



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK- YL-2012-0002

MASTİTİSLİ SIĞIRLARDAN İZOLE EDİLEN
SHİGA TOKSİNİ ÜRETEEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARININ
VİRULANS FAKTÖRLERİNİN SAPTANMASI

Biyolog Mesude BİÇER

DANIŞMAN
Doç. Dr. Şükrü KIRKAN

AYDIN - 2012

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK- YL-2012-0002**

**MASTİTİSLİ SIĞIRLARDAN İZOLE EDİLEN
SHİGA TOKSİNİ ÜRETEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARININ
VİRULANS FAKTÖRLERİNİN SAPTANMASI**

Biyolog Mesude BİÇER

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Şükrü KIRKAN**

AYDIN - 2012

ÖNSÖZ

Mastitis, süt çiftliklerinde temel bir problem oluşturmakla beraber *E. coli* kaynaklı mastitisin insidansındaki artış ve şiddetli semptomları nedeniyle sığırlarda önemli bir hastalığa neden olmaktadır. *E. coli* kaynaklı mastitis kavramı, çevredeki organizmaları ve fekal kontaminasyon sonucu oluşan meme kontaminasyonunu içermektedir.

Shiga-toksini üreten *E. coli* (STEC) izolatları gıda kaynaklı patojenlerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Ayrıca bu suşlar insanlarda ciddi gastrointestinal hastalıklara ve hemolitik üremik sendrom (HUS) gibi komplikasyonlara neden olmaktadır.

Sığır, koyun ve keçi gibi evcil ruminantlar, insanda enfeksiyonlara neden olan STEC suşlarının temel rezervuarları olarak bilinmektedir. Bu bakterilerin patojenitesi Stx1 ve Stx2 genleri tarafından kodlanan Shiga toksinleri aracılığıyla, bağırsak mukozasında *eae* genine (intimin) sahip attaching-effacing (AE) lezyonları ve enterositlere bağlanan patojenite adalarının varlığı ile gerçekleşmektedir. STEC suşları ilk adherens için gerekli genlere ve attaching-effacing (AE) lezyonlarına neden olan *eae* genlerine sahiptir. Sığır hastalıklarına neden olan non-STEC suşlardaki *eae* pozitif genlerin rolünün tam olarak bilinmemesine rağmen bu suşların insanlarda hastalık yapan enteropatojenik *E. coli*'ye benzer olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmanın amacı Aydın ilindeki sığırlarda mastitisli inek sütlerinden izole edilen STEC suşlarının virulans genleri ve serogruplarını belirlemektir. Bu çalışma doğrultusunda Aydın yöresindeki sığır işletmelerinden alınan mastitisli süt örnekleri *E. coli* açısından incelenmiş ve serogruplandırma ile birlikte toksin saptanması hedeflenmiştir. Özellikle yetiştiriciliği çok yapılan süt sığırları örnekleme materyali olarak kullanılmıştır. Böylece yetiştiricilere rehber olunması, ayrıca moleküler metotların etkin olarak uygulanması amaçlanmıştır.

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (VTF 12027 no'lu proje) tarafından desteklenmektedir.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|--------------|
| KABUL VE ONAY SAYFASI | i |
| ÖNSÖZ | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | vii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | x |
| RESİMLER DİZİNİ | xi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Tanımı | 1 |
| 1.2. <i>Escherichia coli</i> 'nin Sınıflandırılması | 4 |
| 1.2.1. Taksonomik Sınıflandırma | 4 |
| 1.2.2. Serolojik Sınıflandırma | 5 |
| 1.3. STEC Nomenklatür | 6 |
| 1.4. STEC suşlarının Epidemiyolojisi | 7 |
| 1.4.1.1. İnsanlarda STEC Serotipleri | 7 |
| 1.4.1.2. İnsanlarda STEC'in Coğrafik Dağılımı | 8 |
| 1.4.2. Ruminantlarda STEC | 10 |
| 1.4.3. STEC Enfeksiyonu | 12 |
| 1.5. STEC' nin Virulans Faktörleri | 16 |
| 1.5.1. Shiga Toksinler | 20 |
| 1.5.1.1. Stx Yapısı | 20 |
| 1.5.1.2. Stx Reseptörleri | 21 |
| 1.5.1.3. Virulansın Regülasyonu | 22 |
| 1.5.1.4. Stx İnternalizasyonu | 23 |
| 1.5.1.4.1. STEC' in İntestinal Kolonizasyonu | 23 |
| 1.5.1.5. Stx ve İmmun Yanıt | 27 |
| 1.5.1.5.1. İnflamasyon (Yangı) | 27 |
| 1.5.1.6. Stx1 ve Stx2' nin Subtipleri | 31 |
| 1.5.1.6.1. Stx1 | 31 |

| | |
|--|----|
| 1.5.1.6.2. Stx2 | 31 |
| 1.5.1.7. Stx1 ve Stx2' nin Toksisitesi | 32 |
| 1.5.1.8. Stx-dönüşen bakteriyofaj | 33 |
| 1.5.2. İntimin | 34 |
| 1.5.2.1. Enterosit Yıkımlayıcı Lokus (LEE) | 36 |
| 1.5.2.2. İntimin Varyantları | 38 |
| 1.5.2.3. İntimin Reseptörleri | 40 |
| 1.5.3. Potansiyel Aksesör Virulans Faktörleri | 43 |
| 1.5.3.1. EHEC-hemolizin | 43 |
| 1.5.3.2. Enteroagregatif ısı-stabil Toksin (EAST1) | 44 |
| 1.5.3.3. Katalaz/Peroksidaz (katP tarafından kodlanan) | 44 |
| 1.5.3.4. Ekstrasellüler serin proteaz (EspP) | 44 |
| 1.5.3.5. <i>Clostridium difficile</i> -benzeri Toksin ve Efa1 | 45 |
| 1.5.3.6. STEC oto aglütine adhezinler (Saa) | 45 |
| 1.5.3.7. Üreaz | 46 |
| 1.5.3.8. Tip IV Pilus | 46 |
| 1.6. STEC Patogenezi | 47 |
| 1.6.1. İnsanlarda STEC İlişkili Hastalıklar | 47 |
| 1.6.2. Hayvanlarda Hastalık Nedeni Olarak STEC | 48 |
| 1.6.2.1. Sığırlarda STEC | 48 |
| 1.7. STEC Enfeksiyonunun Tanısı | 49 |
| 1.7.1. Kültüre-dayalı Tespit | 49 |
| 1.7.2. PCR-dayalı Tespit | 50 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM | 52 |
| 2.1. Gereç | 52 |
| 2.1.1. İzolasyon Örnekler | 52 |
| 2.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Ayıraçlar, Solusyonlar ve Antiserumlar | 52 |
| 2.1.2.1. Besiyerleri | 52 |
| 2.1.2.1.1. İzolasyon Besiyeri | 52 |
| 2.1.2.1.1.1. Modifiye Tryptic Soy Broth (Merck 1.09205) | 52 |
| 2.1.2.1.1.2. İdentifikasyon Besiyerleri | 53 |
| 2.1.2.1.2.1. Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar (Difco 279100) ve CT SMAC Agar Katkısı (Merck 1.09202) | 53 |
| 2.1.2.1.2.2. Eozin - Metilen Blue (EMB) Agar | 54 |

| | |
|---|----|
| 2.1.2.1.2.3. Kanlı Agar Base (Merck1.10886) | 54 |
| 2.1.2.1.2.4. Lassen'in 3'lü TüpBesiyeerleri | 55 |
| 2.1.2.2. Ayıraçlar | 56 |
| 2.1.2.2.1. İndol Ayıracı | 56 |
| 2.1.2.3. Solusyonlar | 56 |
| 2.1.2.3.1. EDTA (0,5 M) | 56 |
| 2.1.2.3.2. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer | 56 |
| 2.1.2.3.3. Gel Loading Buffer (6X) | 57 |
| 2.1.2.3.4. Tris (1M) | 57 |
| 2.1.2.3.5. 1M NaCl | 57 |
| 2.1.2.3.6. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA) | 57 |
| 2.1.2.4. Boyalar | 57 |
| 2.1.2.5. Antiserum Test Kitleri | 58 |
| 2.1.2.5.1. <i>E. coli</i> Lam Aglutinasyon Testi (DENKA SEIKEN-295347) | 58 |
| 2.1.3. PCR | 60 |
| 2.1.3.1. Kullanılan Cihazlar | 60 |
| 2.1.3.2. MgCl ₂ , Taq DNA Polimeraz, 10XTaq Buffer, dNTP Set | 60 |
| 2.1.3.3. Primerler | 60 |
| 2.1.4. Elektroforez Cihazı | 61 |
| 2.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı | 61 |
| 2.1.4.2. Marker | 61 |
| 2.1.4.3. Etidium Bromür | 61 |
| 2.1.4.4. Standart Suş | 61 |
| 2.2. Yöntem | 62 |
| 2.2.1. Örneklerin Alınması | 62 |
| 2.2.2. <i>E.coli</i> İzolasyonu | 62 |
| 2.2.2.1. Fenotipik İdentifikasyonu | 62 |
| 2.2.2.1.1. Sefiksim-Tellürit Katkılı SorbitolMacConkey Agarda Üreme | 62 |
| 2.2.2.1.2. Eozin - Metilen Blue (EMB) Agarda Üreme | 63 |
| 2.2.2.1.3. Biyokimyasal Testler | 63 |
| 2.2.2.1.3.1. OksidazTesti | 63 |
| 2.2.2.1.3.2. Nitrat Test | 63 |
| 2.2.2.1.4. <i>E. coli</i> Lam Aglutinasyon Testi | 63 |
| 2.2.2.2. Genotipik İdentifikasyon | 64 |

| | |
|--|-----|
| 2.2.2.2.1. PCR | 65 |
| 2.2.2.2.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklmesi | 66 |
| 2.2.2.2.3. Jelde Yürütme | 66 |
| 2.2.2.2.4. Görüntüleme ve Değerlendirme | 66 |
| 3. BULGULAR | 67 |
| 3.1. İzolasyon Bulguları | 67 |
| 3.2. PCR Bulguları | 68 |
| 3.3. O somatik antijen Bulguları | 68 |
| 3.3.1. Grup O Antiserumlar ile Serogruplandırma | 68 |
| 4. TARTIŞMA | 72 |
| 5. SONUÇ | 80 |
| ÖZET | 82 |
| SUMMARY | 83 |
| KAYNAKLAR | 84 |
| ÖZGEÇMİŞ | 112 |
| TEŞEKKÜR | 113 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A/E: Attacing-Effacing

bp: Baz Pair

CesT: Tir Şaperonu

CMT: KaliforniaMastitis Testi

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EaeA: İntimin

EAST1: Enteroagregatif Isı-Stabil Toksin

EfaI: Adhezyon için EHEC faktör

EMB: Eozin - Metilen Blue

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: Etilen Diamin Tetraasetik Asit

EhxA: Enterohemolizin

EPEC: Enteropatojenik *Escherichia coli*

EspP: Ekstrasellüler Serin Proteaz

Gb3: GlobotriosilSeramid

GrlA: LEE aktivatörün global regülatörü

Hp90: Tirozinle Fosforile Edilen Ökaryotik Membran Proteini

HC: Hemorajik Kolitis

Hir: Konak Hücre İntimin Reseptörü

HUS: Hemolitik Üremik Sendrom

IEC:İntestinal Epitelyal Hücre

katP: Katalaz/peroksidaz

kbp: Kilo Baz Pair

LEE: Enterosit Yıkımlayıcı Lokus

Ler: LEE-kodlayan Regülatör

MCA: MacConkey Agar

µl: Mikrolitre

OMP: Dış Membran Proteini

Per: Plazmid-kodlayan Regülatör

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PFGE: Pulsed-field Jel Elektroforezi
PMN: PolimorfoNüklear Lökosit
Pmol: Pikomol
RE: Restriksiyon Enzim
Saa: STEC Oto Aglutine Adhezinler
SMAC: Sorbitol MacConkey
STEC: Shiga toksin üreten *Escherichia coli*
Stx: Shiga Toksin
TE: Tris-EDTA Buffer
Tir: Transloke intimin reseptörü
TirM: Transloke intimin reseptörü bağlanma yeri
TSB: Tryptone Soy Broth
TTP: Trombotik Trombositopenik Purpura
VTEC: Verositotoksin üreten *Escherichia coli*
WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Çizelge 1.1. Diyarojenik <i>E.coli</i> 'nin 5 farklı sınıfının karakteristik özellikleri | 3 |
| Çizelge 1.2. <i>E. coli</i> biyokimyasal özellikleri | 4 |
| Çizelge 1.3. İnsan, sığır, koyun ve diğer kaynaklardan izole edilen non-O157 STEC serotipleri | 13 |
| Çizelge 1.4. STEC' in virulans ilişkili faktörleri | 16 |
| Çizelge 1.5. <i>stx₂</i> gen ailesinin varyantları, orijini ve ilişkili hastalığı | 32 |
| Çizelge 2.1. Multipleks PCR'da kullanılacak oligonükleotid dizileri | 60 |
| Çizelge 2.2. Mastermiksin hazırlanma oranları | 65 |
| Çizelge 2.3. Multipleks PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı | 66 |
| Çizelge 3.1. Aydın ili çevresinde mastitisli sütlerden izole edilen <i>E. coli</i> suşlarının serogruplandırılması | 69 |
| Çizelge 3.2. Aydın ili çevresinde mastitisli sütlerden izole edilen STEC suşlarının virulans gen profili | 71 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|--------------|
| Şekil 1.1. İnsanlardaki hastalıklarla ilişkili olan Shiga-toksini üreten <i>E.coli</i> serotipleri | 10 |
| Şekil 1.2. İnsan gıda zincirinden ruminant rezervuarlarına STEC geçiş şeması | 11 |
| Şekil 1.3. Tipik Shiga toksin üreten <i>E.coli</i> 'nin karakteristik virulans faktörlerinin şematik hali | 17 |
| Şekil 1.4. Enterohemorajik <i>E.coli</i> 'nin insanlarda oluşturduğu hastalığa genel bir bakış | 24 |
| Şekil 1.5. Shiga toksin kaynaklı inflamatuvar yanıtın şematik hali | 30 |
| Şekil 1.6. Faj λ (A) ve faj H-19B (B)'nin DNA sekansı | 34 |
| Şekil 1.7. Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i> (EPEC)'nin pedestal formasyonu | 36 |
| Şekil 1.8. STEC' in LEE lokusunun LEE1' den LEE4'e kadar olan ve tir operon yapısı | 37 |
| Şekil 1.9. EPEC' in konak hücrelerine adhezyon mekanizmasının şematik hali | 42 |

|

RESİMLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Resim 3.1. <i>Escherichia coli</i> suşunun kanlı (solda) ve EMB (sağda) agardaki görüntüsü | 67 |
| Resim 3.2. <i>Escherichia coli</i> mikroskopik görüntüsü | 67 |
| Resim 3.3. Shiga toksin üreten <i>E. coli</i> için yapılan multipleks PCR sonuçları | 68 |

1. GİRİŞ

1.1. Tanımı

Escherichia coli ilk olarak 1885 yılında Theodor Escherich tarafından tanımlanmıştır. Önceleri *Bacterium coli commune* olarak bilinen bu mikroorganizma daha sonra *Escherichia coli* olarak adlandırılmıştır. Bu bakteri, uzun yıllar insanlar ve sıcakkanlı hayvanlar ile kuşların normal bağırsak florasında bulunan ve patojen olmayan fakültatif bir mikroorganizma olarak kabul edilmiştir (Nataro and Kaper 1998, Wasteson 2002, Fairbrother ve Nadeau 2006, Walker 2008). Ancak 1920'li yıllarda üriner sistem enfeksiyonlarına ve 1940'lı yıllarda da çocuklarda gastroenteritise neden olduğu belirlenmiştir (Fratamico ve Smith 2005). Yapılan araştırmaların artmasıyla, enteritis, ürogenital enfeksiyonlar, yara enfeksiyonları, mastitis, sepsis ve meningitis gibi hastalıkların patojenik etkenleri arasında da bulunduğu anlaşılmıştır (Wasteson 2002).

Escherichia coli (*E. coli*), insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde bulunan predominant fakültatif anaerob olarak bilinen gram-negatif bir basildir. Bu organizmalar genellikle konak hücreye zarar vermeden, doğumdan itibaren bebeklerin gastrointestinal sistemlerinde kolonize olmaktadır (Drasar ve ark. 1974, Bettelheim ve Lennox-King 1976). Son zamanlarda ise geniş ölçüde insan hastalıklarının kaynağını teşkil eden *E. coli* klonları gelişmiştir. Nataro ve Kaper (1998) *E. coli* bakterisinin önemli bir transformasyona uğradığını ve bunun süreceğini bildirmiştir. Bu çerçevede, başlangıçta bağırsaklarda zararsız bir bakteri olarak görülen *E. coli*'nin bazı suşlarının artık insan ve hayvanlarda hastalığa neden olan patojenler olduğu anlaşılmıştır. *E. coli* nedeniyle oluşan hastalık salgınları binlerce kişiyi etkileyebilmekte ve uluslararası manşetlerde yer tutabilmektedir (Nataro ve Kaper 1998, Petridis ve ark. 1998, Kaper ve Karmali 2008). *E. coli* kaynaklı enfeksiyon sonucunda 3 klinik sendrom gözlenmektedir: i) enterik/ishalli hastalıklar, ii)üriner sistem enfeksiyonları, iii)sepsis/menenjit.

E. coli'nin patojenik suşları farklı patotiplere ayrılabilir, her patotip ise farklı bir hastalığa neden olmaktadır (Kaper ve ark. 2004). Tüm patotipler iki büyük gruba ayrılabilir: intestinal patojenik *E. coli* ve ekstraintestinal patojenik *E. coli*. İntestinal patojenik *E. coli* kolonizasyon ile birlikte diyare, şiddetli kolitis, dizanteriye neden olmaktadır.

Ekstraintestinal patojenik *E. coli* ise üriner sistem enfeksiyonları ve sepsisemilere yol açabilmektedir.

En yaygın ekstraintestinal patotip, üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan üropatojenik *E. coli* (UPEC)' dir. Bu grupta yer alan diğer önemli patotip ise menenjit/sepsis ilişkili *E. coli* (MNEC)'dir. İlginç bir durum olarak, fonksiyonel çalışmalardaki genomik karşılaştırma farklı UPEC izolatları açısından virulans genlerinin belirlenmesinde önemli olmaktadır (Johnson 2003). Böylece bazı spesifik alternatif kombinasyonlarının üriner sistem enfeksiyonu ve yangıya yol açtığı söylenebilmektedir.

İntestinal patojenik *E. coli* çok sayıda patotipten meydana gelmektedir. Bu patotipler; enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC, STEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), enteroaggregatif *E. coli* (EAEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) ve diffüz adherent *E. coli* (DAEC)' dir (Kaper ve ark. 2004). Ayrıca Crohn hastalığında adherent invaziv *E. coli* (AIEC) suşlarının da varlığı saptanmıştır (Barnich ve ark. 2007). Bu patotiplerin her biri benzer virulans genleri taşıyan yakın ilişkili organizmaların bir koleksiyonundan oluşmaktadır. Örneğin; bütün ETEC izolatları benzer yapıda ısı-labil yada ısı-stabil toksinler üretebilmektedir. Aynı şekilde bütün EPEC izolatları virulans için gerekli olan tip III sekresyon sistemine sahiptir (Kaper ve ark. 2004).

Diyarojenik *E. coli* suşlarının sınıflandırılması ise; adhezyon, invaziv ve toksin üretme yeteneğine dayanmaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge1.1. Diyarojenik *E. coli*'nin 5 farklı sınıfının karakteristik özellikleri (Nataro ve Kaper 1998, Robins-Browne 2000).

| Patotip | Virulans Determinantları | Adhezyon ve İnvazyon özellikleri | Hastalık ile ilişkisi |
|--|--|---|---|
| Enterotoksijenik <i>E. coli</i> (ETEC) | Isı-labil (LT) ve Isı-stabil (ST) enterotoksin. | Adheziv ve non-invaziv | Seyahat ishali, Bebek ishali |
| Enteroinvaziv <i>E. coli</i> (EIEC) | Plasmid kodlanmış dış membran invazinleri ve toksinleri | Kolon hücrelerinde invazyon. | Shigella benzeri dizanteri |
| Enteroaggregatif <i>E. coli</i> (EAEC) | Enteroaggregatif ısıya dayanıklı enterotoksin (EAST); agregatif adherens fimbria | Kümeler halinde adhezyon | Mukoidishal, sulu ishal |
| Enteropatojenik <i>E. coli</i> (EPEC) | Yalancı pili oluşumu; kromozomal patojenite ada ürünleri (LEE) | Kümeler halinde adhezyon. A/E lezyon oluşumuna yol açmaktadır | Az gelişmiş ülkelerde bebek ishali |
| Enterohemorajik <i>E. coli</i> (EHEC, STEC), | Shigasitotoksin; LEE patojenite ada ürünleri. | Yüksek derece adheziv. Non-invaziv | Kanlı ishal, Hemorajik kolit (HC), Hemolitik Üremik Sendrom (HUS) |

1.2. *Escherichia coli*'nin Sınıflandırılması

1.2.1. Taksonomik Sınıflandırma

E. coli, Enterobacteriaceae familyasına ait gram-negatif, sporsuz ve çubuk şekilli bir bakteridir. Bu bakteri genellikle karakteristik biyokimyasal reaksiyonlar yardımıyla tanımlanmaktadır. *E. coli*'nin glukozu fermente etme yeteneği ve gaz oluşturması temel karakteristik özelliğidir. *E. coli* tespitinde sitrat testi negatif (%99), metil red pozitif (%99), Voges-Proskauer negatif (%100) sonuç vermektedir. Ayrıca β -galaktosidaz üretimi (%95) ve indol üretimi (%98) gerçekleşirken, hidrojen sülfid (%99) yada üre hidrolizi (%99) oluşmamaktadır (Farmer ve ark. 1985).

E. coli'nin biyokimyasal testlere verdiği reaksiyonlar Çizelge 1.1'de belirtilmiştir. *E. coli* O157:H7'nin diğer *E. coli*'ler için geliştirilmiş biyokimyasal testlere oranla aynı reaksiyonu verdiği belirtilmektedir (Koneman ve ark. 1997).

Çizelge 1.2. *E. coli* biyokimyasal özellikleri (Koneman ve ark. 1997)

| <u>Biyokimyasal Testler</u> | <u><i>Escherichia coli</i></u> |
|-----------------------------|--------------------------------|
| İndol | + |
| Metil red | + |
| Voges Proskauer | - |
| Sitrat | - |
| Lizin dekarboksilaz | + |
| Arjinin dihidrolaz | V |
| ONPG | V |
| Sarı Pigment | - |
| Laktoz | * |
| Sorbitol | + |
| Mannitol | + |
| Adonitol | - |
| Sellobioz | - |

* *E. coli* O157 suşları sorbitol negatiftir. V: Suşların %11-%89'unda pozitifdir.

E. coli; nutrient agar ve kanlı agar gibi genel besiyerleri ve MacConkey (MC) agar, Eosine Methylen Blue (EMB) agar gibi selektif ve diferansiyel besiyerlerinde 37 °C'de 24 saatte yuvarlak 1.2 mm çapında, parlak, düzgün kenarlı, S- tipli koloniler meydana getirir. Etken laktozu fermente ettiği için MC agarda pembe renkli koloniler, EMB agarda metalik refle görünümünde koloniler oluşturur. Ayrıca besiyerlerinde kenarları düzgün olmayan,

küçük ve kuru görünümlü R- tipli koloniler ile mukoid özellikteki koloniler de görülür. Genellikle, patojen olan bazı suşları kanlı agar da hemoliz oluşturma yeteneğindedir. Buyyonda kısa bir süre içerisinde hafif bir bulanıklık oluşturarak ürer (Bisping ve Amtsberg 1988, Erensoy 1990).

E. coli O157:H7 serotipi için glukozdan gaz oluşturma yeteneği pozitif, üreaz aktivitesi ve H₂S oluşturma yeteneği negatiftir (Topçu ve ark. 2002).

E. coli O157:H7 optimal üreme ısısı 37 °C olmasına rağmen 20-40 °C'de, optimal pH'sı 7-7,2 olmasına rağmen pH 5-8'de de üreyebilmektedir (İzgür ve Akan 2002). Doyle ve Padhye yaptıkları bir çalışmada -80 ve -20 °C'lerde dondurulmuş kıymalarda, 9 ay boyunca canlılığını sürdürebildiğini tespit etmişlerdir (Temelli 2002).

E. coli O157:H7 serotipinin yüksek tuz konsantrasyonlarına da direnç gösterdiği belirtilmektedir (Kehl 2002). Glass ve ark. (1992) tarafından yapılan bir araştırmada *E. coli* O157:H7'nin 200 ppm nitrit ve % 4 NaCl içeren ve pH'sı 5,6 olan sıvı besiyerinde gelişebildiği bildirilmiştir.

1.2.2. Serolojik Sınıflandırma

Hem patojenik hemde non-patojenik *E. coli* suşları benzer biyokimyasal reaksiyonlar oluşturmaktadır. Bu nedenle serotiplendirme, hastalıkla ilişkili *E. coli* suşlarının identifikasyonu ve sınıflandırılması için kullanılan en güvenli yöntemdir. Serotiplendirme, yüzey yapısında bulunan antijenik farklılıklara dayanmaktadır.

E. coli'nin serotiplendirilmesi 4 temel yüzey antijenine göre yapılmaktadır: i) O (somatik), ii) H (flagellar), iii) K (capsular) (Lior ve ark. 1996) ve iv) F (fimbrial) antijendir (Orskov ve ark. 1982). Somatik (O) antijenler, smooth(S) *E. coli* suşlarının hücre duvar yapılarında bulunan lipopolisakkarit kompleksinden oluşmaktadır. Polisakkarit-tekrarlayan ünitelerin immunojenitesi, O antijenlerin spesifitesini içermektedir. Bu tekrarlayan bölgelerden yoksun bazı suşlar ise rough(R) olarak bilinmektedir. Herbiri ayrı bir serogrubu ifade eden 170 farklı O antijeni tanımlanmıştır (www.microbionet.com.au).

Flagellar (H) antijenin antijenik çeşitliliği, flagella yapısında bulunan farklı tiplerdeki flagellin proteinine dayanmaktadır. Fakat flagelları gelişmiş hücreler organizmanın yarı-katı

agardan pasajlanmasıyla elde edilebilir. Hareketli olmayan bu suşlar non-motile(NM) yada H- olarak ifade edilmektedir (Chandler ve Bettelheim 1974).

Kapsüler (K) antijen, O-spesifik lipopolisakkaritten bağımsız olarak asidikpolisakkaritlerden meydana gelmektedir (Lior ve ark. 1996).

Fimbrial (F) antijenler, proteinöz moleküler yapılar bilinmeden önce K antijenleri olarak tanımlanmıştır, fakat kendi yapılarının ortaya çıkmasıyla K antijen profilinden ayrılmıştır (Orskov ve ark. 1982).

1.3. STEC Nomenklatür

Escherichia coli genellikle insan ve hayvanların bağırsaklarında normal mikrofloranın bir parçası olan nonpatojenik üyelere sahip, genetik olarak heterojen bakteri grubudur. Ancak bu bakterilerin belirli alt türleri intestinal veya ekstraintestinal hastalığa neden olan genlere sahiptir (Kaper ve ark. 2004). Enterik hastalığa neden olan *E. coli*, virulans faktörleri ve sahip olduğu mekanizmalara dayanarak patotiplere ayrılmaktadır (Nataro ve Kaper 1998, Kaper ve ark. 2004). Shiga toksin olarak adlandırılan güçlü bir sitotoksin salgılayan Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) bu patotiplerden birini oluşturmaktadır. Ayrıca STEC verotoksin üreten *E. coli* olarak da adlandırılmaktadır. Shiga toksin (Stx) adını *Shigella dysenteriae* serotip1 tarafından üretilen bir sitotoksine benzemesinden almaktadır (O'Brien ve ark. 1982), Verotoksin (VT) ise Vero hücreleri için sitotoksiniteye neden olmaktadır (Konowalchuk ve ark. 1977). Son zamanlarda, 2 toksinin müthiş benzerliğinden dolayı Verotoksin-üreten *E. coli* suşlarından STEC olarakta bahsedilmektedir (O'Brien ve ark. 1982, O'Brien ve LaVeck 1983). Hemorajik kolitis(HC) ve hemolitik üremik sendroma neden olan STEC, aynı zamanda Enterohemorajik *E. coli* olarak da adlandırılmaktadır (EHEC; Levine ve ark. 1987, Nataro ve Kaper 1998).

