bulut H., Çetinkaya B. “Hindilerde Avian Metapneumovirus Alt Tiplerinin RT-PCR ile Saptanması” IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Lefkoşa, KIBRIS, 248-249, Ekim, 2010.

5- Berber E., Uluşık U., Karahan M., Eröksüz Y., **KALIN R.**, Özer S. “İki Olguda Gözlenen Koyun Paratüberkülozu” X. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Kongresi, İstanbul, 46-47, Mayıs, 2008.

6- **KALIN, R.**, E. Atıl ve A. Ozen, “A Survey on the Evaluation of the Curriculum of the Faculty of Veterinary Medicine, The University of Fırat in Terms of Communication and Technical Skills,” V. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Kongresi, İstanbul, 2003

7- Çetinkaya B., Karahan M., Atıl E., **KALIN R.**, De Baere T., Vaneechoutte M. “Koyun ve Keçilerde *Corynebacterium pseudotuberculosis* İzolatlarının PCR ile İdentifikasyonu” V. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Konya, 82-83, Eylül, 2002.

8- Çetinkaya B., Karahan M., Atıl E., **KALIN R.**, De Baere T., Vaneechoutte M. “Koyun ve Keçilerde *Corynebacterium pseudotuberculosis* İzolatlarının PCR ile İdentifikasyonu” IV. Ulusal Veteriner Hekimliği Öğrencileri Kongresi, İstanbul, Mayıs, 2002.

## **YER ALDIĞI PROJELER**

1-) Broylerlerde E. coli O157’nin Prevalansı ve Pulsed Field Jel Elektroferez (PFGE) Yöntemiyle Tiplendirilmesi. **FÜBAP (1763), 2009 (Araştırmacı)**

2-) Mastitisli İnek Sütlerinde Önemli Patojenlerin Direkt Tespiti İçin Bir Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu Geliştirilmesi  
**TAGEM (HS/01/02/08/129), 2008 (Araştırmacı) (Devam Ediyor)**

3-) Biodiversity of Ruminant Mycoplasmas in Eastern Turkey: Application for Vaccines and Control Strategies (Türkiye-Fransa)  
**TÜBİTAK Uluslararası İkili İlişkiler (PIA-Bosphorus-553-1050351), 2006 (Araştırmacı)**

**4-) Investigation of Mycoplasma Species in Goats and Cattle in the Elazig Region Fransa Büyükelçiliği, 2005 (Araştırmacı)**

### **KATILDIĞI KONGRE, KURSLAR ve SERTİFİKALARI**

IX. Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 5-7 Ekim 2010, Lefkoşa

**Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programı**, Fırat Üniveristesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu, 04 Temmuz 2008, Elazığ

**ISO 22000:2005 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Standardı ve Dokümantasyon Eğitimi Sertifika Programı** 21.06.2008-22.06.2008 Adana

**ISO 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi Standardı ve Dokümantasyon Eğitimi Sertifika Programı** 08.03.2008-09.03.2008 Adana

**Temel HACCP (Kritik Kontrol Noktalarında Tehlike Analizi) ve Mevzuat Eğitimi Programı** Elazığ Bölgesi Veteriner Hekimler Odası 19.05.2007-21.05.2007 Elazığ

Certificate of Training “**Methods for Mycoplasma Isolation and Identification of Ruminant Mycoplasmas and Molecular Epidemiology of Contagious Caprine Pleuropneumonia (CCPP) by Multilocus Sequence Typing of Mycoplasma capricolum subsp. capripneumoniae**” 2<sup>nd</sup>-27<sup>th</sup> October, 2006, CIRAD-EMVT Department, Control of Emerging and Exotic Animal Diseases Unit, Montpellier, France

IV. Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Veteriner Hekimliği Öğrencileri Kongresi, 9-11 Mayıs 2002, İstanbul

### **ALDIĞI ÖDÜLLER**

IV. Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Veteriner Hekimliği Öğrencileri Kongresi Poster 2.ciliği, İstanbul, 9-11 Mayıs, 2002