1.4. STEC suşlarının Epidemiyolojisi

1.4.1.1. İnsanlarda STEC serotipleri

E. coli'nin O157:H7 serotipi ilk kez 1975 yılında kanlı ishali bulunan bir hastadan izole edilmiştir. Bu vaka sporadik bir HC(kanlı ishal) vakası olarak kaydedilmiştir. Bu

vakadan sonra 1982 yılına kadar hiçbir vakadan O157:H7 serotipi izole edilmemiştir. *E. coli* O157:H7'nin bir insan patojeni olduğu ilk kez 1982 yılında anlaşılmıştır. ABD'nin Oregon ve Michigan eyaletlerinde 1982 yılında sığır etinden hazırlanmış köfteli hamburger yiyen insanlar arasında 47 kişide şiddetli karın ağrısı ve sulu ishale başlayan ve kanlı ishale dönüşen ateşsiz veya çok az ateşle seyreden iki hastalık salgını oluşmuştur. İnsanlarda şiddetli kanlı ishale seyreden bu iki salgının araştırılması sonucunda, bu salgınlara aynı hızlı yemek lokanta zincirinden elde edilerek iyi pişirilmeden tüketilen hamburger köftelerinden kaynaklanan ve daha önce patojen olarak tanımlanmayan O antijen 157 ve H antijen 7 olarak ifade edilen bir *E. coli* suşunun neden olduğu belirlenmiştir (Riley ve ark. 1983, Wells ve ark. 1983, Rocchi ve Capozzi 1999, FSIS 2001, Feder ve ark. 2003). *E. coli* O157:H7 olarak tanımlanan bu suşun, antijenik, fizikokimyasal ve immunolojik olarak ve biyolojik etkileri yönünden birbirlerinden farklı Stx'e benzer toksinler üreten ve HC ve HUS'a neden olan EHEC kategorisine ait olduğu tespit edilmiştir (Chinyu ve Brandt 1995, Armstrong ve ark. 1996, Reilly 1998, Schlundt ve ark. 2004, Karch ve ark. 2005, Yoon ve Hovde 2008). *E. coli* O157:H7'nin toksinleri Stx'e benzemektedir ve Vero hücre kültürleri için toksijeniktir. Bu toksinleri üreten *E. coli* suşları VTEC veya STEC olarak bilinmektedir. Bu patojenin toksinleri VT1, VT2, Stx1 ve Stx2 olarak adlandırılmaktadır (Armstrong ve ark. 1996, Wasteson 2002, Tarr ve ark. 2005). Bu toksinlerin *E. coli* O157:H7 enfeksiyonunun patojenitesinde doğrudan ve önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Chinyu ve Brandt 1995).

STEC suşlarının O157:H7 serotipi; ilk kez HC ve HUS hastalarında saptanan, en bilinen serotipidir (Riley ve ark. 1983). Bu serotip, çok sayıda salgın ve hastalık vakalarından sorumludur (Griffin ve Tauxe 1991). Moleküler genetik çalışmaları, EPEC bakterisinin bir suşu olarak bilinen *E. coli* O157:H7'nin Shiga toksin genlerini kazanmasıyla daha virulent bir organizma olarak geliştiğini göstermektedir (Whittam ve ark. 1993). Fakat O157:H7 dışında 100' den fazla STEC serotipi ciddi insan hastalıkları ile ilişkilendirilmektedir (Çizelge 1.3). ABD' de HUS vakalarının % 20-25'inin kaynağını non-O157 STEC oluşturmaktadır (Johnson ve ark. 1996). 1980' li yıllardan bu yana çeşitli Avrupa ülkelerinde gözlenen HUS vakalarının % 10-30' una non-O157 STEC neden olmaktadır (Caprioli ve ark. 1997, Bonnet ve ark. 1998). İnsan hastalıkları ile ilişkili en yaygın non-O157 STEC serotipleri; O26:H11, O103:H2, O111:H-, O128:H2 ve O113:H21' i içermektedir (Griffin ve Tauxe 1991). Non-O157 STEC serotiplerinin etiyolojik önemi, STEC O157:H7 serotiplerini içeren salgınlarla ilişkilidir. STEC O157:H7/H- salgınlarında, sadece birkaç bireyde STEC

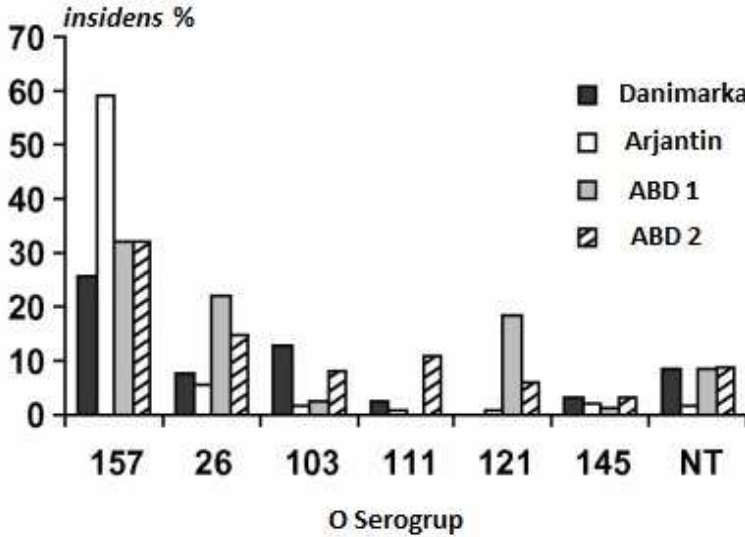
O157:H7/H- rastlanmıştır. Diğer bireylerde ise non-O157 STEC saptanmıştır. Bu durum STEC O157:H7/H- salgınlarında non-O157 STEC serotiplerinin de önemli rol oynadığını göstermektedir (Goldwater ve Bettelheim 1998). Amerika’ da STEC’ in O157:H7 serotipi gıdalarda bulunan patojenlerin büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır. Non-O157 STEC serotipleri ise insan sağlığı için majör komplikasyonları oluşturmalarına rağmen O157:H7 serotipi gibi gıdalardan önemli miktarlarda izole edilememiştir (Johnson ve ark. 1996).

Turutoğlu ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada; çiğ sütte *Escherichia coli* O157:H7 serotip varlığının, sığır mastitis etkeni olup olmadığını araştırmışlardır. Bu amaçla; 382 mastitisli ineğin sütlerinden izole edilen *E. coli* suşlarının Sorbitol MacConkey (SMAC) agarda kültüre edilmiştir ve lateks aglütinasyon yöntemiyle test edilmiştir. Suşların hiçbirisi *E. coli* O157:H7 olarak tespit edilmiştir. 382 mastitisli süt numunelerinin sonuçları incelendiğinde; % 26.2’ sinin *Staphylococcus aureus*, % 20.9 *Koagülaz Negatif Stafilokok*, % 13.0 *E. coli*, % 10.9 *Streptococcus uberis*, % 6.3 *Streptococcus dysgalactiae*, % 1.6 *Streptococcus agalactiae*, % 1.0 *Citrobacter freundii* and *Candida albicans*, % 0.5 *Actinomyces pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* and *Bacillus spp.* varlığı saptanmıştır. SMAC agarda sorbitolu fermente eden 50 adet *E. coli* suşlarında 24 saat içinde O157 lateks testinde aglütinasyon gerçekleşmediği için suşların hiçbirisi *E. coli* O157:H7 olarak tiplendirilmemiştir.

1.4.1.2. İnsanlarda STEC’in Coğrafik Dağılımı

STEC, gelişmiş ülkelerin oldukça önemli bir sorunudur (Johnson ve ark. 1996, Elliot ve ark. 2001). Sorbitolu fermente edemeyen, β -glukuronidaz-negatif O157:H7 STEC serotipleri; Amerika, Kanada, Japonya ve İngiltere’ deki HC ve HUS hastalarından izole edilmiştir. O157:H- EHEC suşlarının büyük çoğunluğu Avrupa ve Avustralya’ daki örneklerde saptanmıştır (Karch ve ark. 1993, Robins-Browne ve ark. 1998, Caprioli ve Tozzi 1998). Şili, Arjantin ve Avustralya gibi ülkelerde non-O157 STEC serotipleri HUS vakalarının çoğunluğunu oluşturmaktadır (Ojeda ve ark. 1995, Lopez ve ark. 1989, Robins-Browne ve ark. 1998, Elliot ve ark. 2001). Avustralya’ da görülen HUS salgınlarının araştırılması sonucunda, STEC O111:H- serotipinin insan hastalıklarının en önemli kaynağını oluşturduğu bildirilmiştir (Cameron ve ark. 1995, Henning ve ark. 1998, Elliot ve ark. 2001). STEC suşlarının O26:H-, O113:H21, O130:H11, OR:H9, O157:H-, Ont:H7 ve Ont:H- serotipleri ayrıca Avustralya’ da 4 yıl süren etiyolojik bir çalışmadan sporadik vakalar tarzında izole edilmiştir (Elliot ve ark. 2001).

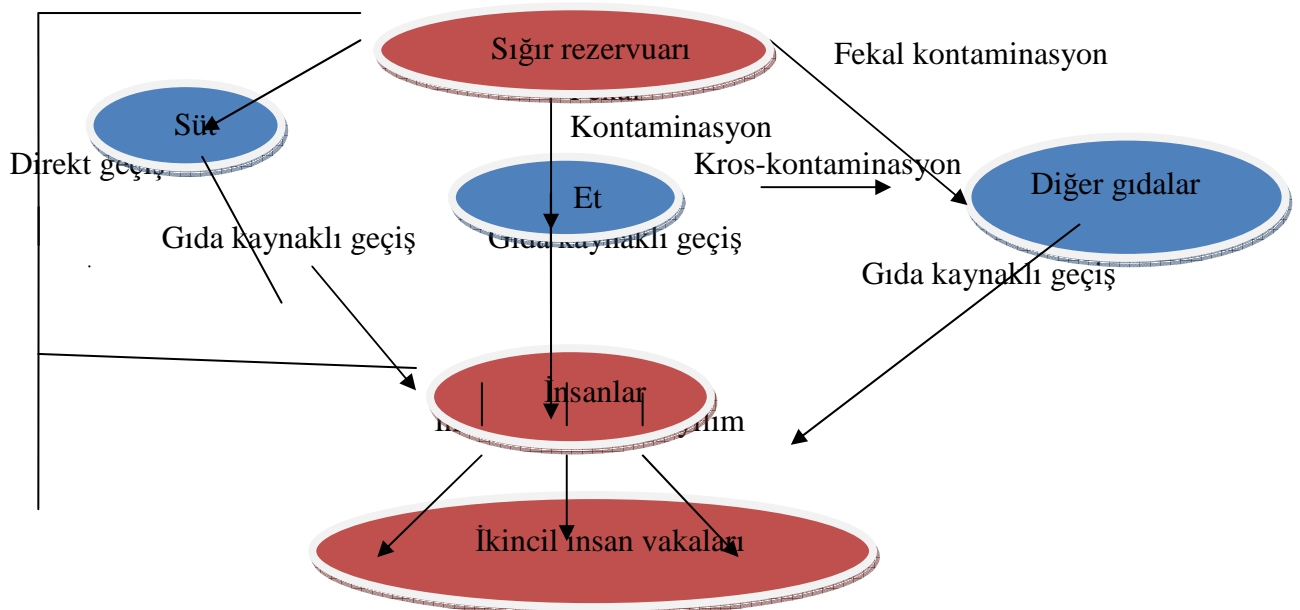
STEC suşlarının yaklaşık 500 serotipi insan hastalıklarından izole edilmesine rağmen, en az 10 O-serogrubu vakaların çoğundan sorumlu olmaktadır (Blanco ve ark. 2004b) (Şekil 1.1). Çoğu ülkede, O157:H7 serotipi bir çok hastalık ile ilişkilidir. Danimarka’da 312 STEC enfeksiyonunun %26’ sının kaynağını O157 STEC suşları oluşturmaktadır (Nielsen ve ark. 2006). Bu suşların % 68’ i ise 8 O-serogrubuna (O157, O103, O146, O26, O117, O145, O128, O111) sahiptir. Bu izolatların %8’i şiddetli hastalıklara neden olmaktadır. O26, O103, O111 ve O145 gibi bazı serogruplar çoğu ülkede sıklıkla görülürken; O157, O103, O146, O26, O117, O145, O128, O111 gibi serogrupların neden olduğu hastalıkların görülme sıklığı değişiklik göstermektedir. Örneğin; Arjantin’ de yapılan bir çalışmada kanlı ishal, HUS ve kansız ishali 99 çocuktan izole edilen 103 adet STEC suşunun %59’ unda O157:H7 ve O145:NM, O26:H11, O113:H21, O174:H2, O8:H19, O145:H25 gibi yaygın serotipler saptanmıştır (Rivas ve ark. 2006). Amerika Birleşik Devletleri’ nde yürütülen kapsamlı bir çalışmada, Jelacic ve arkadaşları (2003) 82 adet STEC suşlarının % 32’ inde O157:H7/H– ve en yaygın serotipleri (O26:H11, O121:H19 ve O103:H2) bulunmuştur. Brooks ve arkadaşları (2005) ; 1983-2002 yıllarında Birleşik Devletleri’ ndeki hastalardan izole edilen 940 adet nonO157 STEC suşlarını incelemiş ve baskın serogruplarını tespit etmiştir (sırasıyla O26,O111,O103, O121, O45 ve O145).



Şekil 1.1. İnsanlardaki hastalıklarla ilişkili olan Shiga-toksini üreten *E. coli* serotipleri (Gyles 2007). (Danimarka için olan veriler Nielsen ve arkadaşları, Arjantin için olan veriler Rives ve arkadaşları (2006), ABD1 için olan veriler Jelacic ve arkadaşları, ABD2 için olan veriler Brooks ve arkadaşları(2005) tarafından alınmıştır. Brooks ve arkadaşları sadece non O157:H7 STEC suşlarını incelemiştir. O157:H7 yüzdesi ise Jelacic ve arkadaşları tarafından incelenmiştir.NT: Tiplendirilemeyen serogruplar)

1.4.2. Ruminantlarda STEC

STEC suşlarının genel habitatu, özellikle sığır ve koyun gibi ruminantların intestinal sistemleridir (Beutin ve ark. 1993, Kudva ve ark. 1996, Beutin ve ark. 1997, Kudva ve ark. 1997). Sığır ve koyun gibi ruminantların dışkıları ile kontamine gıdalar, insanlarda enfeksiyonların temel kaynağını oluşturmaktadır. Mezbahalarda ise dışkı ve bağırsak içeriklerinin ete bulaşması kontaminasyona neden olmaktadır. Öncelikle etin yüzeyine bulaşan patojenler, etin parçalanmasıyla iç kısımlara yerleşmektedir (Brooks ve ark. 2001). İyi pişirilmemiş etin tüketilmesiyle insanlarda hastalıklar gözlenmektedir. **Şekil 1.2'**de STEC' in ruminant rezervuarlarından gıda stoklarına muhtemel giriş yolları açıklanmıştır. Genellikle bir ruminant türünün gastro-intestinal sistemine yerleşen STEC serotipleri, diğer ruminant konaklarından da izole edilmektedir (Beutin ve ark. 1993, Beutin ve ark. 1995, Beutin ve ark. 1997, Djordjevic ve ark. 2001). STEC O157:H7 birçok insan hastalıklarına neden olurken, gıda ve hayvan dışkılarında bulunan non-O157 STEC suşlarının izolasyon oranı STEC O157:H7' ye göre daha yüksektir (Willshaw ve Smith 1992, Johnson ve ark. 1996, Djordjevic ve ark. 2001). Bu yüzden insanlar, gıda ve dışkı kaynaklı non-O157 STEC serotiplerine daha sık maruz kalmaktadır. Şekil 1.2 ile Shiga-toksin üreten *Escherichia coli*'nin insanlara yayılmasında sığırların rolü görülmektedir. Sığırlar çok büyük oranda STEC rezervuarı olmaktadır. Bakterinin geçişi et, süt, direkt kontakt, kontamine su ve gıda yoluyla olmaktadır. Besi sığırları ise insanlarda hastalığa neden olan O157:H7 STEC için büyük oranda kaynak oluşturur. Sığırlardaki STEC popülasyonu kuşlar gibi diğer kaynaklar yoluyla insanlarda enfeksiyona yol açar. İnsandan insana enfeksiyonda söz konusu olmaktadır.



Şekil 1.2. İnsan gıda zincirinden ruminant rezervuarlarına STEC geçiş şeması (Armstrong ve ark. 1996).

Epidemiyolojik araştırmalar, STEC O157:H7 ve çeşitli non-O157 STEC serotiplerinin temel rezervuarını sığırların oluşturduğunu göstermektedir (çizelge 1.3)(Griffin ve Tauxe 1991, Hancock ve ark. 1994, Zhao ve ark. 1995, Chart 1998). En yaygın sığır STEC serotipleri; O26:H-, O26:H11, O91:H21, O103:H2, O111:H- ve O111:H8' dir. Bu serotiplerin tümünün insanlarda hastalığa neden olduğu bildirilmiştir (Butler ve Clarke 1994). Kuzey Amerika ve Avrupa' daki sığırlarda O157 STEC prevalansının %0-10 arasında değiştiği bildirilmiştir (Armstrong ve ark. 1996). Fakat son zamanlarda Hallaran ve Summer'in çalışmasında (2001), Avustralya' daki süt sığırlarında 505 adet fekal örnekte sadece 1 adet O157 serogrubunun saptandığı bildirilmiştir. Avustralya' da 1796 adet sağlıklı sığırları içeren bir çalışmada ise, 69 adet STEC serotipi saptanmıştır. Bu çalışmada sığırlarda non-O157 STEC prevalansı yüksek oranda bulunurken, sadece 2 adet sığırdaki STEC O157:H7/H- varlığı tespit edilmiştir(Hornitzky ve ark. 2001).

1.4.3. STEC Enfeksiyonu

İnsanların kontamine gıda tüketimi yada hayvanlarla doğrudan teması sonucu STEC enfeksiyonu gözlenmektedir. Bu enfeksiyon binlerce kişiyi etkileyen sporadik bir vakadır (Griffin and Tauxe 1991, Karmali 2004). Et (özellikle az pişmişhamburger eti), hazır sos, çiğ süt, peynir, pastörize edilmemiş elma ve meyve suyu, marul, kavun, yoncafilizi, turplahanası, içme suyu, banyo suyu ve hayvanlarla doğrudan temas enfeksiyon kaynaklarını oluşturmaktadır (Şekil 1.2). Hamburger eti, Kuzey Amerika' da O157:H7 enfeksiyonunun temel kaynağı olarak saptanmasına rağmen Avrupa kıtasında bir etken olarak tespit edilmemiştir (Karch ve ark. 1999). Bulaşma, kişiden kişiye yayılım ile gerçekleşmektedir. O157:H7 için enfektif doz 50-100 adet bakteri olmak üzere çok düşüktür (Tilden ve ark. 1996, Bell ve ark. 1994). İnsanlarda STEC enfeksiyonu sulu ishal, kanlı ishal yada akut böbrek yetmezliği, mikroanjiopatik hemolitik anemive trombositopeni ile karakterize olan hemolitik üremik sendrom(HUS)' a neden olabilmektedir (Karmali ve ark. 1983, Nataro ve Kaper 1998, Welinder-Olsson ve Kaijser 2005). Hemolitik üremik sendrom vakalarında böbreklerin yanı sıra merkezi sinir sistemi, akciğer, pankreas ve kalp gibi diğer organlarda etkilenmektedir. HUS sendromu O157:H7 STEC ile enfekte bireylerin %5 – 10' u arasında görülmektedir (Griffin ve Tauxe 1991). Şiddetli komplikasyonlara ise 5 yaşından küçük çocuklar ve yaşlılar çok duyarlıdır.

Çizelge 1.3. İnsan, sığır, koyun ve diğer kaynaklardan izole edilen non-O157 STEC serotipleri (Anonim 1).

| | | | | |
|---------------------|---------|-------------|---------|---------|
| O1.H- ^a | O6.H28 | O17.H- | O26.H16 | O52.H19 |
| O1.H1 | O6.H34 | O18.H- | O26.H21 | O52.H25 |
| O1.H7 | O6.H49 | O18.H11 | O26.H? | O53.H2 |
| O1.H18 ^b | O6.H? | O18.H12 | O27.H21 | O54.H2 |
| O1.H20 ^c | O7.H- | O18.H15 | O27.H30 | O54.H21 |
| O2.H- | O7.H4 | O18.H? | O28.H4 | O55.H- |
| O2.H1 | O7.H8 | O20.H- | O28.H35 | O55.H6 |
| O2.H5 | O8.H- | O20.H7 | O29.H34 | O55.H7 |
| O2.H6 | O8.H2 | O20.H16 | O30.H12 | O55.H10 |
| O2.H7 | O8.H8 | O20.H19 | O35.H21 | O55.H17 |
| O2.H25 | O8.H9 | O20.K38.H19 | O38.H16 | O55.H? |
| O2.H27 | O8.H11 | O20.H? | O38.H21 | O56.H56 |
| O2.H29 | O8.H14 | O21.K5.H14 | O38.H? | O65.H9 |
| O2.H32 ^d | O8.H16 | O21.H21 | O39.H7 | O65.H14 |
| O2.H39 | O8.H19 | O22.H- | O39.H- | O65.H16 |
| O2.H45 | O8.H21 | O22.H1 | O39.H8 | O65.H48 |
| O2.H? ^e | O8.H25 | O22.H2 | O39.H21 | O68.H- |
| O4.H- | O8.H30 | O22.H5 | O39.H48 | O68.H14 |
| O4.H4 | O8.H35 | O22.H8 | O39.H49 | O69.H- |
| O4.H5 | O8.H49 | O22.H16 | O40.H8 | O69.H8 |
| O4.H10 | O8.H? | O22.H21 | O40.H21 | O69.H11 |
| O4.H21 | O8.Hnt | O22.H40 | O42.H25 | O69.H28 |
| O4.H25 ^f | O9.H- | O22.H54 | O43.H2 | O69.H- |
| O4.H40 | O10.H- | O22.H- | O45.H- | O70.H8 |
| O5.H- ^g | O11.H- | O22.H? | O45.H2 | O70.H11 |
| O5.H10 | O11.H2 | O23.H7 | O45.H8 | O71.H12 |
| O5.H11 | O11.H8 | O23.H15 | O46.H- | O71.HR |
| O5.H27 | O12.H- | O23.H16 | O46.H2 | O73.H34 |
| O5.H? | O14.H- | O25.H- | O46.H31 | O73.H? |
| O6.H- ^h | O15.H- | O25.H2 | O46.H38 | O74.H- |
| O6.K13.H1 | O15.H11 | O25.H14 | O46.H? | O74.H19 |
| O6.H2 | O15.H16 | O25.H21 | O48.H21 | O74.H28 |
| O6.H3 | O15.H27 | O26.H- | O49.H- | O74.H29 |
| O6.H4 | O15.H45 | O26.H2 | O50.H- | O74.H42 |
| O6.K53.H7 | O16.H2 | O26.H11 | O50.H7 | O74.H? |

Çizelge 1.3. İnsan, sığır, koyun ve diğer kaynaklardan izole edilen non-O157 STEC serotipleri (devamı)

| | | | | |
|---------|----------|----------|----------|----------|
| O6.H10 | O16.H21 | O26.H12 | O51.H42 | O75.H- |
| O75.H5 | O88.H8 | O103.H2 | O113.H5 | O121.H10 |
| O75.H8 | O88.H21 | O103.H6 | O113.H19 | O121.H11 |
| O75.H40 | O88.H25 | O103.H7 | O113.H7 | O121.H19 |
| O75.H7 | O88.H49 | O103.H21 | O113.H21 | O123.H- |
| O76.H7 | O89.H- | O103.H14 | O113.H32 | O123.H? |
| O76.H19 | O90.H- | O103.H25 | O113.H53 | O125.H- |
| O76.H21 | O90.H21 | O103.H38 | O113.H? | O125.H14 |
| O76.H25 | O90.H24 | O103.H42 | O113.HR | O125.H26 |
| O76.H? | O91.H- | O103.H? | O114.H4 | O126.H8 |
| O77.H4 | O91.H2 | O104.H- | O115.H10 | O126.H21 |
| O77.H7 | O91.H7 | O104.H2 | O115.H18 | O126.H27 |
| O77.H18 | O91.H10 | O104.H2 | O116.H- | O128.H- |
| O78.H- | O91.H14 | O104.H7 | O116.H10 | O128.H2 |
| O79.H- | O91.H21 | O104.H21 | O116.H21 | O128.H7 |
| O79.H7 | O91.H28 | O105.H18 | O116.H28 | O128.H8 |
| O79.H19 | O91.H40 | O106.H42 | O117.H- | O128.H10 |
| O80.H- | O91.H49 | O107.H27 | O117.H4 | O128.H35 |
| O81.H- | O91.H? | O109.H- | O117.H7 | O128.H45 |
| O81.H26 | O92.H- | O109.H16 | O117.H8 | O129.H- |
| O82.H2 | O93.H- | O110.H2 | O118.H- | O130.H11 |
| O82.H8 | O93.H19 | O110.H16 | O118.H2 | O130.H38 |
| O83.H1 | O95.H- | O110.H19 | O118.H12 | O130.H43 |
| O84.H- | O96.H- | O111.H- | O118.H16 | O131.H2 |
| O84.H2 | O96.H19 | O111.H2 | O118.H30 | O132.H- |
| O84.H8 | O98.H- | O111.H7 | O118.H? | O132.H2 |
| O84.H16 | O98.H25 | O111.H8 | O119.H- | O132.H18 |
| O84.H28 | O100.H- | O111.H11 | O119.H5 | O133.H53 |
| O84.H? | O100.H25 | O111.H21 | O119.H6 | O134.H- |
| O85.H- | O100.H32 | O111.H30 | O119.H8 | O134.H25 |
| O85.H49 | O101.H- | O111.H45 | O119.H25 | O136.H- |
| O86.H- | O101.H4 | O111.H? | O120.H- | O136.H1 |
| O86.H26 | O101.H9 | O112.H2 | O120.H2 | O136.H12 |
| O87.H8 | O101.H14 | O112.H21 | O120.H18 | O136.H16 |
| O87.H16 | O102.H6 | O113.H- | O120.H42 | O136.H19 |
| O87.H31 | O102.H21 | O113.H2 | O121.H- | O136.H20 |

Çizelge 1.3. İnsan, sığır, koyun ve diğer kaynaklardan izole edilen non-O157 STEC serotipleri (devamı).

| | | | | |
|----------|----------|------------|-----------|----------|
| O88.H- | O103.H- | O113.H4 | O121.H7 | O136.H40 |
| O137.H41 | O149.H? | O165.H25 | OX3.H- | OR.H49 |
| O138.H- | O150.H- | O166.H12 | OX3.H2 | O?.H- |
| O138.H2 | O150.H8 | O166.H15 | OX3.H8 | OR.H? |
| O138.H8 | O150.H10 | O166.H49 | OX3.H21 | O?.H1 |
| O138.H14 | O151.H12 | O168.H- | OX3.H43 | O?.H2 |
| O139.H1 | O152.H- | O168.H8 | OX3.H49 | O?.H4 |
| O139.H19 | O152.H4 | O169.H- | OX3.HR | O?.H7 |
| O140.H32 | O153.H- | O169.H? | OX7.H16 | O?.H8 |
| O141.H- | O153.H2 | O170.H8 | OX177.H- | O?.H9 |
| O141.H4 | O153.H8 | O171.H2 | OX178.H7 | O?.H10 |
| O141.H7 | O153.H9 | O171.H25 | OX178.H19 | O?.H11 |
| O141.H8 | O153.H12 | O172.H- | OR.H- | O?.H12 |
| O142.H38 | O153.H19 | O172.H16 | OR.H2 | O?.H13 |
| O143.H- | O153.H21 | O172.H21 | OR.H4 | O?.H16 |
| O144.H2 | O153.H25 | O173.H2 | OR.H7 | O?.H18 |
| O145.H- | O153.H30 | O174.H2 | OR.H8 | O?.H19 |
| O145.H8 | O153.H31 | O174.H8 | OR.H9 | O?.H21 |
| O145.H16 | O153.H? | O174.H21 | OR.H10 | O?.H24 |
| O145.H25 | O156.H- | O175.H16 | OR.H11 | O?.H25 |
| O145.H28 | O156.H7 | O28ac.H21 | OR.H12 | O?.H28 |
| O145.H? | O156.H8 | O28ac.H25 | OR.H14 | O?.H29 |
| O146.H- | O156.H21 | O105ac.H18 | OR.H16 | O?.H32 |
| O146.H1 | O156.H25 | O111ac.H- | OR.H18 | O?.H33 |
| O146.H8 | O156.H27 | O111ac.H8 | OR.H19 | O?.H34 |
| O146.H28 | O156.H46 | O112ab.H2 | OR.H20 | O?.H38 |
| O146.H21 | O156.H? | O112ab.H21 | OR.H21 | O?.H42 |
| O147.H11 | O159.H28 | O112ac.H19 | OR.H25 | O?.H45 |
| O147.H29 | O163.H- | O125ac.H- | OR.H32 | O?.H47 |
| O148.H28 | O162.H7 | O128ab.H- | OR.H34 | O?.H49 |
| O149.H45 | O163.H2 | O128ab.H2 | OR.H38 | O?.HR |
| O149.H10 | O163.H19 | O128ab.H45 | OR.H42 | O?.H? |
| O149.H19 | O165.H- | O128ab.H8 | OR.H47 | |

1.5. STEC' nin Virulans Faktörleri

STEC suşları çok sayıda potansiyel virulans determinantlarına sahiptir (Çizelge1.4). STEC virulansı tek bir gene yada gen ürünlerine bağımlı değildir. STEC virulansının multi-faktöriyel bir süreç olduğu bilinmektedir (Law 2000). Bu patojenler asidik gıdalar ve kirli

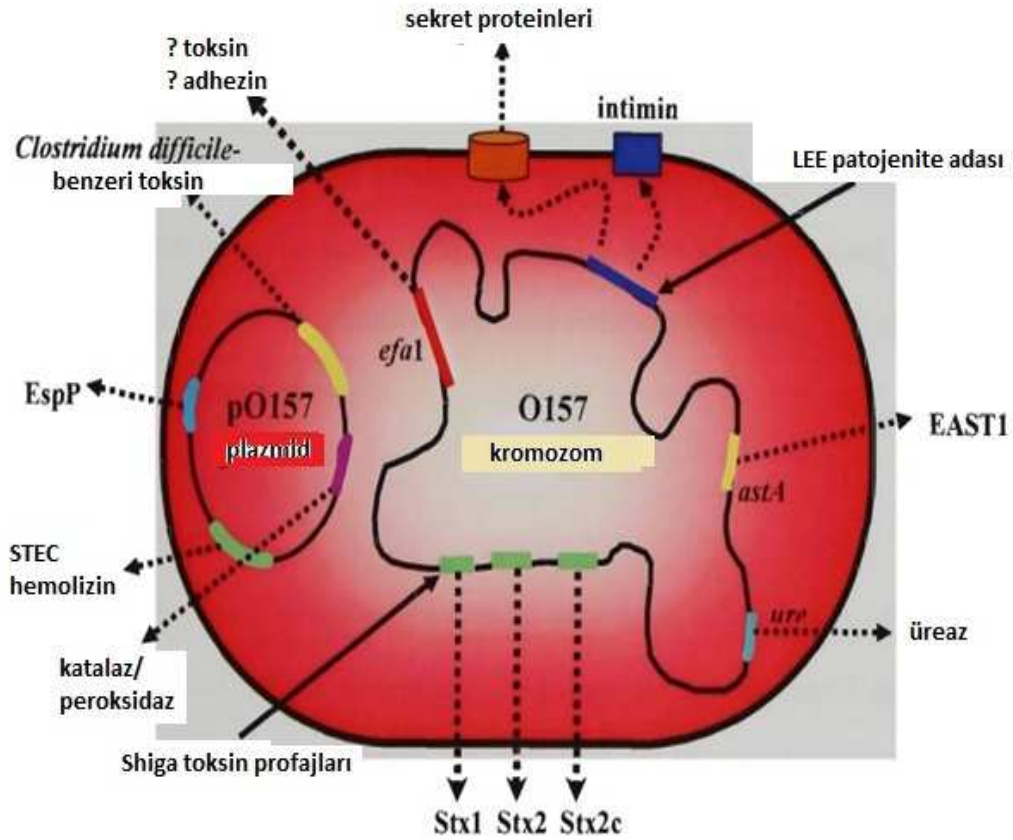
sularda varlığını sürdürmektedir. Ağız yoluyla alınan patojenlerin, midenin asidik ortamı yardımıyla bağırsağa geçişi sağlanmaktadır. İntimin içeren adhezinler yardımıyla bağırsak kolonizasyonu, Shiga toksin üretimi ile STEC patogenezi sağlanmaktadır (Boerlin ve ark. 1999). Fakat intimin negatif STEC suşları, insanlarda hastalık kaynağı olarak bilinmektedir (Paton ve ark. 1999). STEC O157:H7 dışındaki Stx üreten ve intimin ekspresyonunu sağlayan STEC serogruplarının düşük skalada hastalık etkeni olarak görülmemesinin nedeni anlaşılmamaktadır.

Çizelge 1.4. STEC' in virulans ilişkili faktörleri(Ramachandran 2002).

| Protein (Gen) | Taşıdığı bölge | Fonksiyon |
|---|----------------|--|
| Shiga toksin (Stx) | Kromozom | Protein sentezinin inhibe eder (Obrig ve ark. 1987) |
| İntimin (eae) | Kromozom | Adhezyon (McKee ve ark. 1996) |
| Enterohemolizin (ehxA) | Plasmid | Hemaglutinasyon için eritrosit lizisi (Law and Kelly 1995) |
| Enteroagregatif ısı-stabil toksin (astA) | Kromozom | Sodyum klorür absorpsiyonunu uyarıyada inhibe eder (Savarino ve ark. 1991) |
| Katalaz/peroksidaz (katP) | Plasmid | Makrofaj ve nötrofiller tarafından üretilen sitotoksik oksidanları detoksifiye eder (Brunner ve ark. 1996) |
| Ekstraselüler serin proteaz (espP) | Plasmid | İnsan koagülasyon faktör V' in bölünmesi (Brunner ve ark. 1997) |
| <i>Clostridium difficile</i> benzeri toksin | Plasmid | Hücre mimarisi ile ilgili proteinleri değiştirir (Burland ve ark. 1998) |
| Adhezyon için EHEC faktör (efaI) | Kromozom | Adhezyon (Nicholls ve ark. 2000) |
| STEC oto-aglutinasyon adhezinleri (saa) | Kromozom | Adhezyon (Paton ve ark. 2001) |
| Üreaz (ure) | Kromozom | Asidik pH nötralizasyonu (Heimer ve ark. 2002) |
| Tip IV pilus (pil) | Plasmid | Adhezyon ve bakteriyel konjugasyon (Srimanote ve ark. 2002) |

STEC O157 suşlarının sahip olduğu faktörler, diğer non-O157 STEC suşlarında mevcut faktörlere göre daha virulenttir. *E. coli* O157 genomu 1 Mb boyutundadır (Kaper ve ark. 1998b). *E. coli* O157 genomunda stx faj genleri, enterosit yıkımlayan lokus ve pO157 plasmid varlığı nedeniyle *E. coli* K-12 genomundan daha büyüktür. *E. coli* O157:H7 suşunda

bulunan pO157 plazmidini; tip 2 protein sekresyon sistemi, enterohemolizin olarak bilinen bir hemolizin, *Clostridium difficile* benzeri toksin ve katalaz/ peroksidaz içeren yaklaşık 100 genden oluşmaktadır (Şekil 1.3). Patogenezde pO157 faktörünün önemi tam olarak bilinmemektedir. Hastalıkla ilişkili suşlarda pO157 plazmidin yüksek prevalansı, bu plazmidin patojenik STEC suşlarında bir marker olarak kullanıldığını göstermektedir (Beutin ve ark. 1994). Ayrıca O157 genomunda tanımlanamayan genlerde, hastalığın virulansı ve şiddeti ile ilişkilidir. Bu virulans faktörleri, STEC O157 virulansını arttırmaktadır. Şekil 1.3’ de tipik O157:H7 STEC’ in karakteristik virulans ilişkili markerları şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 1.3. Tipik Shiga toksin üreten *E. coli*' nin karakteristik virulans faktörlerinin şematik hali (Robins-Browne 2000).

Non-O157 STEC serotipleri, STEC O157:H7' ye göre daha yüksek oranda enterohemolizin üretimini sağlayan pO157 plazmidine sahiptir (Karch ve ark. 1998). Non-O157 STEC suşlarında bu plazmidin varlığını araştırmak ve non-O157 STEC patogenezindeki rolünü belirlemede diğer plazmid ve kromozom tarafından kodlanan virulans markerlarının prevalansını değerlendirmek için daha ileri çalışmalar yapılması

gerekmektedir. Özellikle Stx ve intimin gibi virulans faktörler, STEC serotiplerinde bulunmaktadır. Virulans faktörlerin karakterizasyonu, insan enfeksiyonlarının bu suşlarla ilişkisini belirlemede önemli bilgi vermektedir.

İnsan enfeksiyonunda, potansiyel virulans faktörlerin ve STEC mekanizmasının rolünün doğrulanmasında önemli zorluklar bulunmaktadır. Uygun hayvan modellerinin eksikliği, patogenezin anlaşılmasını sağlayan çalışmaların yapılmaması, enfeksiyonda görevli virulans faktörler hakkında yeterli bilginin olmaması ve STEC O157:H7 dışındaki STEC suşlarının zayıf karakterizasyonu bu suşlarla ilişkili virulans özelliklerin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır (Law 2000).

Suojala ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2010), spesifik filojenik grupları, virulans genlerini ve antibiyotik dirençlilik durumlarını sığırlarda klinik mastitise yol açan *E. coli* izolatlarında tanımlanmıştır. Toplam 154 *E. coli* izolatından 144 adedi akut hastalık durumunda, 10 adedi ise 3 haftalık olgulardan izole edilmiştir. İzolatların filojenik grupları ve virulans genleri PCR kullanılarak, antimikrobiyel duyarlılıkları ise VetMIC mikrodilüsyon metod kullanılarak belirlenmiştir. 10 adet hayvanda (% 11.8) enfeksiyon kendini tekrarlamıştır. Bu durum da pulsed-field jel elektroforezi ile tedaviden 3 hafta sonraki kontrolde doğrulanmıştır. İzolatların 119 (% 82.6)'ı esas kommensal suşlardan oluşan filojeni grup A içinde yer almaktadır. 56 (% 38.9) izolatın tamamında en az bir virulans geni tespit edilmiştir. *irp2*, *iucD*, *papC* en yaygın virulans genleri olarak saptanırken; *svg*, *stx1*, *stx2*, *cnf1* ve *hlyA* genleri ise bulunmamıştır. Virulans genlerin kombinasyonları büyük ölçüde değişiklik göstermiştir. 144 *E. coli* izolatının 40 (% 27.8)' in en az bir antimikrobiyel direnç gösterdiği test edilmiştir. İncelenen filojeni grupları, virulans faktörleri veya antimikrobiyel direnç özelliklerin hiçbirisinde klinik belirtiler, meme içi enfeksiyonun persistensiyada mastitisin klinik iyileşmesi ile ilişkili bulunmamıştır. Sonuçlar ise, mastitis kaynaklı *E. coli*' nin tipik kommensal olduğunu desteklemektedir.

Kaipainen ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları çalışmada *E. coli* suşlarında 9 adet virulans faktörü geni polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılmıştır. K1 ve K5 kapsül antijenleri spesifik bakteriyofajlar kullanılarak saptanmıştır. 160 adet Fin izolatından % 37 oranında *traT*, % 14 oranında *cnf 2*, % 8 oranında *cnf1*, % 11 oranında *aer*, % 9 oranında *fl7*, % 8 oranında *sfa*, % 7 oranında *pap*, % 1 oranında *afa8D* and % 1 oranında *afa 8E* saptanmıştır. 113 adet İsrail izolatından % 41 oranında *traT*, % 4 oranında *aer*, % 3 oranında *cnf 2*, % 1 oranında

cnf 1, %1 oranında sfa and %1 oranında fl7 genleri saptanmıştır. Serum dirençliliği Fin izolatlarında 94/160 oranında, İsrail izolatlarında 19/113 oranında bulunmuştur. Ayrıca K1 ve K5 kapsüllerine rastlanmamıştır.

Osek ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları çalışmada ise, STEC ve non-STEC suşlarının differansiyasyonu yapılmıştır. Multiplex PCR aşamasında uspA (uspa-PCR) geni kullanılmıştır. Birinci aşamada rfb, enterohemolizin (ehly) ve shiga toksin (stx) genleri sırasıyla 420, 534 ve 230 bp'de belirlenmiştir. İkinci aşamada ise rfb, eaeA, Stx1 ve Stx2 genleri sırasıyla 420, 840, 348 ve 584 bp'de aranmıştır. 202 izolatın hepsinde incelenen genler saptanmış.

Kobori ve arkadaşlarını 2004 yılında yaptıkları çalışmada ise 528 adet mastitisli inek sütlerinden 31 adet *E. coli* suşu identifiye edilmiştir. Bu suşlar Stx1, Stx2 ve eae genleri açısından incelendiğinde 13 adedinden Stx1 geni, 3 adedinden Stx2 geni, 4 adedinden ise hem Stx1 hemde Stx2 geni saptanmıştır. 3 adet suş ise eae geni taşıması açısından pozitif olarak saptanmıştır.

Güler ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı çalışmada; ineklerin klinik mastitis vakalarından izole edilen *E. coli* suşlarında bazı virulans faktör genlerinin araştırılmıştır. Her biri farklı sürülere ait, 2000-2005 yılları arasında izole edilen toplam 100 *E. coli* suşu incelenmiştir. Shiga toxin 1 ve 2 (stx1 ve stx2), intimin (eaeA), heat-stable enterotoxin a (Sta), F5 (K99), F41 ve F17 fimbria'larını kodlayan genlerin tespiti amacıyla iki ayrı multipleks PCR uygulanmıştır. PCR testleri sonucu 9 suş F17 fimbria geni ve sadece 1 suş eaeA geni pozitif bulunmuştur. Sonuçlar klinik inek mastitislerinden izole edilen *E. coli* suşlarında araştırılan potansiyel virulans faktörlerinin hiç birinin yaygın olarak bulunmadığını göstermektedir. İneklerde mastitis vakalarından izole edilen *E. coli* suşları arasında PCR yöntemi ile insanlarda hastalık oluşturma ihtimaline sahip Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) tespit edilmemiştir.

Güler ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı çalışmada ise; buzağılardan izole edilen *Escherichia coli* izolatlarında K99, F41, F17 ile ilgili fimbria, ısı-stabil enterotoksin a (STa), intimin (eae) ve Shiga toksinleri (Stx1 and Stx2) varlığı multipleks PCR aracılığıyla saptanmıştır. Toplam 120 adet *Escherichia coli* izolatının, 75 adeti diyare yada septisemik buzağılardan ve geri kalan 45 adeti ise 1 günlük ila 2 aylık arasında değişen sağlıklı buzağılardan elde edilmiştir. Her bir izolat farklı sürülerdeki farklı buzağılardan izole edilmiştir. Hastalıklı hayvanlardan izole edilen izolatlar arasında, 1 ila 7 günlük ishelli buzağılardan izole edilen 12 izolat K99, F41 ve STa kombinasyonuna sahip enterotoksijenik

E. coli olarak tespit edilmiş; 33 izolat ise F17 ile ilgili fimbria genleri saptanmıştır. Bu izolatlarda K99+F41+STa kombinasyonu bulunmuştur. 120 suşun 16' sısı eae, 8'i Stx1 ve 5'i ise Stx2 genlerini tek başına yada kombine olarak taşımaktadır. eae-pozitif yada Stx-pozitif suşların hiçbirinde O157:H7 tespit edilmemiştir. Ancak sonuçlar, buzağuların insan patojeni potansiyeline sahip Shiga toksini üreten *E. coli* taşıyıcısı olabileceğini göstermektedir. Hastalıklı buzağulardan izole edilen 75 izolatın antimikrobiyel duyarlılığı, 14 antimikrobiyel ajanın kullanıldığı agar disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. İzolatların %77.3 oranında ise multirezistans tespit edilmiştir. Yüksek direnç oranları sırasıyla; sefalotine (%72), tetrasiklin (%69.3), kanamisin (%69.3), ampisilin (%65.3), nalidiksik asit (%53.3), trimetoprim-sulfametoksazol (%52) ve enrofloksasin (%41.3) için tespit edilmiştir. Seftiofur ve sefoksitin için hiçbir direnç saptanmamıştır.

1.5.1. Shiga Toksinler

Shiga toksin (Stx), sadece STEC suşlarını diğer diyarojenik *E. coli* gruplarından ayırmaz, aynı zamanda insan hastalıklarında önemli bir rol oynar. STEC suşları, non-invaziv olup intestinal epitelyal dokulara geçememektedir. Bağırsak lümeninde stx salgılandıktan sonra HC ve HUS gibi sistemik komplikasyonlara neden olmaktadır (Paton ve Paton 1998).

1.5.1.1. Stx Yapısı

Toksinlerin *E. coli* Stx ailesi, Stx1 ve Stx2 olarak adlandırılan 2 büyük antijenik gruba ayrılmaktadır. Stx1, yapısal olarak *Shigella dysenteriae* tip 1 tarafından üretilen Shiga toksinine benzemektedir. Stx2 ise yaklaşık %60 DNA ve amino asit homolojisine sahiptir (O'Brien ve Holmes 1987). Temel A ve B altbirim yapısı, Stx familyasının tüm üyelerinde mevcuttur. Holotoksin, 1 A altbirim ve 5 B altbirimden oluşur. Bu toksin; yapısal olarak toksijenik *Vibrio cholerae* tarafından ifade edilen kolera toksini, enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)' nin ısıya duyarlı toksini ve bitki toksini risingibi toksinlere benzemektedir (O'Brien ve ark. 1992). A altbirimi (32 kDa); toksinin aktif komponenti olup, disülfid bağı ile bağlı A1(28 kDa) ve A2(4 kDa) fragmentlerinden oluşmaktadır. Bu 2 peptidin disülfid bağları, endoplazmik retikulum ve sitosolde proteolitik olarak parçalanmaktadır (Garred ve ark. 1995). A1 peptid enzim aktivitesini sağlarken, A2 peptid ise non-kovalent bağlı pentamerik B altbirimin oluşmasını sağlamaktadır (7.7 kDa boyutundaki monomerler) (Austin ve ark. 1994). B altbirim, toksinin hedef hücre yüzeyindeki spesifik glikolipid reseptörlerine bağlanmasını gerçekleştirmektedir (O'Brien ve Tesh 1992). B altbirimi, β sheets ve α helix

antiparalellerinden meydana gelmektedir. Moleküler modellemede, B altbirimin mutagenezi ve X-ışın kristalografik analizi, her bir B altbiriminin 3 potansiyel karbonhidrat bağlayıcı bölgesini göstermektedir (Nyholm ve ark. 1995, Nyholm ve ark. 1996, Ling 1998, Bast ve ark. 1999). Ayrıca B altbirimleri halka şeklinde pentamer oluşturmaktadır (Richardson ve ark. 1997).

1.5.1.2. Stx reseptörleri

Globotriosil seramid (Gb3), globotetraosil seramid (Gb4) ve P1 (kırmızı kan hücre membranında bulunan glikolipid antijenini içeren bir kan grubu) olarak bilinen membran glikolipidleri, Stx toksinini tanıyan reseptörler olarak tespit edilmiştir (Jacewicz ve ark. 1986, Lindberg ve ark. 1987, Lingwood ve ark. 1987, Bitzan ve ark. 1994). Gb3 içeren P kan glikolipidlerinin yüksek ekspresyonu görülen bireylerde düşük oranda HUS sendromu ardından da STEC enfeksiyonu gözlemlendiği bilinmektedir (Taylor ve ark. 1990). Çeşitli glikolipid reseptörleri, değişken uzunluktaki yağ asitlerini taşıyan bir seramid omurgasına bağlı kısa karbonhidrat zincirlerinden oluşur. Gb3 yağ asidi zinciri ve fosfolipid bilayer zincirinin uzunluğu, Gb3 içinde globotriozoligosakkaritbenzer parçaların toksin bağlayıcı etkilerini göstermektedir (Boyd ve ark. 1994, Kiarash ve ark. 1994, Arab ve Lingwood 1996).

Çeşitli hücre tipleri arasında Stx reseptörlerinin dağılımı, hastalık patogenezisinde önemli bir role sahiptir (Lingwood 1996). Endotelial hücreler, Stx'in ilk hedefidir (Paton ve Paton 1998). Mikrovasküler endotelial hücreler (insan böbreği) ve intestinal endotelial hücreler Stx toksinine karşı oldukça duyarlıdır (Tesh ve ark. 1991, Obrig ve ark. 1993, Louise ve Obrig 1995, Jacewicz ve ark. 1999). Stx reseptörlerinin farklı düzeylerdeki ekspresyonu, toksinin daha düşük sensitivitesine neden olabilmektedir (Obrig ve ark. 1993). Gb3, intestinal ve renal epitelyal hücrelerinde yer almaktadır. Yüksek düzeyde Gb3 ekspresyonu, insan böbrek dokularında gözlenmektedir (Boyd ve Lingwood 1989).

Son zamanlarda Vero hücrelerinde Gb3 eksikliği ile ilgili çalışmalarda, Stx toksininin bağlandığı bir pattern oluşturulmuş ve bir membran proteini reseptörü tespit edilmiştir (Devenish ve ark. 1998). Fakat bu protein reseptörünün rolü tam olarak bilinmemektedir. Platelet (trombosit) ve lipoproteinler; Stx toksininin bağlanması ve transportu için diğer olası adaylardır (Chatterjee ve Kwiterovich 1984, Cooling ve ark. 1998). Son zamanlarda, insan polimorfonükleer lökositlerine stx bağlanmasının ve bağlanmadan sorumlu reseptörün, endotelial hücrelerinde bulunan Gb3' den farklı olduğu görülmektedir.

1.5.1.3. Virulansın Regülasyonu

Virulans genlerin regülasyonu, bakterilerin doğru yerde, doğru zamanda ve uygun koşullar altında çeşitli virulans faktörlerinin yerleşimini sağlamak için oldukça önemlidir. LEE ve Shiga toksini gibi 2 önemli virulans faktörü hakkında araştırmalar yapılmaktadır.

LEE genlerin regülasyonu, birçok nonLEE ve LEE kodlayan regülatörleri içeren oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. NonLEE-kodlayan regülatörler; bir reseptör olan H-NS ve aktivatör işlevi gören IHF' yi içermektedir (Barba ve ark. 2005). Quorum-sensing *E. coli* regülatör A, quorumsensing ile LEE genlerini aktivasyonunu sağlar (Clarke ve Sperandio 2005). LEE tarafından kodlanan regülatörler, H-NS benzeri transkripsiyonel regülatör **Ler** (LEE-encoded regulator) ve GrlA (global regulator of LEE activator)' dır. Ler ve GrlA pozitif regülasyonu sağlamaktadır. Ler regülatörü, GrlA'nın ifadesi için oldukça gereklidir. Ler ve GrlA ise H-NS aracılı represyona neden olmaktadır (Barba ve ark. 2005).

Quorum-sensing regülasyonu, son zamanlarda birçok araştırmaya konu olmuştur (Clarke ve Sperandio 2005). Enterohemorajik *E. coli*, bağırsak ortamını tanımak ve kolonizasyon için gerekli genleri aktive etmede quorum-sensing regülatör sistemini kullanmaktadır (Sperandio ve ark. 2003, Walters ve Sperandio 2006). Bu araştırmacılar kalınbağırsakta AI-3 molekülünün otoindükleyici olarak epinefrin ve norepinefrin ile birlikte salgılandığını ve kolonizasyona sebep olduğunu bildirmişlerdir. Kolona girişi gerçekleştirmek için EHEC bakterilerinin çoğu AI-3 kullanmaktadır (Kaper ve Sperandio 2005). Flagella kodlayan genler AI-3/epinefrin sistem tarafından düzenlenmekte ve bakterilerin epitelyum hücrelere hareketini sağlamaktadır.

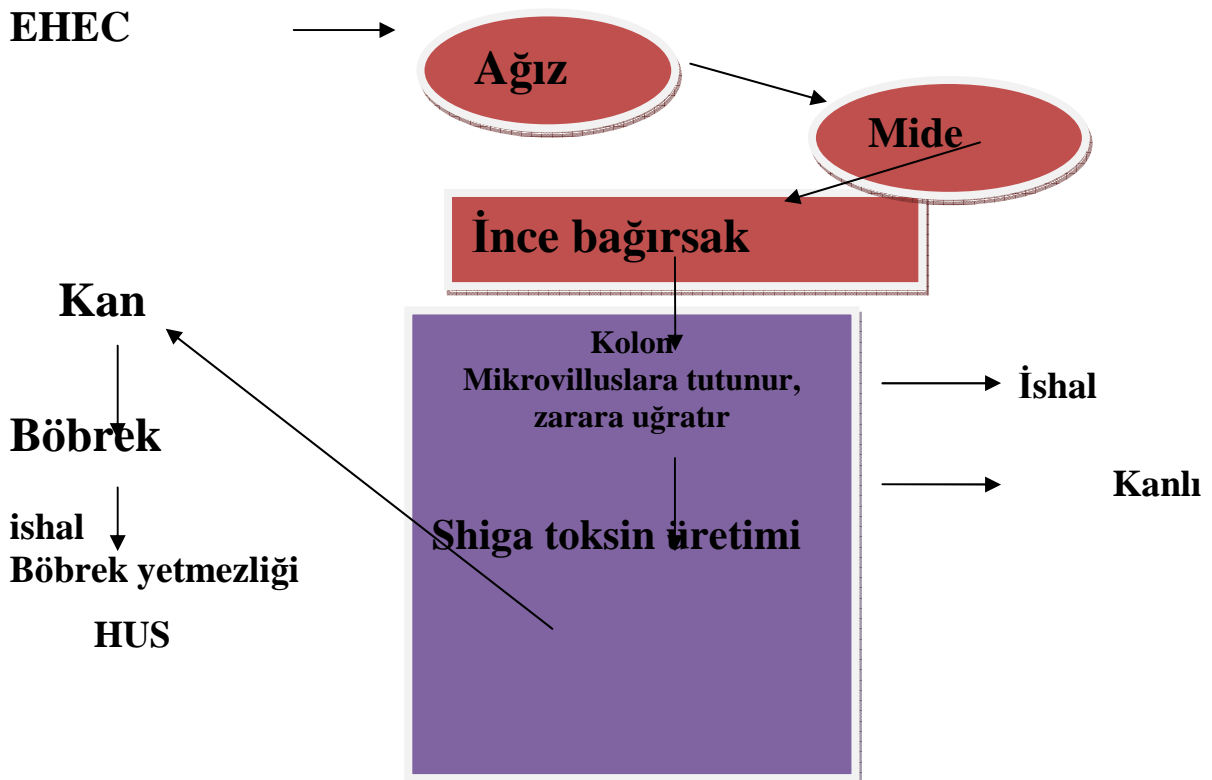
Stx genleri, farklı lizojenik lambdoid fajların gen bölgelerinde lokalize olmaktadır ve litik faj aktif hale geldiğinde ifade edilmektedir (Herold ve ark. 2004, Tyler ve ark. 2004, Wagner ve ark. 1999, 2001b, 2002). Fajlar; gen kopya sayılarının amplifikasyonu ile Stx üretimini, faj gen promotorlarının aktivitesini ve Stx salınımını düzenlemektedir. Stx fajların indüksiyonu sağlayan faktörler hakkında çok az bilgiye sahip olunmasına rağmen insan nötrofillerin EHEC bakterileri tarafından Stx üretimi ile meydana geldiği bilinmektedir (Wagner ve ark. 2001a). Stx1 genleri demir konsantrasyonu tarafından düzenlenmektedir. Toksin sentezi ise yüksek demir konsantrasyonu tarafından baskılanmaktadır. In vitro olarak toksin üretimi, O157:H7 STEC enfeksiyonuna bağlı hastalık belirtilerinin şiddeti ile ilişkilidir

(Muniesa ve ark. 2003). Toksin üretimi ve adhezyon arasında karmaşık bir etkileşim görülmektedir. Son zamanlarda doku kültürü çalışmalarında O157:H7 EHEC adhezyonunun artışı, stx üretiminde de artışa neden olmaktadır.

1.5.1.4. Stx internalizasyonu

1.5.1.4.1. STEC' in İntestinal Kolonizasyonu

Tüm enterik *E. coli* enfeksiyonlarında süreç, bağırsak kolonizasyonuna ve toksin hasarına dayanmaktadır. EHEC için hastalık süreci hakkında genel bir bakış **Şekil 1.4'** de verilmiştir. Kolonizasyon, STEC suşlarının konak savunma mekanizmasını yenerek bağırsak yapısına yerleşmesi işlemidir. Gastrik asit, gastrointestinal sistemde önemli bir konak savunma mekanizmasıdır. Fakat asit direnci *E. coli* (Fukushima ve ark. 2000, Large ve ark. 2005), *E. coli* O157 (Murinda ve ark. 2004) ve diğer STEC serotiplerinin (Large ve ark. 2005) genel bir özelliğidir. O157:H7 STEC serotipi; elma suyu ve salam gibi asidik gıdalarda canlılığını sürdürmekte ve insanlarda hastalığa neden olmaktadır (Bell ve ark. 1994, Tilden ve ark. 1996). Fakat bu serotip içinde değişiklikler gözlenmektedir. Zayıf asidik ortamlara maruz kalan suşlarda asit tolerans yanıtı azalırken, daha asidik pH ise direnci arttırmaktadır (de Jonge ve ark. 2003).



Şekil 1.4. Enterohemorajik *E. coli*'nin insanlarda oluşturduğu hastalığa genel bir bakış (Gyles 2007).

İntestinal epitelyum hücrelerine tutunma STEC enfeksiyonunun en önemli özelliğidir. STEC ve epitel hücreleri arasındaki etkileşim eae pozitif ve eae negatif STEC suşları arasında farklılık göstermektedir. Eae-pozitif STEC suşları, bağırsak epitelyum hücrelerindeki karakteristik AE lezyonları üzerinde bulunmaktadır (Nataro ve Kaper 1998, Kaper ve ark. 2004). AE lezyonları insanlarda görülen kanlı ishal ve HUS için önemli bir faktör olmamasına rağmen bu sendromlardan sorumlu suşların büyük çoğunluğu eae genine sahip olmaktadır. Böylece EHEC suşlarının çoğu eae-pozitif olarak tanımlanmaktadır ve eae geni hemolitik üremik sendrom vakalarında önemli bir risk faktörü olarak ifade edilmektedir (Ethelberg ve ark. 2004).

Eae-pozitif STEC suşları, AE lezyonun oluşumu için gerekli bakteriyel proteinleri kodlayan enterosit bağlayıcı lokus (LEE) olarak adlandırılan bir patojenite adasına sahiptir. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) LEE olarak adlandırılan patojenite adası ve EPEC enfeksiyonuna yanıt olarak AE lezyonlarının gelişimi arasındaki benzerlikler STEC ile ilgili benzer olayların anlaşılmasını sağlamaktadır (Finlay ve ark. 1996, Barba ve ark. 2005, Spears ve ark. 2006). LEE; LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 ve LEE5 olarak adlandırılan 5 temel polisistronik operonlardan meydana gelmektedir. LEE operonlarının ürünleri tip III sekresyon aparatları (LEE1, LEE2 ve LEE3), protein translokasyon sistemi (LEE4), adhezyon sisteminden oluşan ve intimin yada eae adı verilen dış membran proteini ve reseptörü, yerleşik intimin reseptörü (TIR), bu reseptörleri kodlayan LEE5 ve sekresyon sisteminde yerleşen efektör proteinlerdir. Salgılama aparatı, bakteri sitoplazması içinde başlayıp iç ve dış membrana yayılarak konak hücre membranına geçebilen şırınga benzeri moleküler bir yapıdır. Salgılanan proteinler bakteriyel sitoplazmadan konak hücreye iletilmektedir. LEE tarafından kodlanan salgı proteinlerini Tir, mitokondriyon-bağımlı protein, EspF (*E. coli* secreted protein F), EspG, EspH ve EspZ içermektedir. NonLEE kodlayan proteinlerin çoğu LEE salgılama aparatı tarafından yerleştirilmektedir (Barba ve ark. 2005). TIR proteini, konak hücre zarının içine yerleşmekte ve bakteriyel yüzeyde intimin geni için reseptör olarak davranmaktadır. TIR ve diğer salgılanan proteinler belirli sayıda uyarıcı aktive etmekte ve hücre fizyolojisindeki intestinal epitelyum hücrelerin yeniden yapılanmasında rol oynamaktadır.

NonLEE tarafından kodlanan salgı proteini olan EspJ, bir antivirulant faktör olarak ifade edilmektedir. Bu proteinin silinmesi, kuzu ve farelerde deneysel olarak daha uzun süre hayatta kaldığını göstermiştir ve patojen geçişi ile konakçı hayatı açısından ilişki bulunduğu saptanmıştır (Dahan ve ark. 2005).

Tir bağlantılı molekülün C-terminal bölgesinde heterojenite ile ilişkili en az 17 intimin tipi ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2/\theta$, δ/κ , ϵ , ζ , η , $\eta 2$, ι , λ , ν , ξ , \omicron ; Garrido ve ark. 2006) vardır (Blanco ve ark. 2004b, Krause ve ark. 2005). Bu intimin türevleri, insan ve hayvan kökenli STEC ve EPEC suşları arasında dağılmaktadır. $\gamma 1$ intimin, O157:H7 ve O145:H- gibi patojenik STEC serotipleri ile ilişkilidir (Blanco ve ark. 2005, Rivas ve ark. 2006). EaeO157'nin EPEC suşlarında yer değiştirmesi, O157:H7'nin modifiye olmasına ve gnotobiyotik domuzlarda deneysel enfeksiyonların şekillenmesine yol açmıştır (Tzipori ve ark. 1995). Buna karşılık O157:H7 STEC suşları kolonda kolonize olmaktadır. Bu çalışmada Tir reseptörünün bazı konak hücre yapılarına bağlandığı ileri sürülmektedir. Frankel ve ark.(1996) EPEC suşlarında bulunan intimin geninin beta-1 integrinlere bağlı olduğunu göstermektedir. Son zamanlarda Sinclair ve O'Brien (2002, 2004) EHEC O157:H7 serotipinde bulunan Tir reseptörünün HEp-2 hücrelerindeki nükleoline bağlandığını ve nükleolin ile Tir arasında bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Daha yakın zamanlarda ise Sinclair ve ark. (2006) nükleolin ve beta-1 integrin' in domuz ile buzağılarda enfeksiyona neden olan EHEC O157:H7 ile yakın ilişkili olduğunu saptamıştır.

AE lezyonu, konak hücre yüzeyindeki bakterilerin adhezyonunu ve epitelyum hücrelerdeki yapısal değişiklikleri içermektedir. Bu yapısal değişiklikler; mikrovillusların kaybını, formasyon bozukluğunu ve hücreye tutunan bakterilerin altında sitoskeletal proteinlerin birikimini içermektedir.

Eae-negatif STEC suşlarının adhezyonu hakkında oldukça az bilgi bulunmaktadır. Dytoc ve ark. (1994) epitel hücrelerde (HEp-2) çoğalan ve tavşan bağırsağında in vivo olarak canlılığını sürdüren eae-negatif STEC suşlarının O113:H21 serotipini incelemiştir. Sonuçta, mikrovillusların etkilendiği, fakat enterik lezyonların sitoskeletal formasyonu bozacak şekilde gelişmediği ortaya çıkmıştır.

STEC suşları, enterositlerin invazyonunu sağlamaktadır. Fakat enfeksiyonun lokalizasyonunda septiseminin etkisi görülmemektedir. Sistemik etkiler öncelikle toksin varlığı ile ilişkilendirilmektedir.

Paton ve ark. 1997 yılında yaptığı bir çalışmada, STEC suşlarının in vitro koşullardaki adhezyon derecesinin hastalık oluşturma yeteneği ile ilişkili olabileceği fikrini desteklemiştir. Mettwust sosisi nedeniyle hasta olan ve sağlıklı olan bireylerde STEC suşlarının Henle 407 hücrelerindeki bağlanma oranı karşılaştırılmış ve Henle 407 hücrelerine olan bağlanma oranının, STEC salgınından kurtulan hastalarda görülen HUS olgularına göre daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur. Sporadik HUS hastalarından izole edilen STEC suşları ile enfeksiyonlu hastalardan izole edilen STEC suşları karşılaştırıldığında adhezyon dereceleri arasında bir farklılık bulunmamaktadır. Fakat HUS hastalarından izole edilen suşların adhezyonu insan dışındaki kaynaklardan izole edilenlere göre daha fazla olmaktadır.

Enfeksiyon, bakterinin su ve gıda yoluyla alınmasıyla başlar. EHEC'in aside dirençli olması düşük pH seviyelerinde yaşamasına olanak sağlamaktadır. Bakteri ince bağırsaklarda bulunurken, virulans genleri çevresel sinyallerle birlikte kolonda aktif hale gelmektedir. EHEC, kolon enterositlerine sıkıca bağlanır. Mikrovilluslarda hasara ve diyareye yol açar. Eğer yeterli shiga-toksini üretilirse kan damarlarındaki lokal hasarla birlikte kanlı ishal görülür. Eğer kan dolaşımına toksin katılırsa vasküler endothelyal bölgelerdeki reseptörler zarar görür, fonksiyon bozuklukları ortaya çıkar. Böbrekler ve merkezi sinir sistemi bölgeleri sıklıkla etkilenir. Bunun sonucunda hemolitik üremik sendrom (HUS) gelişebilir.

1.5.1.5. Stx ve İmmun Yanıt

1.5.1.5.1. İnflamasyon = Yangı

İnflamasyon, STEC O157:H7 ile ilişkili bağırsak enfeksiyonlarının belirgin özelliğidir. H7 flagellin, inflamasyonun meydana gelmesini sağlayan önemli bir etkidir (Berin ve ark. 2002, Miyamoto ve ark. 2006). Berin ve arkadaşları (2002); 2 insanda kolon epitelyal hücrelerde EHEC tespit etmiş ve p38 ile ERK MAP kinaz aktivasyonu, ayrıca NF-kappa hücrelerinin yer değiştirmesi sonucu ofmRNA ve interlökin 8(IL8) miktarının arttığını bildirmişlerdir. Benzer sonuçlar, izogenik eae ve stx-mutantlar ile EHEC bakterisinde bulunan H7 flagellin ile ilgili çalışmalardan elde edilmiştir. Araştırmacılar tarafından H7 flagellin faktörünün insan kolon epitel hücrelerinin proinflamatuvarsinyallerinin aktivasyonunda önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Miyamoto ve arkadaşları (2006) tarafından proinflamatuvar sitokinlerin regülasyonu rapor edilmiştir ve subepitelyal nötrofillerin varlığı, insan kolon ksenograf lümenindeki O157:H7 flagellinde gözlenmektedir. Flagellin, NF-kappaB

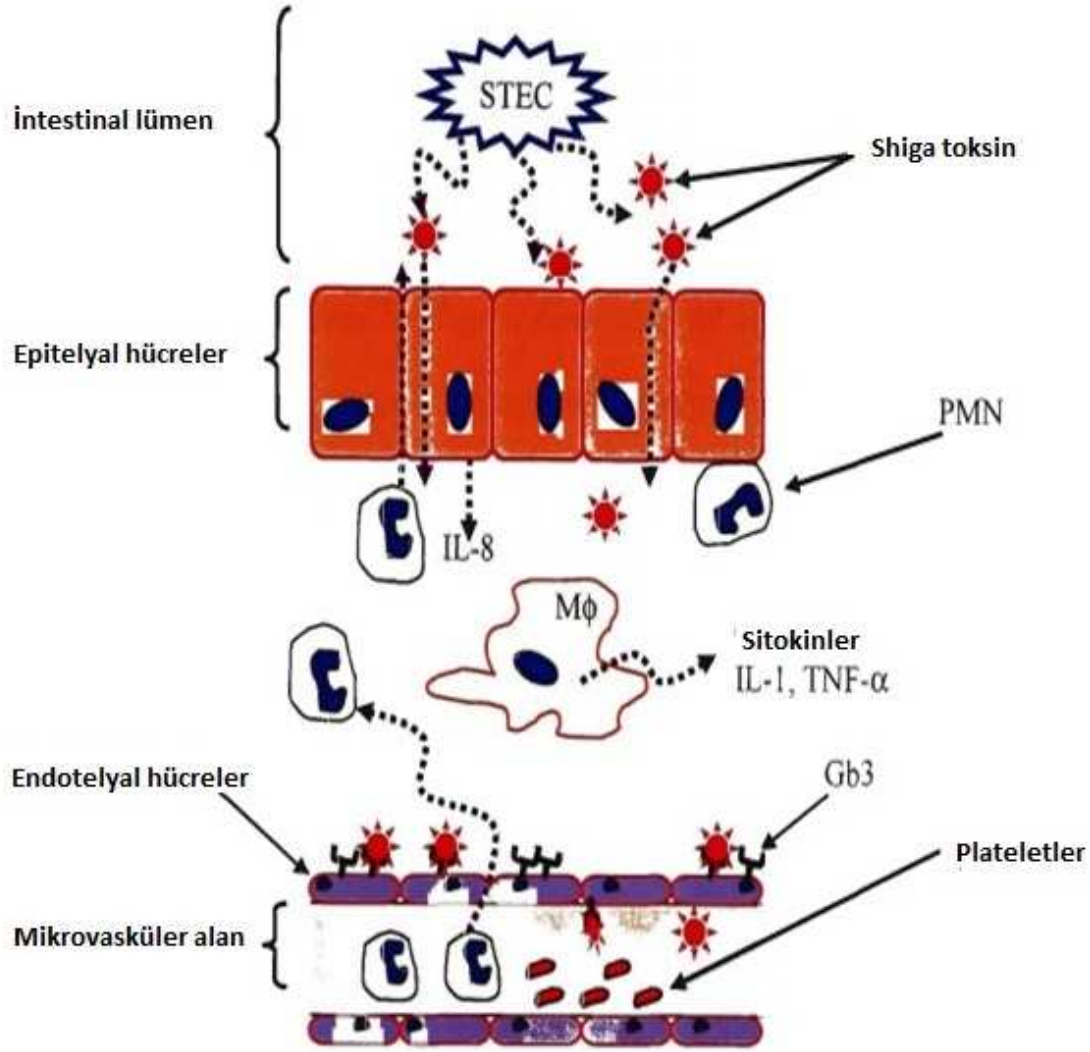
aktivasyonunu sağlayan Toll-benzeri reseptör 5' e bağlanır ve IL-8 sekresyonunu gerçekleştirir. Aynı zamanda shiga toksini, insan kolon epitelyum hücresi tarafından IL-8 üretimini gerçekleştirmektedir (Thorpe ve ark. 1999, Yamasaki ve ark. 1999). İnflamasyon, intestinal epitelyal bariyer fonksiyonunu bozmakta ve böylece lümeden submukozal alana stx toksininin geçişini kolaylaştırmaktadır (Hurley ve ark. 2001).

İnflamatuvar yanıt, bağırsak boyunca etkili olmakta ve HUS sendromlu hastaların idrarlarında yüksek miktarda IL-8 ve monositkemoatraktanprotein1 bulunmaktadır (van Setten ve ark. 1998). Guessous ve ark. (2005) insan mikrovasküler endotel hücrelerini istila eden Stx2 varlığını ve IL-8 içeren kemokinlerin LPS içindeki serbest konumunu bildirmiştir. Guessous ve arkadaşlarının bulguları trombosit aktivasyonunun Hus vakalarında böbrek tromboza neden olduğu görüşünü desteklemektedir. Daha yakın bir zamanda Stahl ve ark. (2006) O157 LPS'lerin HUS sendromu gelişmeyen hastalarda yüzey proteinlerinden platelet aktivasyonu ile saptanabildiğini bildirmişlerdir. O157 EHEC enfeksiyonunun erken evresinde LPS absorpsiyonu, doğrudan trombositlerin aktivasyonuna yada endotel hücrelere ardından da trombositlere bağlanarak trombosit tüketimine neden olabilmektedir. Stx ve diğer bileşikler yardımıyla trombosit aktivasyonu yada endotel hücre hasarı, HUS sendromunda gözlenen trombositopeni ve trombotik olaylara katkı sağlayabilmektedir. Ancak inflamatuvar yanıt, diğer EHEC ürünleri tarafından yönetilmektedir. HeLa hücrelerinde NF-kappaB' nın DNA' ya aktif bağlanması STEC suşlarının varlığı ile engellenmektedir (Hauf ve Chakraborty 2003). NF-kappaB aktivasyonunun bastırılması için STEC suşları tarafından salgılanan EspB' ye gerek duyulmaktadır. Araştırmacılar, basal ve signal-induced NF-kappaB DNA binding baskılanmasının, attaching-effacing indükleyici bakterilerin bir özelliği olduğu sonucuna varmışlardır.

Saflaştırılmış stx, in-vitro koşullarda makrofajlar yardımıyla tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve interlökin (IL)-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonuna neden olmaktadır (van Setten ve ark. 1996, Ramegowda ve Tesh 1996). Radyoaktif toksin bağlayıcı çalışmaları ve ince tabaka kromatografi teknikleri kullanan van de Kar ve arkadaşları(1992); bu inflamatuvar faktörlerin, stx toksisitesine karşı yüksek duyarlılıkta vasküler endotel hücreler tarafından Gb3 ekspresyonunu düzenlediğini bildirmiştir. TNF- β ve bakteriyel lipopolisakarit (LPS), Gb3 ekspresyonuna ve insan endotel hücrelere Stx toksininin bağlanmasını gerçekleştirmektedir (van der Kar ve ark. 1992). Bu veriler, toksine karşı konakta oluşan sitokin yanıtının HUS patogenezinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Stx, epitelyum

hücrelerinde kemokin ekspresyonunu gerçekleştiren güçlü bir indükleyicidir ve lamina propria ve böbreklerde PMN infiltrasyonunu tetikleyebilir (Thorpe ve ark. 1999). İnterlökin-8 (IL-8), güçlü bir seçici aktivatör ve PMN' nın bir kemoatraktant' dır (Walter ve ark. 1989). Polarize intestinal epitelyal hücelere (IEC) nötrofil göçünün, in vitro koşullardaki IEC bariyer fonksiyonu ile azaltıldığı görülmektedir (Nash ve ark. 1987).

Hurley ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada polarize IEC hüceleri boyunca nötrofil göçünün bazolateral bölgeden apikal bölgeye doğru olması parasellüler bölgede stx translokasyonunu arttırdığı görülmektedir (şekil 1.5). Bağırsakta inflamasyon derecesi, temeldokuya Stx kazanımına katkıda bulunabilir. Bağırsakta T-hücre aktivasyonu, ishal aşamasından HUS sendromuna kadar hastalık gelişiminde önemli bir olaydır (Heyderman ve ark. 2001). Bu hipotez, aktive T hücelerinin bağırsaklardan lenfatik sisteme göçü olayına dayanmaktadır (Heyderman ve ark. 2001). İnsan serebral endotelyal hücelerde Stx' in sitotoksik etkisi, TNF- α ve IL-1 β gibi inflamatuvar mediatörler yardımıyla artmaktadır ve böylece merkezi sinir sisteminde hasara yol açmaktadır (Ramegowda ve ark. 1999). Genel olarak Stx toksisitesi, toksin indükleyen inflamatuvar mediatörlerin salınımı ile artış göstermektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Shiga toksin kaynaklı inflamatuvar yanıtın şematik hali (Yangı oluşumu) (STEC' in vücut içine alındıktan sonra bağırsaklarda Stx toksininin salınımı. Stx polarize epitelyum hücreleri arasında dolaşır. Dolaşımında olan Stx, submukozal immunositlerde yangısal mediatörlerin dokularda artışına yol açar. Ayrıca Stx, epitelyal hücrelerin reseptörlerine bağlanır ve platelet hücreleri mikrovasküler tromboza yol açar. Nötrofillerde bazal membrandan apikal membrana göç ederler. Stx, epitelyal hücrelerde interlökin 8(IL8) üretiminde artışa yol açıp yangısal sitokinler (proinflamatuvar) ve makrofajların artışına yol açar). Bu yangısal mediatörler; Gb 3=globotriaosil seramid, interlökin=IL, makrofaj=Mφ, polimorfnükleer lökosit=PMN, tümör nekrozis faktör=TNF (O'Loughlin ve Robins-Browne 2001).

1.5.1.6. Stx1 ve Stx2' nin subtipleri

1.5.1.6.1. Stx1

Stx1 ve Stx2 kodlayan genlerin analizi, Stx1 ve Stx2 subtiplerinin nükleotid ve amino asit sekanslarındaki farklılıkları ortaya koymaktadır. Stx1, *Shigella dysenteriae* tarafından üretilen sht toksini ile yakın ilişkilidir. Stx1 ile sht arasındaki tek farklılık nükleotid sekansında gözlenmektedir (Strockbine ve ark. 1988, Kozlov ve ark. 1988). Paton ve arkadaşları (1993-1995); insan ve hayvanlardan izole edilen STEC suşlarının O48:H21(stx₁₀₄₈), O111:H-(stx_{1CB}, stx_{1PH}) ve OX3:H8(stx_{1OX3}) serotiplerinde yer alan stx₁ geninin 4 varyantını belirlemiştir. Bu varyantlar, E.coli faj-kodlayan stx₁ geni stx_{1933-J} ile karşılaştırıldığında sht genine daha yakındır (Paton ve ark. 1993, Paton ve ark. 1995).

1.5.1.6.2. Stx2

Stx₁'in aksine, Stx₂'de önemli sekans varyasyonları bulunmaktadır. Bu varyasyonlar sekansların homolog olması ve immunolojik kros reaksiyonlarına bağlı olmaktadır. HUS sendromu, kramp, ani ölüm ve diyare gözlenen hastalardan izole edilen STEC suşlarında 14 farklı stx₂ varyantı belirlenmiştir (Çizelge1.5). En yaygın Stx2 varyantları; Stx_{2c}, Stx_{2d}ve Stx_{2e}' dir (Pierard ve ark. 1998, Schmitt ve ark. 1991, Weinstein ve ark. 1988). Stx_{2e} domuzlarda görülen ödem hastalığı ile ilişkili bulunmuş ilk Stx₂varyantıdır (Weinstein ve ark. 1988).

Çizelge 1.5. Stx₂ gen ailesinin varyantları, orijini ve ilişkili hastalığı (Ramachandran 2002).

| Varyant | Serotip/Serogrup | İlişkili sendrom yada orijin | Referans |
|-----------|------------------|------------------------------|----------------------|
| Stx2 | O157:H7 | HUS | Datz ve ark. 1996 |
| Stx2c | O157:H- | HUS | Schmitt ve ark. 1991 |
| Stx2-O113 | O113:H21 | HUS | Paton ve ark. 1999 |
| Stx2-O48 | O48:H21 | HUS | Paton ve ark. 1995 |

| | | | |
|------------|----------|----------------------|------------------------|
| Stx2vh-a | O91:H21 | HUS | Ito ve ark. 1990 |
| Stx2vh-b | O91:H21 | HUS | Ito ve ark. 1990 |
| Stx2d-OX3a | OX3:H21 | Ani bebek ölümü | Paton ve ark. 1992 |
| Stx2d-OX3b | OX3:H21 | Ani bebek ölümü | Paton ve ark. 1993 |
| Stx2d-O111 | O111:H- | HUS | Paton ve ark. 1993 |
| Stx2d-Ount | Ount:H21 | Karın krampları | Pierard ve ark. 1998 |
| Stx2e | O139:H1 | Domuz ödem hastalığı | Weinstein ve ark. 1988 |
| Stx2ev | O128:B12 | İshal | Gannon ve ark. 1990 |
| Stx2f | O128:H2 | Yabani güvercin | Schmidt ve ark. 2000 |
| Stx2-NV206 | O6:H10 | Sağlıklı sığır | Bertin ve ark. 2001 |

1.5.1.7. Stx1 ve Stx2' nin toksisitesi

Yapısal olarak birbirine benzeyen Stx1 ve Stx2' nin toksisite oluşumunda farklılıklar vardır. Epidemiyolojik çalışmalar, Stx2 üreten STEC suşlarının HUS sendromu gibi ciddi insan hastalıklarına neden olduğunu göstermektedir (Ostroff ve ark. 1989, Kleanthous ve ark. 1990, Boerlin ve ark. 1999).

İnsan-böbrek mikrovasküler endotelial hücrelerin, Stx2' nin sitotoksik etkisine karşı duyarlılığı Stx1' in etkisine göre daha fazladır (Louise ve Obrig 1995). Jacewicz ve arkadaşları(1999); insan intestinal mikrovasküler endotelial hücreler için Stx2' nin Stx1' e göre daha toksik olduğunu bildirmiştir. Bazı Stx2 varyantları (Stx_{2c}), proteolitik enzim yardımıyla aktif hale gelebilmektedir (Melton-Celsa ve ark. 1996). Sadece Stx1 üreten STEC suşları, HUS sendromlu hastalarda bulunmaktadır (Willshaw ve ark. 1992, Gyles ve ark. 1998).

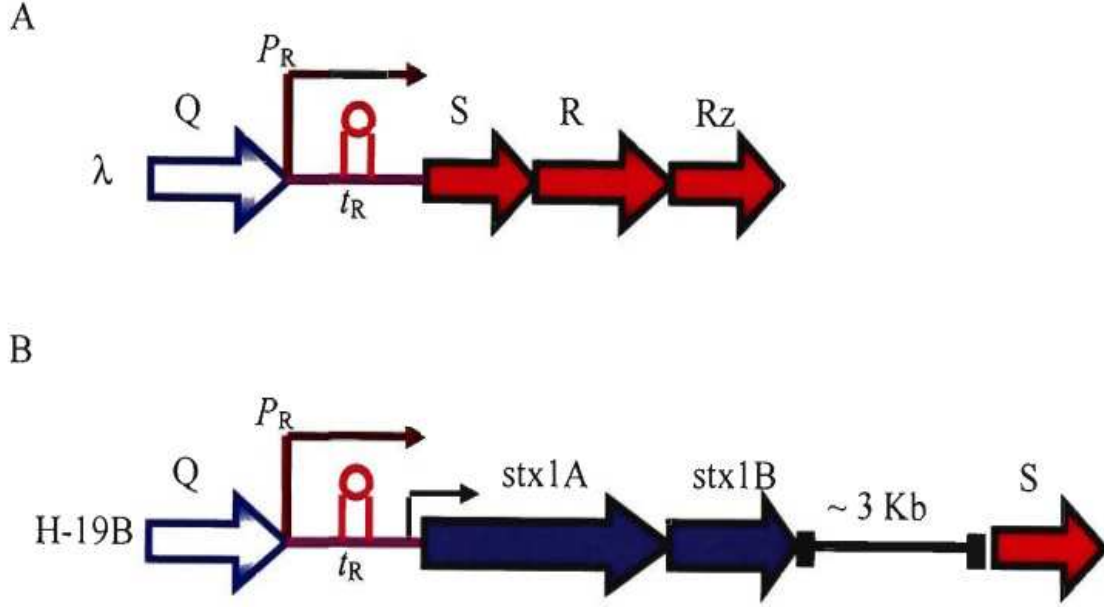
Bazı STEC suşları birden fazla Stx2 varyantı taşıyabilmektedir (Ito ve ark. 1990, Schmitt ve ark. 1991). Bu yüzden dolayı her varyant için relatif virulans dağılımının belirlenmesi zor olmaktadır. Birçok Stx2 varyantı arasında A yada B subbirimindeki amino asit değişiklikleri bakımından farklılıklar gözlenmektedir (Paton ve Paton 1998). Bu farklılıklar, enzimatik aktivitesi yada reseptöre bağlanma kapasitesi üzerinde etkilidir.

1.5.1.8. Stx-dönüşen bakteriyofaj

Shiga toksinlerini (Stx1 ve Stx2) kodlayan yapısal genler, lambdoid fajların genomunda lokalize olmaktadır (Schmidt 2001). *Shigella dysenteriae*' da bulunan Sht geni ise kromozomda kodlanmaktadır. *S. dysenteriae* tip 1' in shtA geninde insersiyon elementleri saptanmıştır (Unkmeir ve Schmidt 2000). Stx1-dönüşen faj H-19B (STEC O26:H11' den izole edilen), Stx2-dönüşen faj 933W (STEC O157:H7' den izole edilen), faj VT2-Sakai (STEC O157:H7' den izole edilen), faj VT1-sakai (STEC O157:H7' den izole edilen) (Makino ve ark. 1999) ve Stx2e-dönüşen faj ϕ P27 (STEC Ont:H-)(Recktenwald ve Schmidt 2002) tespit edilmiştir. Hekzagonal baş ve kuyruktan oluşan bakteriyofajlar, benzer morfolojiye sahiptir.

Stx genlerini taşıyan bakteriyofajlar, *E. coli* popülasyonu ile ilişkili virulans genlerin transferi horizontal olarak gerçekleşmektedir (Cheetham ve Katz 1995). Muniesa ve Jofre(1998) tarafından yapılan çalışmada Stx2 taşıyan bakteriyofajların kanalizasyon sularında izole edildiği bildirilmiştir. Stx kodlayan bakteriyofajlar, çeşitli STEC popülasyonlarındaki Stx genlerinden meydana gelmektedir. Son zamanlarda tip IV pilus (pil), HUS salgısına neden olan STEC O113:H21 suşunun büyük plazmidinde saptanırken, pilin homologları ise birçok STEC suşlarında bulunmaktadır (Srimanote ve ark. 2002). Pil lokusunun varlığı, Stx-dönüşen fajlar yardımıyla lizojeni şansını artırmaktadır ve Stx genlerini taşıyan *E. coli* suşlarının çeşitliliğinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca bakteriyofajlar arasındaki interaksiyonlar, Stx ile birlikte diğer virulans genlerin kazanımını sağlamaktadır. *E. coli* suşlarında virulans genlerin horizontal transferiyle, yüksek oranda virulent patojenik suşlar oluşmaktadır.

Stx genleri için vektör olarak bilinen bakteriyofajlar, Stx ekspresyonunda önemli rol oynamaktadır (Neely ve Friedman 1998, Wagner ve ark. 2001). Stx genleri, λ Q homologu ile aynı transkripsiyonel sıralamada bulunmaktadır ve geç faz genleri için aktivatör rol üstlenmektedir (Neely and Friedman 1998, Plunkett ve ark. 1999) (Şekil 1.6). Fonksiyonel çalışmalarda Q kaynaklı transkripsiyon P_R 'den terminator T_R bölgesine oradan da lizis S geni bölgesine geçerek toksin sentezlenmesi ve salınımı mekanizmasının tamamlanmış olduğu bildirilmiştir (Şekil 1.6)(Neely ve Friedman 1998, Wagner ve ark. 2001). Bu bulgular Stx-kodlayan fajların, Stx ekspresyonunun regülasyonunda ve *E. coli*' nin Shiga toksin genlerinin dağılımında rol oynadığını göstermektedir.



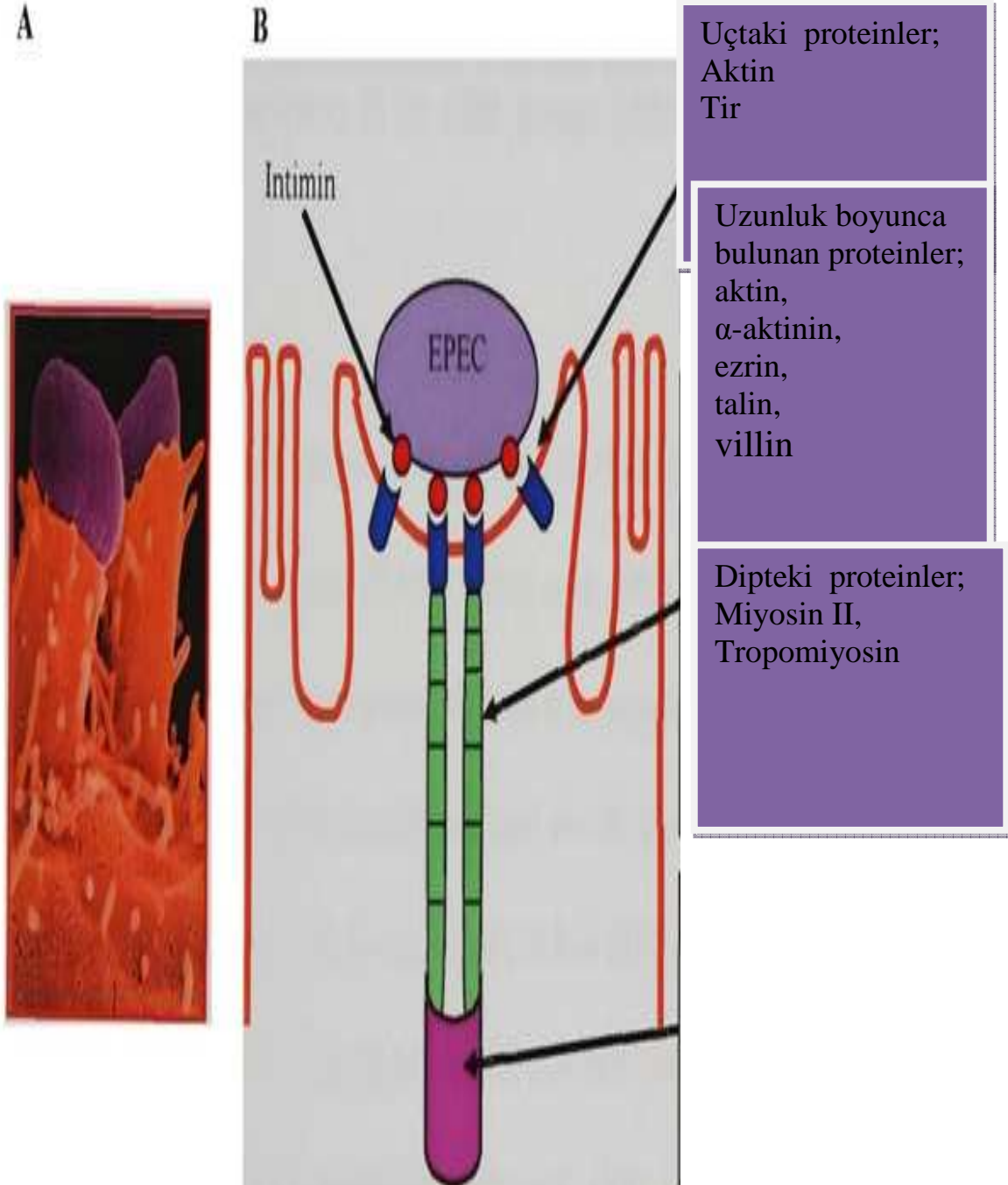
Şekil 1.6. Faj λ (A) ve faj H-19B (B)' nin DNA sekansı(Waldor 1998).

1.5.2. İntimin

STEC patojenitesinde stx dışında diğer virulans faktörlerde etkili olmaktadır (Çizelge 1.5). Bu virulans faktörlerden biri ise 94-97 kDa ağırlığında bir dış membran proteini (OMP) olan intimindir (McDaniel ve ark. 1995). İntimin, insan ve hayvan modellerinde virulans oluşumunda önemli bir faktördür (Donnenberg ve ark. 1993, Schauer ve Falkow 1993, McKee ve ark. 1995, Dean-Nystrom ve ark. 1998). HUS sendromlu insanlardan izole edilen STEC suşlarının çoğunda intimin toksinine sahiptir. Ayrıca iyileşmiş hayvanlardan izole edilen non-O157 STEC suşlarında insan STEC izolatlarına göre daha az intimin varlığı tespit edilmektedir (Barrett ve ark. 1992, Beutin ve ark. 1995, Johnson ve ark. 1996).

Eae geni tarafından kodlanan intimin, karakteristik attaching ve effacing(A/E) lezyonlarının oluşumuna yol açan konak epitelyal membranda STEC intimate adhezyonunda görevlidir (Paton ve Paton 1998). Bu bağlayıcı ve yıkımlatıcı A/E lezyonları bakterinin konakçı hücre membranına yerleşip intestinal epitelyal hücreleri dejenere etmesi sonucu oluşur. Aynı zamanda işaretli hücre iskeleti organizasyonu aktin filamentleri ile birlikte α -aktin, ezrin, cortactin, talin, fimbrin ve villin olarak gelişirken bakteriyel üremede aynı zamanda devam etmektedir (Finlay ve ark. 1992, Knutton ve ark. 1992, Kalman ve ark. 1999, Cantarelli ve ark. 2000, Goosney ve ark. 2000). Pedestal hücre uzunluğu 10 μ m boyutlarına ulaşabilmektedir ve hücreler oluşumlarına devam ederken bakterilerde hücrelerin uçlarına ve yüzeylerine sıkı bir şekilde bağlanmaktadır (Şekil 1.7)(Rosenshine ve ark. 1996, Kalman ve

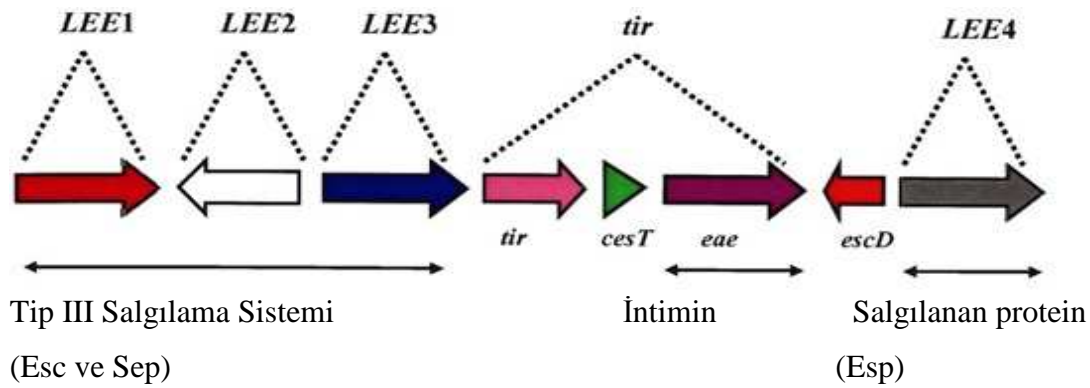
ark. 1999). Ancak STEC suşlarının kortaktin, α -aktin ve aktin gibi hücre iskeleti komponentleri hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır (Ismaili ve ark. 1995, Cantarelli ve Akeda 2000). STEC suşları dışında EPEC (Jerse ve Yu 1990), *Citrobacter rodentium*(Schauer ve Falkow 1993) ve *Hafnia alvei* (Albert ve ark. 1992) gibi patojenlerde enfeksiyon esnasında gözlenen A/E lezyon oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Fakat EPEC suşları tarafından üretilen A/E lezyonları başarılı bir şekilde çalışılmakta ve bu proste paradigma olarak hizmet etmektedir.



Şekil 1.7. Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC)' nin pedestal formasyonu (Anonim 2). A=Epitel hücrelerdeki EPEC' in pedestal formasyonunun scanning elektron mikroskoptaki görünümü. B=Pedestal yapıdaki sitoskeletal komponentlerin şematik görünümü. Tir: Transloke olan intimin reseptörleri

1.5.2.1. Enterosit yıkımlayıcı lokus (LEE)

Eae geni 35 kb boyutunda olan ve enterosit yıkımlayıcı lokus tarafından kodlanan patojenite adacığının bir bölümüdür (Jerse ve ark. 1990, McDaniel ve ark. 1995). LEE ile ilişkili genler; LEE1, LEE2, LEE3, tir ve LEE4 olarak bilinen 5 polisistronik operonda kodlanmaktadır (Mellies ve ark. 1999). LEE1, LEE2 ve LEE3, tip III sekresyon sisteminin komponentlerini kodlamaktadır (Esc ve Sep). Tir operonu; intimin, transloke olan intimin reseptörü (Tir) ve Tir şaperon CesT'i kodlamaktadır. LEE4 ise; tip III sekresyon sistemi (Esp) tarafından salgılanan proteinleri kodlamaktadır (Şekil 1.8). Ayrıca LEE, belirli bir fonksiyonu olmayan ve aminoasitleri kodlayan protein tripletlerini içerir (Perna ve ark. 1998). LEE4 tarafından salgılanan EspA, EspB ve EspD olarak bilinen proteinler konak hücrede sinyal transdüksiyonu ve A/E lezyon oluşumunu sağlamaktadır (Frankel ve ark. 1998a, Elliot ve ark. 1998). EspA translokasyon aygıtının önemli unsurunu oluştururken (Knutton ve ark. 1998, Ebel ve ark. 1998), Tir (Kenny ve ark. 1997) ve EspB (Knutton ve ark. 1998) ise konak hücrede transloke olmaktadır. EPEC suşlarında LEE genlerin regülasyonunu plazmid kodlayan regülatör (Per) ve LEE kodlayan regülatör (Ler) gerçekleştirmektedir. Plazmid-kodlayan regülatör (Per), LEE geninin transkripsiyonunu etkinleştirir. LEE-kodlayan regülatör (Ler) ise multiple LEE-kodlayan genlerin ifadesini düzenler (Elliott ve ark. 2000). STEC LEE genler sadece LEE-kodlayan regülatör (Ler) tarafından etkinleştirilmektedir (Elliott ve ark. 2000). Fakat STEC suşlarında LEE genlerin ifadesini düzenleyen Ler mekanizması henüz belirlenmemiştir. İntimin ve LEE kökeni tam olarak bilinmemektedir.



Şekil 1.8. STEC' in LEE lokusunun LEE1' den LEE4'e kadar olan ve tir operon yapısı (Ramachandran 2002).

LEE genlerin G+C oranı (%38.4), *E. coli* genomunun G+C oranından (%50.8) daha düşüktür (Elliot ve ark. 1998, Blattner ve ark. 1997). Ayrıca LEE, değişik bölgelerdeki farklı klonal gruplardan oluşmaktadır ve birbirine yatay bağlanan geniş DNA blokları ile farklı *E. coli* suşlarına transfer olabilmektedir (Wieler ve ark. 1997). EPEC E2348/69 suşu ile STEC O157:H7 EDL933 suşundaki LEE genleri karşılaştırıldığında STEC suşlarındaki 43,359 bp boyutundaki LEE genlerinin, EPEC suşlarındaki 35,624 bp boyutundaki LEE genlerinden daha büyük olduğu görülmektedir (Elliot ve ark. 1998). Bu farklılık STEC LEE genlerine eklenen, 933L suşunda dizayn edilen 7.5 kb boyutunda değişken profaj varlığından kaynaklanmaktadır (Elliot ve ark. 1998). Geriye kalan genler ise her iki LEE grubunda aynı dizi ve aynı sayıda kalmaktadır. EPEC E2348/69 ve STEC O157:H7 suşlarının LEE genleri, *E. coli* kromozomundaki selenosistein (selC) için tRNA kodlayan bölgeye 82 dakikada eklenir (McDaniel ve ark. 1995). Sperandio ve arkadaşları (1998) EPEC ve STEC suşlarının LEE genlerinin selC yada pheU bölgelerine eklendiğini bildirmişlerdir. Fakat EPEC suşunun O111ab:H25 serotipinin LEE genleri için üçüncü bir kromozomal bağlanma bölgesi önerilmektedir (Sperandio ve ark. 1998). Son zamanlarda *E. coli* K-12 suşunda LEE bölgesi içeren STEC O157:H7 klonlarının bağlayıcı ve yıkımlatıcı lezyonlara yol açmadığı ve Esp salgılamadığı bildirilmiştir. Aynı zamanda da EPEC LEE aktivitesinin de A/E lezyonlarına *E. coli* K-12 suşu ile birleştiği zaman yol açtığı ve kompleks fonksiyonel ve düzenleyici farkların EPEC ve STEC LEE bölgelerinde saptandığı bildirilmiştir. (Elliot ve ark. 1999).

1.5.2.2. İntimin varyantları

İntimin geni, reseptör bağlanma aktivitesi açısından amino-terminal bakteriyel membran bağlanma noktasına ve karboksi-terminal bölgeye ihtiyaç duymaktadır (Luo ve ark. 2000). İntiminin reseptör bağlanma aktivitesi, intiminin reseptör bağlama aktivitesi, polipeptidlerin 280 aminoasitlik karboksi terminal bölgesinde gerçekleşmektedir (Frankel ve ark. 1994). Farklı intiminlerin amino asit sekanslarının analizi sonucunda N-terminal bölgelerinin korunduğunu fakat C-terminal bölgelerinde önemli sekans sapmalarını göstermektedir. Değişken Int₂₈₀ bölgesine göre α , β , γ , δ , ϵ ve θ olarak tanımlanan 6 farklı intimin çeşidi tespit edilmiştir (Adu-Bobie ve ark. 1998, Oswald ve ark. 2000, Tarr ve Whittam 2002). Oswald ve arkadaşları 2000 yılında yaptığı çalışmada, kullanılan suşların farklı RFLP profillerine sahip olması sebebiyle Int- α' y1, α 1 ve α 2 olarak bilinen 2 subgruba

ayırıştır. Ayrıca Int- ζ (katılım no. AJ298279) (J. Jores, K. Zehmke, L. Roumer ve L. Wieler, bildirilmeyen veriler), Int- ι (katılım no. AJ308551)(W. L. Zhang, H. Karch ve H. Schmidt, bildirilmeyen veriler), Int- λ (katılım no. AF439538)(J. Pan, bildirilmeyen veriler), Int- η (katılım no. AJ271407)(H. Schmidt, H. Karch ve E. Oswald, bildirilmeyen veriler) ve Int- κ (katılım no. AJ308552) (W. L. Zhang, H. Karch ve H. Schmidt, bildirilmeyen veriler) olarak tanımlanan 5 intimin çeşidi GenBank veritabanında sunulmaktadır.

Multilokus enzim elektroforezi ile birlikte 20 adet korunan genden 23 farklı diyarogenik *E. coli* klonunun identifikasyonu yapılmıştır (Whittam ve ark. 1993). Farklı multilokus enzim genotipleri ve flagellar antijenlerin korunması, EPEC ve ETEC suşlarının EPEC 1 ve EPEC 2, ETEC 1 ve ETEC 2 olarak farklı iki gruba ayrılmasına yol açmıştır (Whittam ve ark. 1993). Farklı serotipler ve intimin subtipleri ilk başta bu grup içinde ilişkilendirilmiştir. Serotip O55:H6 ve O127:H6 (Int- α) ve O111:H2/H-, O128:H2 ve O45:H2 (Int- β), EPEC 1 ve EPEC 2 grupları içinde temsil edilirler ve bu klonal bölgelerdeki LEE grupları, selC geni oluşumunu kromozomal düzeyde engellemektedir (Wieler ve ark. 1997). Aynı şekilde EHEC1 suşunun O157:H7 (Int- γ) serotipi ve EHEC2 suşunun O111:H8/H11/H- ve O26:H11/H- (Int- β) serotiplerinin LEE genleri PheU bölgesine bağlanmaktadır (Whittam ve ark. 1993, Wieler ve ark. 1997, Sperandio ve ark. 1998). Int- δ , genellikle O86:H34 serotipini içeren EPEC suşlarında ifade edilmektedir (Adu-Bobie ve ark. 1998). Int- ϵ ise, insan-kaynaklı STEC serotiplerinde bulunmaktadır (Oswald ve ark. 2000). EHEC O111 serogrubunu içeren bazı suşlarda Int- γ ifade edilirken (Oswald ve ark. 2000), diğer suşlarda ise Int- β varlığı bildirilmektedir (Abu-Bobie ve ark. 1998). Tarr ve Whittam (2002) tarafından yapılan çalışmalarda O111:H8 serotipinin farklı segmentlerinin bulunduğu ve intimin subtipleri açısından ayrı özellikleri olduğu α , β ve γ türlerinin Int- θ olarak belirtilen yeni intimin subtipleri oluşması açısından farklı segmentlerin meydana gelmesine yol açtıkları bildirilmiştir. Ayrıca serotip O111:H8'den izole edilen eae genlerinde Int- ζ (GenBank katılım no. AJ298279.1) geni ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Int- θ için olan sekanslar, insanlardan izole edilen O111:H suş 95NR1 EHEC türünden izole edilen eae geni sekansı ile benzer olduğu bildirilmiştir, bu gen Oswald ve arkadaşları (2000) tarafından Int- γ 2 olarak isimlendirilmiştir.

İntimin çeşitleri, konaktaki kolonizasyon ve doku tropizmine katkıda bulunmaktadır (Tzipori ve ark. 1995, Phillips ve Frankel 2000, Reece ve ark. 2001). Son zamanlarda enfekte in-vitro organ kültürleri (IVOC) kullanılarak yapılan çalışmalarda, ince bağırsak pediatrik

mukozasının çoğu bölgesinde EPEC kolonizasyonu ve A/E lezyonları indüklenirken; Peyer's patch' in folikül-ilişkili epitelyum (FAE)' unda EHEC adhezyonu ve A/E lezyon oluşumu sınırlandırılmaktadır (Phillips ve ark. 2000). Bu gözlemler, atipik intimin türlerini ifade eden *E. coli* suşlarını oluşturmak için çalışmalara yol açmıştır. İntimin yerleştirme çalışmalarında EPEC bakterisine Int- α ile Int- γ konması durumunda etkilenen dokularda EPEC bakterisinin tropizma gerçekleştirmesi saptanmıştır. Bakterinin de insan hücrelerinde yerleşirken Int- γ kodladığı bildirilmiştir. Aynı şekilde Int- α ile Int- γ EHEC bakterisi içine yerleştirildiğinde suşta Int- α kodlanması ve çoğu barsak hücrelerine yerleşme görüldüğü bildirilmiştir (Phillips ve Frankel 2000, Phillips ve ark. 2000).

Deibel ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptığı bir çalışmada, intimin N-terminal bölgesinin C-terminal bölgesinin bağlanma kapasitesini kontrol etmede önemli bir rol oynadığını rapor etmiştir. Bu çalışma, Frankel ve arkadaşlarının (1995), maltoz bağlayıcı protein olan Int- α 'nın Hep-2 hücreleri ile füzyonu sonucu ortaya çıkan çalışmanın verileri, Int α 280 türü ile karşılaştırılmıştır. Bağlanma aktivitesinin kontrolü, EPEC/STEC suşlarında intiminin verimsiz bağlanmasını önlemek açısından önemlidir.

Son zamanlarda Tir ile kompleks Int₂₈₀ 'nin yapısı, çok boyutlu nükleer manyetik rezonans (NMR) ve X-ışını kristalografisi çalışmaları ile tespit edildi (Batchelor ve ark. 2000, Luo ve ark. 2000). Bu çalışmalar, intiminin bakteriyel yüzey çıkıntısı olan karboksi-terminus içinde 4 farklı domaini (D1, D2, D3 ve D4) içerdiğini göstermektedir. D1, D2 ve D3 immunoglobulin benzeri bir yapıya sahipken, D4 domaini ise C-tip-лектin benzeridir. C-tip lektinler, hücre yüzeyinde bulunan karbohidrat tanımada görevli protein ailesidir (Weis ve Drickamer 1996). D4 ise, Tir'in intimin-bağlayıcı domaini ve intiminin karboksi terminus arasındaki interaksyonu içermektedir.

İntimin tipi, STEC suşlarının dokularda hedef spesifitesini etkilediği için STEC suşları tarafından ifade edilen intimin tipinin belirlenmesi önemlidir (Phillips ve Frankel 2000). Sığır ve koyun gibi iki önemli hayvan rezervuarından *E. coli* suşlarından intimin tiplerinin belirlenmesinde ise yetersiz bilgi bulunmaktadır.

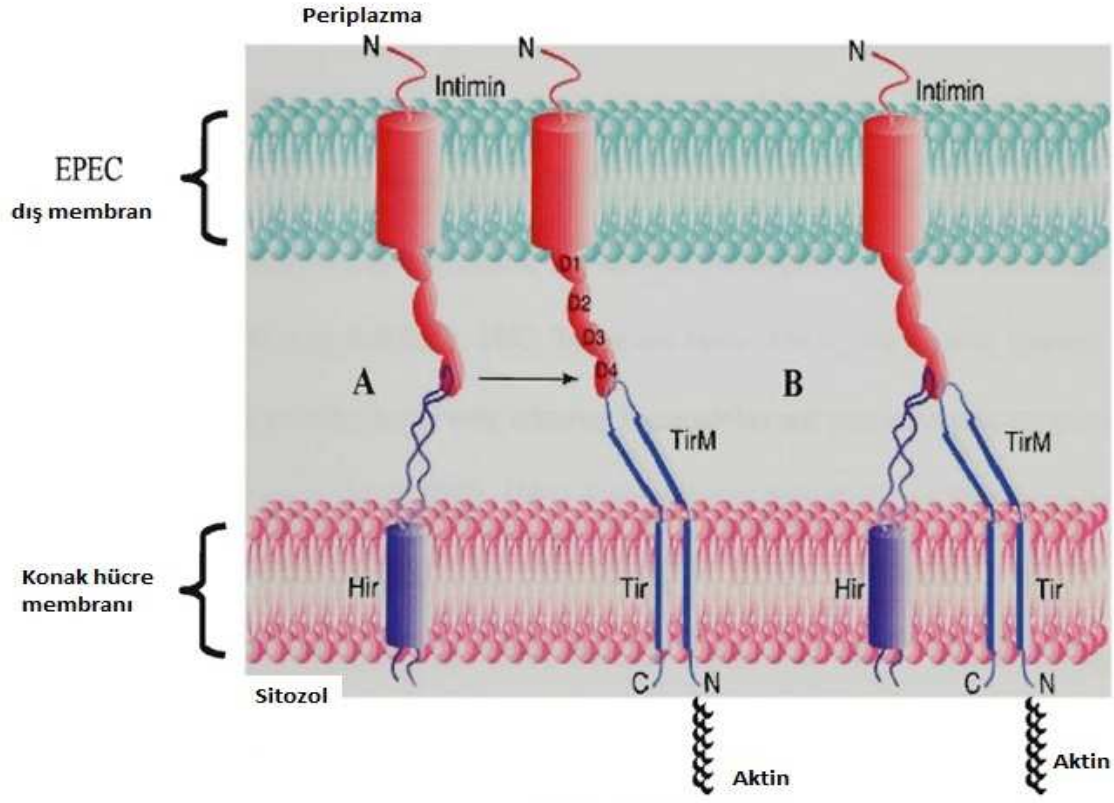
1.5.2.3. İntimin Reseptörleri

Epitel hücrelerinde görülen EPEC enfeksiyonu sırasında, 90-kDa boyutundaki tirozinle fosforile edilen ökaryotik membran proteini (Hp90) intimin için reseptör olarak

görev yapmaktadır (Rosenshine ve ark. 1996). Fakat daha sonra Hp90' nın bir konak hücre proteini olmadığı, bakteriyel tip III sekresyon sistemi tarafından konak hücrenin plazma membranına transloke olan ve intimin için reseptör olarak algılanan bir bakteriyel protein olarak gösterilmektedir (Kenny ve ark. 1997). Son olarak Hp90, transloke intimin reseptörü (Tir) olarak değiştirilmiştir. Tir ve tir şaperonu CesT (Abe ve ark. 1999, Elliot ve ark. 1999) eae genini barındıran tir operonu içinde lokalize olmaktadır (McDaniel ve ark. 1995). Tir, 78 kDa boyutunda unfosforile protein olarak bakteri hücresinde üretilmektedir. Transloke olduktan sonra konak hücrede fosforile protein haline dönüşür ve molekül ağırlığı 90 kDa boyutuna ulaşır (Kenny ve ark. 1997). Tir reseptörünün tirozin fosforilasyonu, insan ve tavşan kaynaklı EPEC suşlarında gözlenirken, *E. coli* O157:H7 suşlarında görülmemektedir. Deibel ve arkadaşları (1998), STEC O26:H- serotipinin enfekte konak hücrede translokasyon sırasında fosforile edilen, Tir reseptörünün homologu olan EspE proteinini ürettiğini bildirmektedir. Tir fosforilasyonu in-vitro koşullarda intimin bağlanmasında gerekli değildir. EHEC ve EPEC intiminleri, EHEC ve EPEC Tir reseptörünün fosforile olmayan formlarına bağlanabilmektedir (DeVinney ve ark. 1999). EPEC suşlarında tirozin fosforilasyon olayının gerçekleşip EHEC suşlarında ise gerçekleşmemesi, EHEC suşlarında bazı düzenleyici faktörlerin eksikliği ile ilişkilendirilmektedir. Bu patojen suşlarda Tir reseptörünün sentez ve sekresyonu farklı şekilde düzenlenmektedir. Ayrıca tek bir tirozin-serin yerdeğiştirmesi durumunda EPEC ve EHEC Tir molekülleri 474 pozisyonunda bulunmaktadır ve fosforilasyon bölgelerinin çeşitliliği ile ilişkilendirilmektedir (Kenny 1999). Bu yüzden EPEC ve EHEC suşları arasında Tir proteinin sentez ve sekresyonundaki farklılıklar, adhezyon mekanizmaları ve kaide oluşumlarındaki farklılıkları yansıtır olabilir.

Tir, en az üç fonksiyonel bölgelerin oluşmaktadır. İntimin ile interaksiyona giren ekstrasellüler bölgede, pedestal bakteri-hücre formasyonunun oluşması açısından transmembran bölge ve sitoplazmik bölgenin rol oynadığı bildirilmiştir. Membran formasyonu çalışmalarında Tir geni, konakçı hücresine yerleştirilmiş ve ekstrasellüler bölgedeki hücre yüzeyinde bulunan interaksyonlar , intimin oluşumu açısından değerlendirilmiştir (de Grado ve ark. 1999, Hartland ve ark. 1999). Tir geninin intimine bağlanan bölgesinde merkezi olarak hem ekstrasellüler bölgede, hem de aminokarboksil terminal bölgesinde 107 adet aminoasitin yerleştiği saptanmıştır. (Hartland ve ark. 1999). Tir-M bölgesi ise iki helikal yapıdan oluşan beta bağlarıyla bağlanmış intimin D4 ile ilişkili analog intimin-Tir kompleksi tarafından meydana getirilmektedir. (Luo ve ark. 2000).

Hartland ve arkadaşları (1999) intimin içinde disülfid bağlarının oluşumunun, Tir ile etkileşimde önem taşımadığını bildirmiştir (Hicks ve ark. 1998, Frankel ve ark. 1998b). Hartland et al. (1999), immunogold mikroskopik işaretleme tekniğini kullandıkları çalışmalarında intiminin konak hücrelerine lektin-benzeri komponent olan ve C-terminalini sindiren Tir molekülünden yoksun olsa bile bağlandığını bildirmişlerdir. Şekil 1.9’ da Tir-intimin etkileşimi ve konak hücre intimin reseptörü (Hir)-intimin etkileşimini göstermektedir.



Şekil 1.9. EPEC' in konak hücrelerine adhezyon mekanizmasının şematik hali (Frankel ve ark. 2001).

İntiminin purifiye hücre bağlanma bölgesi $\beta 1$ integrinleri (Frankel ve ark. 1996) ile birlikte in-vitro bağlanma aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir ve bu durumun intiminin *Yersinia* türlerinin epitelyal hücrelere bağlanması sonucu salgılanan invazın proteini ile olan benzerliğinden kaynaklandığı saptanmıştır (Isberg ve ark. 1987). 78 adet amino asit disülfid bağı, bu etkileşim için gereklilik arz etmektedir (Frankel ve ark. 1996). Fakat polarize intestinal epitelyum hücrelerinin apikal yüzeyinde $\beta 1$ integrinlerin bulunmadığı ve $\beta 1$ integrinlerin A/E lezyonlarının oluşumunda etkili olmadığı bildirilmiştir (Liu ve ark. 1999). Etkileşim ve kolonizasyona yönelik bu model tam olarak anlaşılmamaktadır.

A/E patojenlerinin konak hücre ile olan interaksiyonlarının 2 muhtemel mekanizması.

A) Başlangıç bağlanması intimin ve konak hücre intimin reseptörü(Hir) ile başlar ve Tir'in konak hücre membranına translokasyonu ile devam eder. Daha sonra intimin terminal D4 bölgesine (C-tip loktin hücresi bağlanma yeri) bağlanır. Sonrada TirM (transloke intimin reseptörü bağlanma yeri)' ye yerleşir. Bu interaksiyon karakteristik A/E lezyon oluşumuna yol açar. Bu modelde monomerik intimin-Tir reaksiyonu gösterilmiştir. Fakat X-ray kristalografisi sonucu muhtemel dimerik interaksiyonlar saptanmıştır.

B) Bu mekanizma intimin, Hir ve Tir arasındaki doğal interaksiyonu göstermektedir.

(Frankel ve ark. 2001)

1.5.3. Potansiyel Aksesör Virulans Faktörleri

1.5.3.1. EHEC-hemolizin

İnsan kaynaklı STEC suşlarının O157:H7 ve non-O157 serotipleri, EHEC-hemolizin(EhxA) olarak isimlendirilen bir plazmid-kodlayan hemolizin üretmektedir (Beutin ve ark. 1989, Bettelheim 1995). Genellikle bir sitotoksin olarak bilinen EhxA, RTX toksin ailesinin bir üyesidir (Bauer ve Welch 1996) ve üropatojenik *E. coli* tarafından üretilen α -hemolizin ile %60 oranında ilişkilidir (Bauer ve Welch 1996, Schmidt ve ark. 1995). EHEC-hemolizin' in fonksiyonu ve patogenezendeki önemi tam olarak bilinmemektedir. STEC suşları demir taşıma sistemine sahiptir ve demir kaynağı olarakta hemoglobini kullanmaktadır (Mills ve Payne 1995, Law ve Kelly 1995, Torres ve Payne 1997). EhxA toksininin temel fonksiyonu; in-vivo koşullarda eritrositleri lize etmek, hemoglobini dışarıya salmak ve böylece bağırsakta STEC suşlarının varlığını arttırmaktır (Law ve Kelly 1995). Bir çalışmada EhxA ifadesi ileStx üretimi arasında güçlü bir ilişki bulunduğu saptanmıştır (Beutin ve ark. 1989, Bettelheim 1995, Boerlin ve ark. 1999). Son zamanlarda Gyles ve arkadaşları (1998), insanlarla ilişkili olan hastalıklarda EhxA ekspresyonu bulunan serotiplerin, bu genin ekspresyonunun bulunmadığı serotiplerden daha fazla oranla izole edildiğini bildirmişlerdir.

1.5.3.2. Enteroagregatif ısı-stabil toksin (EAST1)

astA geni tarafından kodlanan Enteroagregatif ısı-stabil toksin (EAST1), ilk kez Enteroagregatif *E. coli* (EAEC) bakterisinde tespit edilen bir enterotoksindir (Savarino ve ark. 1991). Savarino ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptığı bir çalışmada 75 adet O157:H7 STEC suşunun tümünde, 9 adet O26:H11 suşunun 8 adedinde ve 23 adet non-O157/O26 suşun 12 adedinde astA geni incelenmiştir. STEC patogeneziinde EAST1 toksininin önemi tam olarak bilinmemesine rağmen STEC O157:H7 suşunda bulunan astA geninin yüksek prevalansı, STEC O157:H7 virulansına doğrudan katkı sağladığı öne sürülmektedir. EAST1 toksini, bağırsakta sıvı salgılanması sonucu sodyum klorür emilimini hızlandıran yada engelleyen ısı-stabil toksinleri ile yüksek oranda benzerlik göstermesi sebebiyle STEC suşları ile enfekte hastalarda gözlenen sulu diyare semptomlarında önemli rol oynamaktadır (Crane ve ark. 1992, Sears ve Kaper 1996).

1.5.3.3. Katalaz/Peroksidaz (katP tarafından kodlanan)

Hem katalaz hemde peroksidaz aktivitesine sahip bir protein, STEC O157:H7 suşunun virulans plazmidinden tanımlanmıştır (Brunner ve ark. 1996). Bu protein, *Bacillus stearothermophilus*' un PerA, *Mycobacterium intracellulare*'nin M185 ve *E. coli*' nin HPI katalaz KatG gibi birçok bakteriyel katalaz/peroksidaz ile benzerlik göstermektedir (Brunner ve ark. 1996). KatP, tüm STEC plazmidlerinde gözlenmez. Brunner ve arkadaşları (1999), STEC O157:H7 izolatlarının %66' sı ve non-O157 STEC izolatlarının ise %38' inin katP genine sahip olduğunu bildirmişlerdir. KatP geninin patogeneziindeki rolü tam olarak bilinmemektedir. Sadece bu genin makrofajlar ve nötrofiller gibi lökositler tarafından üretilen detoksifiye sitotoksik oksidantların yardımıyla konak savunma mekanizmalarında görevlidir (Brunner ve ark. 1996).

1.5.3.4. Ekstrasellüler serin proteaz (EspP)

Bir diğer virulans faktör ise, ekstrasellüler serin proteaz olarak bilinen *E. coli* O157:H7 tarafından salgılanan bir proteindir (Brunner ve ark. 1997). EspP, EPEC tarafından salgılanan EspC ve *Shigella flexneri* tarafından salgılanan SepA ile aynı homolojiye sahiptir (Brunner ve ark. 1997). STEC O26:H- serotipinin ise EspP proteinine benzer bir protein salgıladığı bilinmektedir (Djafari ve ark. 1997). EspP proteini, insan koagülasyon faktör V' e karşı proteolitik aktivite sergiler (Brunner ve ark. 1997). Faktör V bölünmesi pıhtılaşma reaksiyonlarının azalması nedeniyle uzun süreli kanamaya yol açabilir. Böylece hemorajik hastalık oluşmaktadır (Karch ve ark. 1998). EspP proteinin, Vero

hücrelerine karşı sitotoksik olduğu bilinmektedir (Djafari ve ark. 1997). STEC enfeksiyonu görülen çocuklarda EspP toksinine karşı antikorların saptanması, in-vivo şartlarda protein ifadesini ve patogenezdaki rolünü açıklamaktadır (Brunner ve ark. 1997). Fakat Schmidt ve arkadaşlarının (1999) yaptığı gözlemlerde, pO157 plazmidini barındıran tüm STEC suşlarında EspP proteininin ifade edilmediğini ortaya koymuştur. Hastalıklarda EspP proteinin önemi tam olarak belirlenememiştir.

1.5.3.5. Clostridium difficile-benzeri toksin ve Efa1

pO157 plazmidi, aminoasit proteinlerini kodlayan triplet içermektedir ve bu genler *Clostridium difficile*' nin ToxA ve ToxB sitotoksinlerine benzemektedir (Burland ve ark. 1998). Bu toksinler C-terminal ve N-terminal olmak üzere 2 bölgeden oluşmaktadır. C-terminal, toksinin hücre içine girişini sağlarken, N-terminal ise hücre yapısını düzenleyen proteinleri modifiye eden glukosil-transferaz enzimine sahiptir. Efa1 olarak isimlendirilen bu protein, A/E lezyon oluşumu gözlenen STEC ve EPEC suşlarında tespit edilmektedir (Nicholls ve ark. 2000). Efa1 geni, adhezyona doğrudan katkı sağlamaktadır (Nicholl ve ark. 2000). Son zamanlarda Tatsuno ve arkadaşları(2001), EHEC bakterisinin pO157 plazmidi üzerindeki toxBgeninin adhezyona katkı sağladığını bildirmiştir. Bu çalışma pO157 plazmidinin ToxB ve EHEC O157:H7' den elde edilen ori bölgesinin birleştirilmesi sonucu ortaya çıkmıştır. pO157' nin onarılmış tam kapasiteli bağlanma özelliği Tip III proteinlerin sekresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Tatsuno ve ark. 2001).

1.5.3.6. STEC oto aglütine adhezinler (Saa)

Bir dış membran olarak ifade edilen Saa, Güney Avustralya' da HUS salgınlarından sorumlu olan LEE-negatif STEC O113:H21 serotipinde tespit edilmektedir (Paton ve ark. 2001). Saa proteini, sadece LEE negatif STEC suşlarının geniş plazmidlerinde bulunmaktadır. Bu oto aglütine adhezinleri içeren *E. coli* suşlarının Hep-2 hücrelerine 9.7kat daha fazla bağlandığı tespit edilmiştir. Saa proteinin homologları ise HUS sendromlu hastalardan izole edilen LEE-negatif STEC suşlarının O48:H21 ve O91:H21 serotiplerinden identifiye edilmektedir (Paton ve ark. 2001). Saa adhezinini, bakterinin kendisine bölge oluşturması için kılıflı yapıları içermektedir. Bu gibi kılıflı yapılar proteinlerin birbirleri ile olan interaksiyonlarında rol oynamaktadır. LEE- negatif STEC suşları için insan enfeksiyonlarına yol açması açısından saa adhezinini muhtemel belirleyici bir faktördür (Paton ve ark. 2001).

1.5.3.7. Üreaz

İki üreaz gen kümesi, STEC O157:H7 strain EDL933 suşunun kromozomunda tespit edilmektedir (Perna ve ark. 2001). Bu gen kümeleri, üreaz montajı için gerekli yapısal proteinleri ve aksesuar polipeptidleri kodlamaktadır. Üreaz; amonyak ve karbondioksit içindeki ürenin hidrolizini katalizleyen, karmaşık bir nikel metalloenzimdir (Mobley ve ark. 1995). Üreaz, insan bağırsağındaki STEC O157:H7 suşlarının asidik çevreye karşı sergilediği toleransa katkıda bulunabilmektedir (Heimer ve ark. 2002). Bu durum, bakterinin proksimal bölgesinde bulunan amonyum iyonlarının anyon konsantrasyonlarının modifiye edilmesi ile başarılabilir. (Mobley ve ark. 1995).Heimer ve arkadaşları (2005), STEC O157:H7 strain EDL933 suşunun fonksiyonel üreaz genlerini (*E. coli* K-12 bakterisinde ifade edilebilen) taşıdığını bildirmiştir. Üreaz aktivitesi normal suşlarda tespit edilmemiştir. Bazı demir regülatörleri, üre kaynağı olarak tanımlanmış, ve klon EHEC suşlarında mutant *E. coli* MC3100 için üre parçalayıcı özellik göstermişlerdir. Ayrıca belirlenemeyen sekonder faktör de klon ürenin regülasyonunda rol oynamaktadır. (Heimer ve ark. 2002. Son zamanlarda, üreaz operonu STEC suşlarının O26 ve O111 serogruplarında tespit edilmektedir (Nakano ve ark. 2001). Ancak daha ileri çalışmalar, diğer non-O157 STEC suşlarında bu genin patogenezi ve prevalansında üreaz aktivitesinin rolünü belirlemek için yapılmaktadır.

1.5.3.8. Tip IV pilus

Son zamanlarda uzun-ince- pili proteininin ifadesini sağlayan Tip IV pilus lokusu(pil), LEE-negatif O113:H21 STEC (98NK2) suşlarının mega plazmidi (pO113) üzerinde tanımlanmıştır (Srimanote ve ark. 2002). Diğer birçok LEE-negatif STEC suşları ise, pil lokusunun homologunu barındırmaktadır. İnsanlarda ciddi hastalıklara neden olduğu bilinen, O26-O111-O157 içeren LEE-pozitif serogrupları pil lokusuna sahip değildir. Bu tip IV pilus biyosentez lokusu, 11 adet yakın genin kaynağı olmaktadır (pilL ve pilV) ve bu genler, birbirinden bağımsız olarak oluşmaktadır.

Tip IV pilus; EPEC (Bieber ve ark. 1998, Stone ve ark. 1996),*Vibrio cholerae* (Manning 1997) ve *Salmonella entericaserovartyphi* (Zhang ve ark. 2000) gibi patojenik bakterilerin konak epithelyal hücrelere adhezyonunu sağlamaktadır. Fakat 98NK2 tarafından eksprese edilen tip IV pili geni, in vitro ortamda Hep-2 ya da Hct-8 hücrelerine olan bağlanmayı regüle etmediği ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar pO113 plazmidin konjugal transferine değinmiş ve pil lokusunun konjugasyona yardımcı olduğunu bildirmişlerdir.

Ayrıca araştırmacıların hipotezine göre, pil lokusunun varlığı stx-dönüştürücü fajların lizojeni şansını artırabilmektedir. Adhezyon, konjugasyon ve virulans olgularında pil lokusunun rolünü saptamak için daha fazla çalışmaların yapılması gerekmektedir.

1.6. STEC Patogenezi

1.6.1. İnsanlarda STEC İlişkili Hastalıklar

İnsanlarda STEC enfeksiyonu; sulu diyare, kanlı diyare, HUS, trombotik trombotopenik purpura (TTP) ve ölüm gibi çeşitli klinik olaylara neden olmaktadır (Griffin ve ark. 1988). Diyareye neden olan STEC suşlarının inkübasyon periyodu 3-4 gün arasında değişmektedir. Bu süre içinde hastalardakların kramplarıyla birlikte sulu diyare gözlenmektedir (Riley 1987, Griffin ve ark. 1988). Diyareli hastaların %25-75' inde ciddi hastalık gelişmezken, bazı hastalarda sulu diyare 1-2 gün içinde kanlı diyare ve hemorajik kolitise(HC) dönüşmektedir (Riley ve ark. 1983, Riley 1987, Griffin ve ark. 1988). Hastalık bir hafta içerisinde belirgin semptomlar göstermeden sonlanabilir, fakat çocuklarda ve yaşlılarda görülen olguların %5-10' unda hastalık HUS şekline dönüşebilmektedir. HUS sendromu; hemolitik anemi, trombotopeni ve akut renal bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. Hastaların çoğunda tedavi sonucunda iyileşme gözlenirken, HUS sendromlu çocukların %3-5'inde ölümle sonuçlanmaktadır. Yaklaşık olarak şiddetli böbrek bozukluklarının, hipertansiyon ve merkezi sinir sistemi bulgularının (letarji, kasılma, koma ve parezi) görüldüğü olguların %12-30' unda uzun dönem tedavinin gerektiği saptanmıştır (Pickering ve ark. 1994).STEC enfeksiyonu, TTP olarak adlandırılan HUS sendromunun çeşitli formlarına neden olabilmektedir. TTP, histopatolojik ve klinik HUS sendromuna benzemektedir. Fakat bu durum genellikle yetişkinlerde prodromal diyarenin yokluğu ile karakterizedir (Morrison ve ark. 1985). TTP' de sinirsel bulgular daha az görülür ve böbrek hasarı fazla gelişmemiştir (Morrison ve ark. 1986). řu anda HUS tedavisi destekleyici terapiolarak yapılmaktadır.

1.6.2. Hayvanlarda hastalık nedeni olarak STEC

1.6.2.1. Sığırlarda STEC

İnsanlar ile karşılaştırıldığında, *E. coli* O157:H7 hastalık oluşturmadan sığır bağırsağında kolonize olabilmektedir (Cray ve Moon 1995, Brown ve ark. 1997). STEC O157:H7 ve sığırlarda bulunan diğer STEC suşları ise genç buzağılarda patojenite

oluşturmaktadır (Dean-Nystrom ve ark. 1997). STEC O157:H7 suşu ile inokülasyondan sonra neonatal buzağılarda diyare gelişir. Diyareli buzağuların ince ve kalın bağırsaklarında A/E lezyonlarına neden olan O157:H7 suşları bulunmaktadır (Dean-Nystrom ve ark. 1997). Neonatal buzağularla karşılaştırıldığında ise, STEC O157:H7 ile enfekte 3 haftadan büyük sığırlarda histolojik lezyonlar ve hastalık oluşumu gözlenmez (Cray ve Moon 1995, Brown ve ark. 1997). İnfeksiyonun şiddetli durumları duyarlı buzağılarda virulent STEC' in villus atrofisi, epitelyal hücre hasarı, nötrofillerin intersitisiyel lümene infiltrasyonu ve kanda pseudomembranların ve fibrinlerin birikimine yol açmaktadır (Hall ve ark. 1985, Pearson ve ark. 1999). Neonatal kolostrum almayan hayvanlarda *E. coli* O157:H7 insanlardaki gibi enterokolitise yol açmaktadır (Dean-Nystrom ve ark. 1997).

İntimin varlığı, *E. coli* O157:H7 suşları ile enfekte neonatal buzağılarda diyarenin başlamasını ve gastro-intestinal sistemde kolonizasyonu sağlamaktadır. İnfekte yeni doğan buzağılarda intimin-pozitif yada intimin-negatif STEC O157:H7 suşları mevcuttur (Dean-Nystrom ve ark. 1998). Sığırlarda Stx'in rolü ve intestinal mukozadaki etkileri tam olarak anlaşılmamaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada Stx reseptörü olan Gb3 varlığının gastro-intestinal sistemde bulunmadığı, sadece böbrek ve beyin dokularında saptandığı bildirilmiştir (Pruimboom-Brees ve ark. 2000). Bu çalışmada 6 adet gastro-intestinal ve 5 adet ekstraintestinal organ incelenmiştir. Bu organların hiçbirinin kan dokularına stx bağlanmamaktadır (Pruimboom-Brees ve ark. 2000). Stx genleri için vasküler reseptörlerin yokluğu sığırların stx toksinine karşı direnç geliştirmesine neden olmaktadır. Ayrıca sığırlar; STEC O157:H7 ve çeşitli non-O157 STEC suşları için asemptomatik rezervuarlar olarak kabul edilmektedir. Hoey ve arkadaşlarının (2002) yaptığı bir çalışmada ise sığırların intestinal sisteminde Stx reseptörlerinin ekspresyonu saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları ile Pruijboom-Brees ve arkadaşlarının(2000) yayınladığı sonuçlar arasında çelişkiler bulunmaktadır. Stx bağlanması jejunum, ileum, sekum ve kolon submukozasında epitelyal hücrelerde görülmektedir (Hoey ve ark. 2002). Fakat jejunum, ileum, sekum, kolon ve böbrek kapillarlarına stx1 bağlanması Pruijboom-Brees ve arkadaşları (2000)' nın yaptıkları çalışmada olduğu gibi görülmüştür (Hoey ve ark. 2002). Daha da fazlası stx1 potansiyel bir hedef olarak submukozal lenfoit dokulara bağlanmaktadır (Hoey ve ark. 2002). Reseptörlerin yokluğu kan damarları ve böbreklerde stx toksisitesi ve STEC patojenitesi açısından hayvanların dirençli olmasını sağlamaktadır (Hoey ve ark. 2002).

1.7. STEC Enfeksiyonunun Tanısı

Sığır, koyun gibi et üretiminde kullanılan hayvanlar, temel STEC rezervuarlarını oluşturmaktadır. Dışkı ile kontamine olmuş gıdalar, insan enfeksiyonlarının oluşumunu sağlamaktadır. Kesim sırasında karkaslara bulaşan ruminant dışkılarında STEC' in virulans faktörleri, STEC varlığını belirlemeye yardımcı olmaktadır. Ayrıca ishalleri hastaların dışkılarında STEC suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonu, bu suşların virulans potansiyelini belirleyerek enfeksiyonun erken teşhisini kolaylaştırmaktadır.

1.7.1. Kültüre-dayalı tespit

STEC O157:H7 izolasyonu için kullanılan en yaygın agar sorbitol-MacConkey-agar (SMAC)' dır (Farmer ve Davis 1985, March ve Ratnam 1986). Bu ortam, fekal kaynaklı *E. coli* serotipleri arasında sorbitolü fermente edemeyen STEC O157 suşlarının gözlemlenmesi için kullanılmaktadır (March ve Ratnam 1986). SMAC agarın çeşitli modifikasyonları bulunmaktadır. SMAC agar için bazı modifikasyonlar vardır. Bu modifikasyonlar agarda STEC O157' nin diğer organizmalardan selektif ve duyarlı olarak ayırt edilebilmesini sağlar. CT-SMAC agar (sefiksim ve potasyum telluriti içeren) diğer *E. coli* suşlarının gelişmesini engellemektedir (Zadik ve ark. 1993). CR-SMAC (sefiksim ve ramnoz içeren) agar ise, sorbitolü fermente etmeyen suşlar içinden STEC O157:H7 ayırımını sağlamaktadır. STEC O157:H7 suşları CR-SMAC agardaki ramnozu fermente edemez (Chapman ve ark. 1991). STEC O157:H7, sorbitolü fermente edemeyen koloniler olarak bilinmektedir ve aglütinasyon testleri yardımıyla O157 antijeni saptanmaktadır. SMAC agarda β -D-glukuronidaz varlığı, STEC O157 saptanmasını amaçlamaktadır (Okrend ve ark. 1990). Sorbitolü fermente eden β -D-glukuronidaz pozitif STEC O157:H7 ve O157:H- suşları Avrupa ve Avustralya' da tespit edilmiştir (Feng ve ark. 1998, Gunzer ve ark. 1992, Karch ve Heesemann 1993, Bettelheim ve ark. 2000).

Yukarıda bahsedilen tespit yöntemi, non-O157 STEC serotiplerinin tespiti için uygulanmaz. Bu serotiplerin diğer fekal *E. coli* suşlarından ayırımı için kullanılan farklı biyokimyasal özellikleri bulunmamaktadır. Neredeyse tüm O157 ve non-O157 STEC suşları enterohemolizin üretmekte ve kalsiyum içeren kanlı agar (WSBA)' da α -hemolitik suşlar ayırt edilebilmektedir (Beutin ve ark. 1989). Alfa- hemoliz, kanlı agarda 37°C' de 4 saat inkübasyondan sonra kolonilerin çevresinde gözlenen geniş hemoliz zonu ile karakterize edilirken, enterohemolitik fenotip ise kanlı agarda 37°C' de 18-24 saat inkübasyondan sonra

gözlenen bulanık hemoliz zonu ile karakterize edilmektedir (Beutin ve ark. 1989). STEC' in sadece birkaç suşu α -hemolizin üretmektedir (Beutin ve ark. 1989, Bettelheim 1995).

Son zamanlardaki bir çalışmada, Lehmacher ve arkadaşları (1998) vankomisin, sefiksime ve sefsulodin içeren kanlı agar (BVCCA)' da STEC identifikasyonunun kalsiyum-kanlı agar (WSBA)' a göre daha kolay olduğunu bildirmiştir. İdentifikasyon için BVCCA agar kullanımı, *E. coli* hücrelerinde vankomisin permeabilitesinin artmasıyla hemolizin sekresyonunu kolaylaştırmaktadır. BVCCA-STEÇ kolonileri tarafından üretilen enterohemolitik fenotiplerin görünümü WSBA-STEÇ kolonilerinin görünümü ile aynıdır. Fakat BVCCA-pozitif kolonilerde, düşük α -hemolizin ekspresyonu yada zengin vankomisin ekspresyonu dolayısıyla ehxA geninin bulunmadığı bildirilmiştir (Hornitzky ve ark. 2001). Bu anomaliler, ruminantlarda bulunan STEC suşlarının izolasyonu için BVCCA agarın tercih edilmesini engellemektedir (Hornitzky ve ark. 2001, Djordjevic ve ark. 2001).

1.7.2. PCR-dayalı tespit

Çeşitli PCR amplifikasyon metodları, STEC virulans genlerinin tespiti ve karakterizasyonu için gelişmiştir. PCR tekniği, en güvenli ve en hızlı metodlardan biridir. PCR testleri, shiga toksin genlerin (Stx1 ve Stx2) varlığını yada dışkı ve gıda kültürlerinde Stx1, Stx2, eae ve ehxA genlerinin simultane identifikasyonunu (multipleks PCR) saptamak için geliştirilmiştir (Gannon ve ark. 1992, Begum ve ark. 1993, Cebula ve ark. 1995, Fratamico ve ark. 1995, Paton ve Paton 1998, Fagan ve ark. 1999). Fakat fekal sıvı kültürlerde STEC virulans faktörleri saptanırsa *E. coli*'nin izolasyonu ve bu serotiplerin virulans faktörlerinin doğrulanması için kültür işlemine başvurulmalıdır.

China ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları çalışmada; diyareli buzağılardan izole edilen 30 adet *E. coli* suşunda intimin (eaeA), shiga toksin 1 ve 2 (stx1 ve stx2) genleri araştırılmıştır. İntimin (eaeA) ve shiga toksin(stx1 ve stx2) kodlayan genlerin tespiti amacıyla multipleks PCR uygulanmıştır. İntimin (eaeA), stx1 ve stx2 genleri sırasıyla 570, 388 ve 807bp'de aranmıştır. PCR testleri sonucunda 14 suş sadece eaeA geni pozitif bulunurken, 15 suşta eaeA ve stx1 geni, 1 suşta eaeA ve stx2 geni, suşların birinde ise aranan 3 gende (eaeA, stx1 ve stx2) saptanmıştır. Sonuçlar test edilen *E. coli* suşlarında araştırılan potansiyel virulans faktörlerinin yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir.

China ve arkadaşlarının (1996) kullandığı baz sekanslarından yararlandığımız çalışmamızda isesiğirlerin klinik mastitis vakalarından izole edilen *E. coli* suşlarında intimin, stx1 ve stx2 genleri araştırılmıştır. Her biri farklı sürülere ait, 2011 Haziran-Eylül tarihleri arasında izole edilen toplam 160 *E. coli* suşu incelenmiştir. Shiga toxin 1 ve 2 (stx1 ve stx2), intimin (eaeA) kodlayan genlerin tespiti amacıyla multipleks PCR uygulanmıştır. PCR testleri sonucu 5 suş *eaeA* geni ve sadece 1 suş *stx1* geni pozitif bulunmuştur. Sonuçlar klinik sığır mastitislerinden izole edilen *E. coli* suşlarında araştırılan potansiyel virulans faktörlerinden *eaeA* geninin yaygın olarak bulunduğunu gösterirken, *stx2* geninin saptanmadığını göstermektedir. Sığırlarda mastitis vakalarından izole edilen *E. coli* suşları arasında PCR yöntemi ile insanlarda hastalık oluşturma ihtimaline sahip Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) tespit edilmiştir.

Son zamanlarda Paton ve Paton (2002); stx1, stx2, eae, ehxA ve saa genlerinin tespiti için pentavalent bir PCR tekniği geliştirmiştir. Çeşitli virulans markerlerin tespiti için kullanılan primerler, korunmuş gen bölgelerinden tasarlanmıştır. PCR tekniği, stx2 (Bastian ve ark. 1998, Johnson ve ark. 1990, Tyler ve ark. 1991) ve eae (Adu-Bobie ve ark. 1998, Reid ve ark. 1999, Oswald ve ark. 2000) genleri arasındaki ayrımı belirlemek için geliştirilmiştir. PCR yöntemlerinin; dışkı, gıda ve cansız bakteri içeren örneklerde STEC ilişkili virulans genlerinin tespitinde son derece yararlı olduğu kanıtlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. İzolasyon Örnekleri

Araştırma için 2011 Haziran-Eylül tarihleri arasında, Aydın ili ve çevresinde bulunan, büyük ölçekli (50 ve üzeri sağmal inek) 3 farklı sığır işletmesi ziyaret edilerek

gerçekleştirildi. Bu ziyaretlerde hepsi laktasyon döneminde olan, son bir ayda antibiyotik tedavisi almamış, en az bir doğum yapmış, 3-9 yaşları arasında Holştayn ırkı 250 inek Kalifornia Mastitis Testi (CMT) ile incelendi. CMT ile subklinik mastitisli olarak belirlenen 160 ineğin süt örnekleri toplandı. Örnekler, hayvanların memelerinden tekniğine uygun bir şekilde 10 ml'lik steril enjektörlere alındı ve soğuk zincir uygulanarak aseptik şartlarda Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına ulaştırıldı. Bu örnekler, *E. coli* varlığı ve shiga toksin içerip içermediği yönünden araştırıldı.

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Ayıraçlar, Solusyonlar ve Antiserumlar

2.1.2.1. Besiyerleri

2.1.2.1.1. İzolasyon besiyeri

2.1.2.1.1.1. Modifiye Tryptic Soy Broth (Merck 1.09205)

| | |
|---------------------------|---------|
| Pepton(kazein) | 17 g |
| Pepton(soya unu) | 3 g |
| NaCl | 5 g |
| Safra tuzları No. 3 | 1.5 g |
| D(+)-glukoz | 2.5 g |
| Di-potasyumhidrojenfosfat | 4 g |
| Novobiocin | 0.02 g |
| Distile su | 1000 ml |

STEC zenginleştirilmesi için temel besi yerleri olarak çoğunlukla sorbitol MacConkey agar, tryptic soy broth (TSB), *E. coli* broth, enterohemorajik *E. coli* broth, buffered peptone water (BPW) ve brain heart infusion broth kullanılmaktadır (Hussein ve Bollinger 2008). Araştırmamız için alınan süt örneklerinde bulunan bakterinin zenginleştirilmesinde modifiye tryptic soy broth (mTSB) kullanılmıştır. Zenginleştirme besiyeri mTSB'de gram-negatif mikroorganizmaların gelişmesini azaltmak için novobiocin veya acriflavin bulunmaktadır (Vernozy-Rozand 1997). mTSB besiyeri 33 g/l konsantrasyonda distile suda eritilerek hazırlanmış ve erlenlere 225 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra erlenlerdeki besi yerleri otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir (FDA 1995).

2.1.2.1.2. İdentifikasyon besiyerleri

2.1.2.1.2.1. SorbitolMacConkey (SMAC) Agar (Difco 279100) ve CT SMACAgar Katkısı (Merck1.09202)

| | |
|---------------------|---------|
| Pepton | 20 g |
| NaCl | 5 g |
| Safra tuzları No. 3 | 1.5 g |
| Sorbitol | 10 g |
| Kristal violet | 0.001 g |
| Nötralred | 0.03 g |
| Agar-agar | 15 g |
| Distile su | 1000 ml |

E. coli O157:H7 serotipi sorbitolü fermente etmez iken diğer *E. coli* serotipleri sorbitolü fermente ettikleri için *E. coli* O157:H7 izolasyonunda çoğunlukla sorbitol MacConkey agar (SMAC) kullanılmaktadır (Vernozy-Rozand 1997). Bazı STEC suşlarının tellürite karşı duyarlı olmaları ve/veya sorbitol fermente etmeyen suşların izolasyonu için daha çok sefiksim ve tellürit katkıli sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC) kullanılmaktadır (De Boer ve Heuvelink 2000). Bu nedenle araştırmamızda SMAC agara daha selektif olmasını sağlamak amacıyla sefiksim ve tellürit (CT) katkısı eklenmiştir. SorbitolMacConkeyagardan(Difco 279100) 51,6 g/l oranı ile 25,8 g agar 500 ml distile su içinde ısıtılarak eritilmiş ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. CT-SMAC Agar Katkısı (Merck 1.09202) agara ilave edilmeden önce bir şişe katkı üzerine 1 ml distile su eklenip karıştırılmıştır. Otoklav sonrasında 45 °C'ye kadar soğutulan 500 ml agara aseptik şartlarda CT katkısı eklenerek karıştırılmış ve petri kaplarına 12,5 ml/petri olacak şekilde dökülmüştür (FDA 1995, Weagant ve ark 1995).

2.1.2.1.2.2. Eozin - Metilen Blue (EMB) Agar

| | |
|------------------------|------|
| Pepton..... | 10 g |
| Laktoz..... | 5 g |
| Sükroz..... | 5 g |
| Dipotasyum fosfat..... | 2 g |

Eozin Y.....0.4 g
Metilen mavisi.....0.065 g
Agar.....13.5 g
Distile su.....1000 ml

Karışımın pH'sı 7.2'ya ayarlandı ve 121 °C'de 15 dk otoklav edilmek suretiyle steril edildi.

2.1.2.1.2.3. Kanlı Agar Base (Merck1.10886)

Blood agar.....40 g.
Distile su.....100 ml

Karışımın pH'sı 7,2 – 7,4'e ayarlanıp, 15 dakika otoklav edildikten sonra, 50 °C'ye kadar soğutulup, içine %7 oranında steril defibrine koyun kanı ilave edildi (Mutter ve ark 1989).

2.1.2.1.2.4. Lassen'in 3'lü tüpbesiyerleri

Tüp I

| | |
|--------------------------|-------|
| Peptone | 20 g |
| Lactose | 10 g |
| Glucose | 1g |
| Sodium thiosulphate | 0.2 g |
| Ferric ammonium sulphate | 0.3 g |
| NaCl | 6 g |

| | |
|----------------------|---------|
| Agar | 17 g |
| Phenol red (0.2'lik) | 12.5 ml |
| Distile su | 1000 ml |

Karışımın pH'sı 7.6'ya ayarlandı ve 121 °C'de 15 dk otoklav edilmek suretiyle steril edildi.

Tüp II

| | |
|--------------------------|---------|
| Peptone | 5 g |
| Neopeptone | 5 g |
| Mannitol | 2 g |
| Agar | 2.5 g |
| Potassiumnitrate | 1.7 g |
| Phenol red (% 0.2'lik) | 20 ml |
| Distile su | 1000 ml |

Karışımın pH'sı 7.6'ya ayarlandı ve 121 °C'de 15 dk otoklav edilmek suretiyle steril edildi.

Tüp III

| | |
|------------------------------|-------|
| L- Tryptophan | 0.3 g |
| PotassiumDihydrogenphosphate | 0.1 g |
| PotassiumHydrognephosphate | 0.1 g |
| Üre | 2 g |
| Ethanol (% 95'lik) | 1 g |
| Phenol red (% 0.2'lik) | 20 ml |
| NaCl | 0.5 g |

Distile su 1000 ml

Besiyerinin sterilizasyonu milipore (0.2 μ) filtreden süzülerek yapıldı (Koneman ve ark 1997).

2.1.2.2. Ayıraçlar

2.1.2.2.1. İndol ayıracı

| | |
|-----------------------------|--------|
| P-Dimethylaminobenzaldehyde | 10 g |
| Isoamylalcohol | 150 ml |
| HCl (konsantre) | 50 ml |

2.1.2.3. Solusyonlar

2.1.2.3.1. EDTA (0,5 M)

Disodium EDTA-2 H₂O.....186,1 g

EDTA 800 ml distile suda manyetik karıştırıcıda çalkalanarak eritilip, NaOH ile pH 8,0'e ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlanıp 121 °C'de 15 dk otoklav edildi.

2.1.2.3.2. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer

10X TBE Stok Solusyonu

| | |
|-----------------|---------|
| Tris Base..... | 121,1 g |
| Borik Asit..... | 61,83 g |
| EDTA..... | 5,84 g |

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dk otoklav edilip, pH 8,0 ayarlanarak buzdolabında saklanır.

0,5X TBE Kullanma Solusyonu

| | |
|-----------------|--------|
| 10X TBE..... | 50 ml |
| Distile su..... | 950 ml |

Karıştırılarak solusyon hazırlanır.

2.1.2.3.3. Gel LoadingBuffer (6X)

| | |
|-----------------------|-------|
| Bromfenol Mavisi..... | 25 mg |
| Sükroz..... | 4 g |
| H ₂ O..... | 10 ml |

Karıştırılarak solusyon hazırlanır.

2.1.2.3.4. Tris (1M)

| | |
|----------------|-------|
| Tris Base..... | 121 g |
|----------------|-------|

Tris Base 800 ml distile suda eritilip, yaklaşık olarak 60 ml HCl asit ilave edilerek pH: 7,6'ya ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlanır. 121 °C'de 15 dk otoklav edilir.

2.1.2.3.5.1M NaCl

| | |
|-----------------|---------|
| NaCl..... | 58,44 g |
| Distile Su..... | 800 ml |

NaCl distile suda çözüldükten sonra son hazim 1000 ml' ye tamamlanır.

2.1.2.3.6. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA)

| | |
|------------------|-------|
| Tris (1M)..... | 10 ml |
| EDTA(0,5 M)..... | 2 ml |

Karıştırıldıktan sonra karışım 1000 ml distile su ile tamamlanır.

2.1.2.4. Boyalar

Gram boyama (Merck-111885) yapılmıştır.

2.1.2.5. Antiserum Test Kitleri

2.1.2.5.1. *E. coli* Lam Aglutinasyon Testi (DENKA SEIKEN-295347)

E. coli olarak belirlenen kolonilerde O antijeninin varlığının araştırılması amacıyla O antijen lam aglutinasyon testi uygulanmıştır. *E. coli* Lam Aglutinasyon Testi somatik (O) antijenine karşı hazırlanmış spesifik somatik (O) antikorları (polivalan: domuz, monovalan: tavşan) ihtiva eden ve koruyucu olarak 0.08 w/% v sodyum azid eklenmiş sıvı ürün içeren, tüp içinde antijen ve antikor aglutinasyonuna dayanan bir testtir.

Grup O Antiserumlar (alternatif)

Polivalan II- içerdiği tipler: O26, O55,O111, O119, O126

Polivalan III- içerdiği tipler: O86, O114, O125, O127, O128

Polivalan IV- içerdiği tipler: O44, O112, O124, O142

Test kiti içeriğinde olmayan başka materyaller de kullanılmıştır. Bu materyaller küçük test tüpleri, fizyolojik tuzlu su, pipetler, mikropipetler, florasan lamba, nutrient agar, brain heart infuzyon agar, otoklav veya su banyosu, santrifuj, lam ve asetat kalemidir.

Numune

Saf kültürlerden biyokimyasal testler yardımıyla *E. coli* olarak saptanan organizmalar serotiplendirilmektedir. Kültür karışık suşlardan oluşuyorsa, serotip doğru bir şekilde tespit edilemez.

Prosedürler

O-Grup Belirlenmesi

O-antijen belirlenmesi ısıyla inaktive edilmiş bakterilere lam aglutinasyon metodu uygulanarak gerçekleştirilir.

- 1) Belli bir miktar bakteriyel kültür 3 ml fizyolojik tuzlu su ile süspanse edilir. Elde edilen süspansiyon 121 °C'de 15 dk ve 100 °C'de 1 saat otoklavlanarak antijen inaktivasyonu sağlanır. İnaktive antijen eşit miktarlarda distile su ile yıkanarak 20 dakika boyunca 900 rpm' de santrifüje edilir. Tüplerdeki süpernatant uzaklaştırılıp çökelti 0.5 ml fizyolojik tuzlu su ile süspanse edilerek antijenik solüsyon olarak kullanılır.
- 2) Sonraki aşamada her polivalan antiserumdan bir damla ve 30 µl fizyolojik tuzlu su asetat kalemi ile bölümlere ayrılmış temiz lamlar üzerine damlatılır.
- 3) Lam üzerindeki her antiserum-fizyolojik tuzlu su karışımının üzerine antijenik süspansiyondan 5-10 µl damlatılır.
- 4) Lamlar sağa sola 1 dk boyunca eğilerek süspansiyonların karışması sağlandıktan sonra O pozitif olan karışımlarda aglutinasyon deseni şekillenir. Aglutinasyon florasan ışığı altında lamlara bakıldığında çok net olarak gözlenir. Aglutinasyon ilk 1 dk sonunda şekillendiği için

aglutinasyon oluşmayan veya hafif oluşan örnekler negatif olarak değerlendirilirken tam aglutinasyon şekillenenler pozitif olarak değerlendirilir.

Sonuçların Yorumlanması

O Grup Testin Yorumlanması

Aglutinasyon flöresan ışığı altında lamlara bakıldığında çok net olarak gözlenir. Aglutinasyon ilk 1 dk sonunda şekillendiği için aglutinasyon oluşmayan veya hafif oluşan örnekler negatif olarak değerlendirilirken, tam aglutinasyon şekillenenler pozitif olarak değerlendirilir. Her serum ile 1 dakika içinde reaksiyon veren güçlü aglutinasyon pozitif olarak kabul edilirken, 1 dakika içinde aglutine yapıları görülmeyen veya zayıf aglutinasyon negatif olarak kabul edilir.

| Polivalan antiserumlar için sonuçlar | Belirlenmesi |
|---|---|
| Herhangi bir polivalan antiserum pozitif değerlendirilirse, | O-Grup belirlenmesi pozitif değerlendirilen polivalan antiserumlardan oluşan monovalan antiserumlar kullanılarak yapılır. |
| Tüm polivalan antiserumlar negatif değerlendirilirse, | Örnekte <i>Escherichia coli</i> Antiserumları içeren serotiplerin bulunmadığı belirlenir. |

Performans/Başarı

1. Duyarlılık Testi

- 1) O-Antiserumlar: Temiz lam üzerine serotipi bilinen referans suş ile bir damla ürün damlatıldığında reaksiyon verirse granüler aglutinasyon gözlenir.
- 2) H-Antiserumlar: Küçük bir test tüpü içerisinde serotipi bilinen referans suş ile 3 damla reajan reaksiyona sokulduğunda pamuk ipliği benzeri aglutinasyon gözlenir.

2. Spesifiklik Testi

Duyarlılık testi ile benzerlik gösteren bu testte antiserum ile aglutinasyon referans suştaki serotip varlığına göre belirlenir. Antiserum ile serotipe karşılık gelen referans suş reaksiyona girdiğinde aglutinasyon gözlenirken, serotipi bulunmayan referans suş ile reaksiyona girdiğinde aglutinasyon gözlenmez.

2.1.3. PCR

2.1.3.1. Kullanılan cihazlar

PCR 25 örnek kapasiteli Eppendorf Master Cycler kademeli termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

2.1.3.2. MgCl₂, Taq DNA Polimeraz, 10XTaq Buffer, dNTP Set

25mM MgCl₂, Taq DNA polimeraz (5U), 10X TaqBuffer (100 mM (Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl), 100mM deoksiniükleotidtrifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas) kullanılmıştır.

2.1.3.3. Primerler

STEC suşlarında stx 1, stx 2 ve intimin(eae) genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. MultipleksPCR’da kullanılacak oligonükleotid dizileri (China ve ark. 1996)

| Primer | Oligonükleotiddizisi (5’-3’) | Büyükük (bp) |
|------------------|-------------------------------|--------------|
| <i>Eae B52</i> | AGGCTTCGTCACAGTTG | 570 |
| <i>Eae B53</i> | CCATCGTCACCAGAGGA | |
| <i>Stx 1 B54</i> | AGAGCGATGTTACGGTTTG | 388 |
| <i>Stx 1 B55</i> | TTGCCCCCAGAGTGGATG | |
| <i>Stx 2 B56</i> | TGGGTTTTTCTTCGGTATC | 807 |
| <i>Stx 2 B57</i> | GACATTCTGGTTGACTCTCTT | |

2.1.4. Elektroforez Cihazı

Elektroforez işlemi Thermo marka, elektroforez tankında, görüntüleme işlemi VilberLourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi.

2.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı

Agarose (Sigma)..... 1,5 veya 2 g
TBE (0,5X)..... 100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk kaynatılan karışım, 40-50 °C'ye kadar soğutuldu. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15-20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

2.1.4.2. Marker

Marker olarak 100 bp'lik DNA ladder(Fermentas) kullanıldı.

2.1.4.3. Etidium Bromür

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında Sigma marka % 1' lik Ethidium Bromür 500 ml 0,5X TBE ile hazırlanan %2' lik agaroz jelin içerisine 5µl miktarında eklenerek kullanıldı.

2.1.4.4. Standart Suş

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

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Alınması

Araştırma için 2011 Haziran-Eylül tarihleri arasında, Aydın ili ve çevresinde bulunan, büyük ölçekli (50 ve üzeri sağmal inek) 3 farklı sığır işletmesi ziyaret edilerek, hepsi laktasyon döneminde olan, son bir ayda antibiyotik tedavisi almamış, en az bir doğum yapmış, 3-9 yaşları arasında Holştayn ırkı, 250 inek Kalifornia Mastitis Testi (CMT) ile incelendi. CMT ile subklinik mastitisli olarak belirlenen 160 ineğin süt örnekleri toplandı. Örnekler, hayvanların memelerinden tekniğine uygun bir şekilde 10 ml'lik steril enjektörlere

alındı ve soğuk zincir uygulanarak aseptik şartlarda Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına ulaştırıldı.

2.2.2. *E. coli* İzolasyonu

Laboratuvara getirilen örneklerden *Escherichia coli*'nin saf olarak elde edilmesi amaçlandı. Bunun için, süt örnekleri mTSB'de zenginleştirilerek ve 42 °C'de 24 saat çalkalanarak inkube edildi (Halkman ve ark 2001). 24 saat sonunda üreme gözlenen suşların fenotipik özelliklerinin incelenebilmesi için kanlı agara, CT SMAC, EMB, MacConkey agara pasajlandı. 24 saat inkübasyon sonunda üreme şekillenen besiyerlerinden preparatlar hazırlanarak Gram boyama yapılmıştır. Boyama sonucunda belirlenen gram-negatif basillerin ait olduğu kolonilere biyokimyasal testler uygulanmıştır.

2.2.2.1. Fenotipik identifikasyonu

İzole edilen suşların koloni morfolojileri, biyokimyasal test sonuçları ve identifikasyon besiyerleri değerlendirilerek *E. coli* identifikasyonuna gidilmiştir.

2.2.2.1.1. Sefiksim-Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey Agarda üreme

mTSB besiyerinde üreyen gram-negatif ve biyokimyasal testler açısından *E. coli* şüpheli kolonilerden CT-SMAC agarlara öze ile ekim yapıldıktan sonra petri kutuları 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda renksiz olan koloniler sorbitol negatif, pembe-kırmızı koloniler ise sorbitol pozitif olarak değerlendirilmiştir (Doyle ve Schoeni 1987).

2.2.2.1.2. Eozin - Metilen Blue (EMB) Agarda üreme

mTSB besiyerinde üreyen gram-negatif ve biyokimyasal testler açısından *E. coli* şüpheli kolonilerden EMB agarlara öze ile ekim yapıldıktan sonra petri kutuları 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda laktozu kullanamayan bakteriler renksiz koloniler, laktozu kullanabilen *E. coli* için tipik koloniler ise yeşilimsi ve parlak metalik renkte koloniler olarak değerlendirilmiştir (Doyle ve Schoeni 1987).

2.2.2.1.3. Biyokimyasal testler

Şüpheli kolonilerin kanlı agarlara pasajları yapılarak saf kültürleri elde edildi. Saf kültürlere gram boyama yapıldı. Gram negatif kolonilerden Lassen'in üçlü tüp besiyerlerine ekimleri yapıldı. Lassen üçlü tüp besiyerleri 37 °C'de 24 saat inkube edildi. İnkübasyondan

sonra tüpler değerlendirildi ve *Escherichia coli* suşlarının identifikasyonları gerçekleştirildi. (Holt ve ark 1994, Koneman ve ark 1997).

2.2.2.1.3.1. Oksidaz testi

İzolasyonu yapılan mikroorganizmaların oksidaz aktiviteleri, oksidaz diski (Bacto) ile ölçüldü. Şüpheli bakterilerin 24 saatlik saf kültüründen platin öze ile alınan birkaç koloni oksidaz diskine yayılarak sürüldü. 25-30 saniye içinde diskin pembe mor bir renk alması pozitif, renk değişikliğinin olmaması negatif olarak değerlendirildi (Koneman ve ark 1997).

2.2.2.1.3.2. Nitrat testi

İçinde nitratlı buyyon bulunan tüplere, şüpheli mikroorganizmaların saf kültüründen birkaç koloni ekildi ve 37 °C'de 5 gün inkube edildi. Daha sonra buyyonun üzerine nitrat ayraçlarından (Solusyon A, Solusyon B), 1'er ml dökülerek besiyerinin renginin kırmızı veya kiremit kırmızısı olması pozitif, renk değişikliğinin olmaması negatif olarak kabul edildi (Koneman ve ark 1997).

2.2.2.1.4. *E. coli* Lam Aglutinasyon Testi

E. coli olarak belirlenen kolonilere O antijeninin varlığının araştırılması amacıyla O antijen lam aglutinasyon testi uygulanmıştır (Sakazaki 1992).

E. coli olarak belirlenen kolonilerden 30 µl alınarak Nutrient broth içeren mikrosantrifüj tüplerine inoküle edilmiştir. Elde edilen süspansiyon 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 121 °C'de 15 dk ve 100 °C'de 1 saat otoklavlanarak antijen inaktivasyonu sağlanmıştır. İnaktive antijen eşit miktarlarda distile su ile yıkanarak 20 dakika boyunca 900 rpm' de santrifüje edilmiştir. Yıkama ve santrifüje işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Tüplerdeki süpernatant uzaklaştırılıp çökelti 0.5 ml fizyolojik tuzlu su ile süspanse edilerek antijenik solüsyon olarak kullanılmıştır.

Sonraki aşamada her polivalan antiserumdan bir damla ve 30 µl fizyolojik tuzlu su asetat kalemi ile bölümlere ayrılmış temiz lamlar üzerine damlatılmıştır. Lam üzerindeki her antiserum-fizyolojik tuzlu su karışımının üzerine antijenik süspansiyondan 5-10 µl damlatılmıştır. Lamlar sağa sola 1 dk boyunca eğilerek süspansiyonların karışması sağlandıktan sonra O pozitif olan karışımlarda aglutinasyon deseni şekillenmiştir.

Aglutinyasyonflorasan ışığı altında lamlara bakıldığında çok net olarak gözlenmiştir. Aglutinyasyon ilk 1 dk sonunda şekillendiği için aglutinyasyon oluşmayan veya hafif oluşan örnekler negatif olarak değerlendirilirken tam aglutinyasyon şekillenenler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Polivalan serum ile pozitif sonuç veren numuneler aglutinyasyon pozitif O antiserumlar, polivalan serum ile negatif sonuç veren numuneler ise aglutinyasyon negatif O antiserumlar olarak belirlenmiştir.

2.2.2.2. Genotipik identifikasyon

Öncelikle *E. coli* suşlarından PCR'da kullanılmak üzere izolatlardan total DNA ekstraksiyonu aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

*şüpheli koloniler % 5 koyun kanlı agarda 37° C'de 24-48 saat inkübe edildi.

* Koloniler ze yardımı ile toplanarak 250 l FTS içinde süspansiyonunun ardından 100 °C'de 10 dk kaynatılarak bakteri DNA'sı ekstrakte edildi.

* Daha sonra 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı PCR'da hedef DNA olarak kullanılmak üzere saklandı.

2.2.2.2.1. PCR

Master Mikslerin Hazırlanışı: Tüm PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 50 l toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon zeltisi 1X, magnesium klorür (MgCl₂) 1,5 mM, dNTP 0,5 mM, primer (her biri için) 0,4 pmol, Taq DNA polimerase 2 U olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve volümleri izelge 2.2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Mastermiksin hazırlanma oranları (China ve ark. 1996)

| Malzeme (Ticari) | İstenen Son Konsantrasyon |
|-------------------|---------------------------|
| Tag Buffer (10X) | 5 l |
| MgCl ₂ | 15 mM |
| dNTP (2mM) | 5 l |
| Primer B52 | 40 mM |
| Primer B53 | 40 mM |
| Primer B54 | 40 mM |
| Primer B55 | 40 mM |

| | |
|------------------------------|-----------------------|
| Primer B56 | 40 mM |
| Primer B57 | 40 mM |
| Taq Polimeraz (5U) | 2 U |
| ddH₂O | Son Volüme Tamamlanır |
| Template DNA (200 nM) | 5 µl |
| TOPLAM | |

Mastermikslere hazırlandıktan sonra 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 45'er µl hazırlanan mastermiksten ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 5'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içlerine eklenmiş ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. *stx1*, *stx2* ve *eae* analizlerinde kullanılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı Çizelge 2. 3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 3. Multipleks PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

| Basamak | Döngü Sayısı | Sıcaklık | Süresi |
|-------------------------------|--------------|----------|--------|
| Başlangıç Denatürasyon | 1 | 94°C | 5 dk |
| Denatürasyon | 35 | 94°C | 30 sn |
| Bağlanma | | 50°C | |
| Uzama | | 72°C | |
| Son Uzama | 1 | 72°C | 10 dk |
| Bekletme | 1 | 4°C | ∞ dk |

2.2.2.2.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi

0,2 mL tüplerde oluşturulan 50 µl' lik PCR ürünlerinden 10' ar µl pipet yardımıyla alınıp, 3 µl6x loadingdye ile karıştırıldı. Oluşturulan karışımın tamamı alınarak, jeldeki uygun pozisyonadaki kuyucuğa yüklendi.

2.2.2.2.3. Jelde Yürütme

Hazırlanmış olan jelle, istenilen örnekler ve markerların yüklenmesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 80V 500A akımda 40 dakika yürütüldü.

2.2.2.2.4. Görüntüleme ve Değerlendirme

Elektroforez işleminin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkarıldı. Süre sonunda yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör

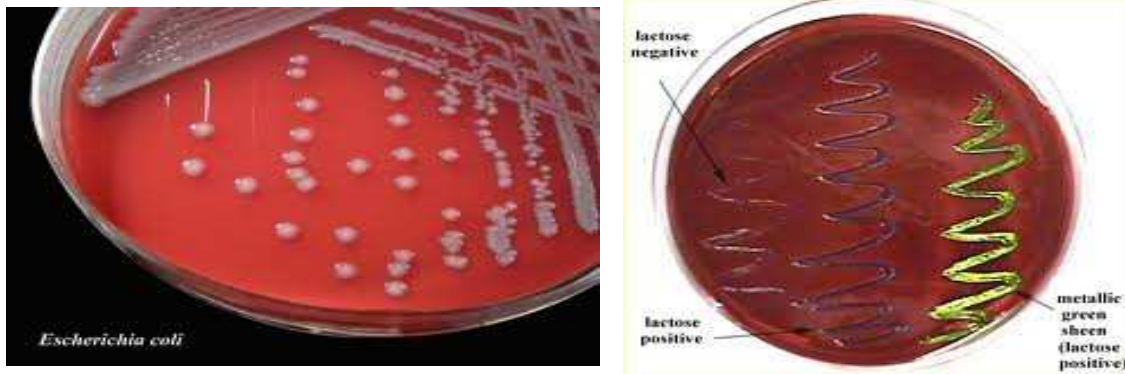
cihazındaki odacığa yerleştirildi. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PCR için ayrı değerlendirildi.

Değerlendirme daha önce bildirilen şekilde yapıldı. PCR analizinde, *stx1* primeri için 388bp, *stx2* primeri için 807bp, *eae* primeri için 570bp uzunluğunda bant oluşumu gözlemlendi.

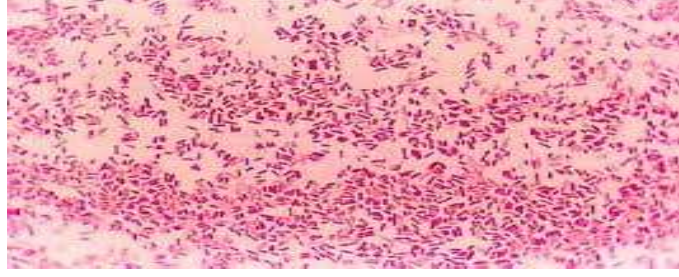
3. BULGULAR

3.1. İzolasyon Bulguları

Araştırma için 2011 Haziran-Eylül tarihleri arasında, Aydın ili ve çevresinde bulunan, büyük ölçekli (50 ve üzeri sağmal inek) 3 farklı sığır işletmesi (A,B,C) ziyaret edilerek gerçekleştirildi. Bu ziyaretlerde hepsi laktasyon döneminde olan, son bir ayda antibiyotik tedavisi almamış, en az bir doğum yapmış, 3-9 yaşları arasında Holştayn ırkı 250 inek Kalifornia Mastitis Testi (CMT) ile incelendi. CMT ile subklinik mastitisli olarak belirlenen 160 ineğin süt örnekleri toplandı. 160 materyalin *Escherichia coli* varlığı yönünden incelenmesi sonucunda toplam 31 *Escherichia coli* izole edildi.



Resim 3.1. *Escherichia coli* suşunun kanlı (solda) ve EMB (sağda) agardaki görüntüsü.



Resim 3.2. *Escherichia coli* mikroskobik görüntüsü.

3.2. PCR Bulguları

İzolasyon ve identifikasyon sonucunda elde edilen toplam 31 *E. coli* izolatında stx1, stx2 ve intimin(*eae*) genlerini saptamak için multipleks PCR uygulanmıştır. Multipleks PCR sonucunda elde edilen elektroforez görüntüsü Şekil 3.3’ de gösterilmektedir.



Resim 3.3. Shiga toksin üreten *E. coli* için yapılan multipleks PCR sonuçları. **M:** 100 bp DNA ladder, **P:** Pozitif kontrol (*E. coli* RHFS 232), **N:** Negatif Kontrol, **1-4:** *eae* geni pozitif örnekler, **5:** Negatif örnek, **6:** *eae* geni pozitif örnekler, **7:** Negatif örnek, **8:** *stx1* geni pozitif örnek.

Spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen multipleks PCR sonrasında incelenen toplam 31 *E. coli* suşunun 6 (%19.3)’sının 5 (% 83.3)’inde *eae* geni mevcut iken, 1’ inde (% 16.6) sadece *stx1* geni bulunduğu tespit edilmiştir.

3.3. O somatik antijen Bulguları

3.3.1. Grup O Antiserumlarile Serogruplandırma

Polivalan II (alternatif)- içerdiği tipler: O26, O55, O111, O119, O126

Polivalan III (alternatif)- içerdiği tipler: O86, O114, O125, O127, O128

Polivalan IV (alternatif)- içerdiği tipler: O44, O112, O124, O142

E. coli olarak belirlenen 31 suşun serogruplarını saptamak amacıyla O antijeninin varlığı araştırıldı. Polivalan II, Polivalan III ve Polivalan IV antiserumları ile 31 *E. coli* izolatına lam aglutinasyon testi uygulandı. Yapılan lam aglutinasyon testi sonucunda 31 *Escherichia coli* suşunun serogrupları tespit edildi. Bu değerlendirmeye göre 31 suşun 8 (% 25.8)' inde polivalan antiserum II, 14 (% 45.2)'ünde polivalan antiserum III, 9 (% 29.03)'unda ise polivalan antiserum IV pozitif olarak saptandı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Aydın ili çevresinde mastitisli sütlerden izole edilen *E. coli* suşlarının serogruplandırılması

| | Polivalan II (O26, O55, O111, O119, O126) | Polivalan III (O86, O114, O125, O127, O128) | Polivalan IV (O44, O112, O124, O142) |
|-----|--|--|---|
| 1. | - | + | - |
| 2. | + | - | - |
| 3. | + | - | - |
| 4. | + | - | - |
| 5. | - | + | - |
| 6. | - | + | - |
| 7. | - | - | + |
| 8. | - | + | - |
| 9. | - | - | + |
| 10. | - | + | - |
| 11. | - | + | - |
| 12. | - | - | + |
| 13. | + | - | - |

| | | | |
|-----|---|---|---|
| 14. | + | - | - |
| 15. | - | + | - |
| 16. | + | - | - |
| 17. | + | - | - |
| 18. | - | - | + |
| 19. | - | - | + |
| 20. | - | + | - |
| 21. | - | + | - |
| 22. | + | - | - |
| 23. | - | - | + |
| 24. | - | + | - |
| 25. | - | + | - |
| 26. | - | + | - |
| 27. | - | + | - |
| 28. | - | + | - |
| 29. | - | - | + |
| 30. | - | - | + |
| 31. | - | - | + |

Çizelge 3.2. Aydın ili çevresinde mastitisli sütlerden izole edilen STEC suşlarının virulans gen profili.

| Genotip | | | | | | |
|---------|---------|------------|---------------|------|------|-----|
| | İzolano | İşletme no | Serogrup | Stx1 | Stx2 | eae |
| 1. | 9 | C | Polivalan III | - | - | + |
| 2. | 10 | C | Polivalan II | - | - | - |
| 3. | 2 | C | Polivalan II | - | - | - |
| 4. | 36 | C | Polivalan II | - | - | + |
| 5. | 58 | C | Polivalan III | - | - | - |
| 6. | 38 | C | Polivalan III | - | - | + |
| 7. | 62 | C | Polivalan IV | - | - | + |
| 8. | 63 | C | Polivalan III | - | - | - |
| 9. | 43 | C | Polivalan IV | - | - | - |
| 10. | 45 | C | Polivalan III | - | - | - |
| 11. | 63 | C | Polivalan III | - | - | - |
| 12. | 64 | C | Polivalan IV | + | - | - |
| 13. | 66 | C | Polivalan II | - | - | - |
| 14. | 68 | C | Polivalan II | - | - | - |
| 15. | 48 | C | Polivalan III | - | - | + |
| 16. | 12 | C | Polivalan II | - | - | - |
| 17. | 51 | C | Polivalan II | - | - | - |
| 18. | 18 | C | Polivalan IV | - | - | - |
| 19. | 19 | C | Polivalan IV | - | - | - |
| 20. | 53 | C | Polivalan III | - | - | - |

| | | | | | | |
|------------------------------|-----|---|---------------|---|---|---|
| 21. | 71 | C | Polivalan III | - | - | - |
| 22. | 32 | C | Polivalan II | - | - | - |
| 23. | 14 | C | Polivalan IV | - | - | - |
| 24. | 56 | C | Polivalan III | - | - | - |
| 25. | 57 | C | Polivalan III | - | - | - |
| 27. | 33 | C | Polivalan III | - | - | - |
| 28. | 61 | C | Polivalan III | - | - | - |
| 29. | 35 | C | Polivalan IV | - | - | - |
| 30. | 32 | C | Polivalan IV | - | - | - |
| 31. | 105 | C | Polivalan IV | - | - | - |
| Kontrol suş E. coli RHFS 232 | | | | + | + | + |

4. TARTIŞMA

1945 yılında serogrup O11 suşlarının bir bakım evindeki çocuklarda ishal salgılarına yol açtığı gösterilmesi ile bağırsak patojeni olarak tanımlanmaya başlanan *E. coli*, günümüzde birçok infeksiyona yol açan suşları ile en zararlı patojenler arasında gösterilmektedir (Topçu ve ark. 2002, Bidet ve ark. 2005).

E. coli'nin O157:H7 serotipi ilk kez 1975 yılında kanlı ishali bulunan bir hastadan izole edilmiştir. Bu vaka sporadik bir hemorajik kolitis vakası olarak kaydedilmiştir. Bu vakadan sonra 1982 yılına kadar hiçbir vakadan O157:H7 serotipi izole edilmemiştir. *E. coli* O157:H7'nin bir insan patojeni olduğu ilk kez 1982 yılında anlaşılmıştır. ABD'nin Oregon ve Michigan eyaletlerinde 1982 yılında sığır etinden hazırlanmış köfteli hamburger yiyen insanlar arasında 47 kişide şiddetli karın ağrısı ve sulu ishale başlayan ve kanlı ishale dönüşen ateşsiz veya çok az ateşle seyreden iki hastalık salgını oluşmuştur. İnsanlarda şiddetli kanlı ishale seyreden bu iki salgının araştırılması sonucunda, bu salgınlara aynı hızlı yemek lokanta zincirinden elde edilerek iyi pişirilmeden tüketilen hamburger köftelerinden kaynaklanan ve daha önce patojen olarak tanımlanmayan O antijen 157 ve H antijen 7 olarak ifade edilen bir *E. coli* suşunun neden olduğu belirlenmiştir (Riley ve ark 1983, Wells ve ark 1983, Rocchi ve Capozzi 1999, FSIS 2001, Feder ve ark 2003). *E. coli* O157:H7 olarak tanımlanan bu suşun, antijenik, fizikokimyasal ve immunolojik olarak ve biyolojik etkileri yönünden birbirlerinden farklı Stx'e benzer toksinler üreten ve HC ve HUS'a neden olan

EHEC kategorisine ait olduğu tespit edilmiştir (Chinyu ve Brandt 1995, Armstrong ve ark 1996, Reilly1998, Schlundt ve ark 2004, Karch ve ark 2005, Yoon ve Hovde 2008).

Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) adıyla da anılan STEC'lere son yıllarda gıda kaynaklı infeksiyonlarda sıklıkla rastlanmaktadır. STEC'ler içerisinde en önemli serotip, zoonoz olması açısından *E. coli* O157:H7 dir. Bu serotip, etken ile kontamine hayvansal ürünlerin tüketilmesine bağlı olarak insanlarda hemolitik üremik sendrom (HUS), trombotik trombositopenik purpura (TTP) ve hemorojik kolitis (HC) gibi klinik tablolar oluşturması sebebiyle önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir (Chapman ve ark. 1997). Ayrıca bütün dünyada süt ineklerinde görülen mastitisin en önemli nedeni olmaktadır. Ruminantlar özellikle sığırlar ve genç süt inekleri, STEC'nin ve özellikle *E. coli* O157:H7'nin birincil rezervuarı olarak kabul edilmektedir (Zhao ve ark. 1995, Dunn 2003, Caprioli ve ark. 2005).

Sığır ve süt ineklerinde enterohemorajik *E. coli* prevalansına yönelik dünyada ve Türkiye'de pek çok çalışma yapılmıştır. *E. coli* O157 izolasyon oranlarının ülkeler arasında farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir. Sığır populasyonlarında yapılan çalışmalarda *E. coli* O157:H7 prevalansının A.B.D.'nde % 1- 5 (Zhao ve ark. 1995), çeşitli avrupa ülkelerinde % 1-13 (Blanco ve ark. 2001) arasında olduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda dışkıda bulunan etkenlerle sütte bulunan etkenlerin benzerlik gösterdiği bildirilmektedir. Bu benzerlik *E. coli*' nin çevresel bir patojen olduğunun ve sütteki etkenin dışkıdan kaynaklandığının kanıtıdır.

Wells ve ark. (1991) 1266 sağlıklı sığırdan aldıkları süt örneklerinin 18'inde (1.4%) *E. coli* O157:H7 izolasyonu gerçekleştirdiklerini bildirmiştir. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda da yaz aylarında *E. coli* O157:H7 sayısının arttığı tespit edilmiştir (Dunn 2003, Caprioli ve ark. 2005). Aslantaş ve ark. (2006), sığırlarda her ay örnek alarak yaptıkları bir çalışmada, *E. coli* O157:H7 izolasyonunun Temmuz ve Kasım aylarında diğer aylara göre daha yüksek, Şubat ayında ise en düşük gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise tüm örnekler Haziran, Temmuz, Ağustos ve Eylül aylarında toplandığı için mevsimsel bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Çiğ sütlerden *E. coli* O157:H7 izolasyonuna yönelik yapılan çeşitli çalışmalarda, çiğ sütlerde prevalansın oldukça düşük olduğu ve % 0 ile % 10 arasında değiştiği belirtilmektedir (Padhye ve Doyle 1991). Heuvelink ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada,

1011 çiğ süt örneğinden hiç *E. coli* O157 izolasyonu gerçekleşmediğini bildirmişlerdir. İtalya'da yapılan sorbitol-negatif *E. coli* suşlarının araştırıldığı bir çalışmada ise, inek ve keçilere ait toplam 144 çiğ süt örneğinden sadece 1'inden *E. coli* O157:H7 izole edildiği belirtilmiştir (Picozzi ve ark. 2005). Arjantin'de immunomanyetik separasyon yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, 150 süt örneğinin hiç birinden STEC O157 izolasyonu yapılmadığı belirtilmiştir (Roldan ve ark. 2007). Coia ve ark. (1998), inceledikleri 500 çiğ süt örneğinde *E. coli* O157 varlığına rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Massa ve ark.'nın (1999) 100 çiğ süt örneğinde *E. coli* O157:H7 izolasyonunun gerçekleştirilemediği bildirilmiştir. Benzer şekilde, Picozzi ve ark. (2005) tarafından 1011 çiğ süt örneğinin hiç birinden VTEC O157 izolasyonu yapılamadığı belirtilmiştir. Abdul-Raouf ve ark.'nın (1996) 50 inek sütününün 3'ünde (%6) izolasyonun gerçekleştirildiği belirtilmiştir.

Türkiye'de Öksüz ve ark.'nın (2004) çiğ süt ve çiğ süttten yapılmış peynirlerde *E. coli* O157 insidansına yönelik yaptıkları bir çalışmada 100 çiğ süt örneğinden sadece 1'inde (%1) *E. coli* O157 tespit edildiği bildirilmiştir. Bunun sebebinin etkenin izole edildiği hayvanın meme başının etken ile kontamine olmasına bağlayabiliriz. Çiğ süt ve peynir örneklerinde enterohemorajik *E. coli*'ye rastlanma sıklığının araştırıldığı bir başka çalışmada, incelenen 20 çiğ süt örneğinin hiçbirinde *E. coli* O157:H7'nin saptanamadığı belirtilmiştir (Gönül ve ark. 1994). Turutoğlu ve ark. (2002) çiğ sütte *E. coli* O157:H7 varlığının sığır mastitis etkeni olup olmadığını araştırdıkları bir çalışmada 382 mastitisli süt örneğinin hiçbirinde *E. coli* O157:H7 serotipine rastlamamıştır. Aydın ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı çalışmada ise Kayseri yöresinde incelenen 500 adet çiğ süt örneğinin sadece 1 tanesinden (%0.2) *E. coli* O157 tespit ettiklerini bildirmiştir. Süt örneklerinden elde edilen sonuçlar kıyaslandığında Coia ve ark. (1998), Massa ve ark. (1999)'nindeğerlerinden yüksek, Picozzi ve ark. (2005) değerleri ile paralel iken Abdul-Raouf ve ark.'nın (1996) bulunduğu değerlerden daha düşük oranda olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada ise incelenen 160 mastitisli süt örneğinin 31 adedinde (%19.37) *E. coli* tespit edildi. Çiğ sütlerden *E. coli* O157:H7 izolasyonuna yönelik yapılan çeşitli çalışmalarda, çiğ sütlerde prevalansın oldukça düşük olduğu ve % 0 ile % 10 arasında değiştiği belirtilmektedir (Padhye ve Doyle, 1991). Yaptığımız çalışmada ise izolasyon oranının Türkiye'de ve dünyada bulunan değerlerden daha yüksek oranda olduğu görülmektedir. Burada örneklemenin subklinik mastitisli süt sığırlarından yapılması da önemli bir yer turmaktadır.

İncelenen süt numunelerinin bulguları, Türkiye’de ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarla farklılık göstermektedir. Ülkemizde ve dünya ülkelerindeki sığırlarda ve sütlerde *E. coli* izolasyon oranlarının belirlenmesine yönelik araştırmalar kıyaslandığında farklı oranların bulunması, kullanılan izolasyon yöntemlerindeki farklılık, coğrafik, hayvanların beslenmesi ve süt sağım esnasındaki hijyenik koşullarının farklılığı yada işletmelerdeki personelin hijyene yeterince dikkat etmemesi gösterilebilir. Yine bu bulgulardan farklı olarak incelenen hayvanların yaş grupları ve cinsiyetleri de oransal değişimde etkili olabilir. Aynı zamanda mevsimsel farklılıklarda önemli bir etken sayılabilmektedir.

23 yıl boyunca Kuzey Amerika’ da yapılan çalışmalarda, *E. coli* O157:H7’nin insan hastalıklarının temelini oluşturduğu bildirilmiştir (Riley ve ark. 1983). NonO157 STEC suşlarının %50 den fazlasının patojenitesi bilinmektedir (WHO 1998). Bu suşların bazıları dünya çapında insan hastalıklarının kaynağını oluşturmaktadır (Mariani-Kurkdjian ve ark. 1993, Karch ve ark. 1997, Morabito ve ark. 1998). *E. coli* O26:H11, O26:H, O91:H10, O91:H21, O103:H2, O103:H, O111:H2, O111:H8 ve O111:H bu suşlara örnek olarak verilmektedir (WHO 1998, Blanco ve ark. 2003, Bettelheim 2006). Tüm STEC suşları insanlar için zararlı olmamakla beraber, STEC patojenitesi önemli virulans faktörlerin üretimine bağlıdır. Patojenik STEC suşları genellikle *Shigella dysenteriae* benzeyen, 1 veya 2 toksin ürettiği bilinen Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) olarak adlandırılmaktadır (O’Brien ve Holmes 1987). Bu toksinler Shiga Toksin 1 (*Stx1*) ve Shiga Toksin 2 (*Stx2*) olarak bilinmektedir.

Stx1 ve *Stx2* farklı genler (*stx1* ve *stx2*, sırasıyla) tarafından kodlanan farklı proteinler olmasına rağmen bu genlerin biyolojik aktiviteleri aynıdır (Acheson ve Keusch 1996, Neill 1997). Bu aktiviteler; konak hücre ribozomunun özel kalıntılarının depurinasyonu (purin bazı kaybı), ribozomların aminoasit tRNA’ ya bağlanmasının engellenmesi ve protein sentezinin inhibe olmasını içermektedir (Saxena ve ark. 1989). Bu toksinler bağırsak, böbrek ve beyindeki endothelial hücrelere bağlanarak zarar vermektedir (Acheson ve Keusch, 1996). Bunun sonucunda küçük pıhtı oluşumu ve böbrek içindeki kapillerin hasara uğraması gözlenmektedir (Acheson ve Keusch, 1996). Çeşitli STEC suşların insan hastalıklarına neden olan farklı toksinler ürettiği bilinmektedir (Bettelheim, 2003; Blanco ve ark. 2003) (Karmali ve ark. 1985, Jacewicz ve ark. 2000). Ancak insan hastalıklarına *Stx1*, *Stx2* yada her iki

toksini de içeren STEC suşları neden olmaktadır (Lior 1994, Willshaw ve ark. 1997, Bonnet ve ark. 1998).

Patojenik STEC suşları Shiga toksinlerinin yanı sıra ciddi insan hastalıklarına neden olan diğer virulans faktörleri de üretmektedir (Paton ve Paton 2000). Bu faktörler; intimin ve enterohemolizini kapsamaktadır (Saunders ve ark. 1999, Donnenberg 2002). Bu virulans faktörleri (örn: intimin ve enterohemolizin) *eae* ve *ehxA* genleri tarafından kodlanmaktadır. Bu genler hemen hemen tüm *E. coli* O157 suşlarında bulunmaktadır (Neill 1997). Aynı zamanda bu genlerin patojenik non O157 STEC suşlarında daha yaygın olduğu görülmektedir (Beutin ve ark. 1994). *EhxA* ve *eae* yoksun bazı STEC suşlarında insan hastalıklarına neden olması, bu genlerin patojenitede etkili olmadığını göstermektedir (Neill 1997). Her bir STEC suşu potansiyel bir EHEC olarak kabul edilmektedir (Bürk ve ark. 2002). Ancak birçok STEC suşunun hala insan hastalıkları ile ilişkisi bulunmamaktadır.

STEC suşları çok sayıda potansiyel virulans determinantlarına sahiptir. STEC virulansı tek bir gene yada gen ürünlerine bağımlı değildir. STEC virulansının multi-faktöriyel bir süreç olduğu bilinmektedir (Law 2000). Bu patojenler asidik gıdalar ve kirli sularda varlığını sürdürmektedir. Ağız yoluyla alınan patojenlerin, midenin asidik ortamı yardımıyla bağırsağa geçişi sağlanmaktadır. İntimin içeren adhezinler yardımıyla bağırsak kolonizasyonu, Shiga toksin üretimi ile STEC patogenezi sağlanmaktadır (Boerlin ve ark. 1999). Fakat intimin negatif STEC suşları, insanlarda hastalık kaynağı olarak bilinmektedir (Paton ve ark. 1999). STEC O157:H7 dışındaki stx üreten ve intimin ekspresyonunu sağlayan STEC serogruplarının düşük skalada hastalık etkeni olarak görülmemesinin nedeni anlaşılmamaktadır.

Shiga toksin (*stx*), sadece STEC suşlarını diğer diyarojenik *E. coli* gruplarından ayırmaz, aynı zamanda insan hastalıklarında önemli bir rol oynar. İntestinal epitelyum hücrelerine tutunma STEC enfeksiyonunun en önemli özelliğidir. STEC ve epitel hücreleri arasındaki etkileşim *eae* pozitif ve *eae* negatif STEC suşları arasında farklılık göstermektedir. *eae*-pozitif STEC suşları, bağırsak epitelyum hücrelerindeki karakteristik AE lezyonları üzerinde bulunmaktadır (Nataro ve Kaper 1998, Kaper ve ark. 2004). AE lezyonları insanlarda görülen kanlı ishal ve HUS için önemli bir faktör olmamasına rağmen bu sendromlardan sorumlu suşların büyük çoğunluğu *eae* genine sahip olmaktadır. Böylece EHEC suşlarının çoğu *eae*-pozitif olarak tanımlanmaktadır ve *eae* geni hemolitik üremik

sendrom vakalarında önemli bir risk faktörü olarak ifade edilmektedir (Ethelberg ve ark. 2004).

Yapısal olarak birbirine benzeyen Stx1 ve Stx2' nin toksisite oluşumunda farklılıklar vardır. Epidemiyolojik çalışmalar, Stx2 üreten STEC suşlarının HUS sendromu gibi ciddi insan hastalıklarına neden olduğunu göstermektedir (Ostroff ve ark. 1989, Kleanthous ve ark. 1990, Boerlin ve ark. 1999). İnsan-böbrek mikrovasküler endotelial hücrelerin, Stx2' nin sitotoksik etkisine karşı duyarlılığı Stx1' in etkisine göre daha fazladır (Louise ve Obrig 1995). Jacewicz ve arkadaşları (1999); insan intestinal mikrovasküler endotelial hücreler için Stx2' nin Stx1' e göre daha toksik olduğunu bildirmiştir. Bazı Stx2 varyantları (*stx2c*), proteolitik enzim yardımıyla aktif hale gelebilmektedir (Melton-Celsa ve ark. 1996). Sadece Stx1 üreten STEC suşları, HUS sendromlu hastalarda bulunmaktadır (Willshaw ve ark. 1992, Gyles ve ark. 1998).

EhxA toksininin temel fonksiyonu; in-vivo koşullarda eritrositleri lize etmek, hemoglobini dışarıya salmak ve böylece bağırsakta STEC suşlarının varlığını arttırmaktır (Law ve Kelly 1995). Bir çalışmada ehxA ifadesi ile stx üretimi arasında güçlü bir ilişki bulunduğu saptanmıştır (Beutin ve ark. 1989, Bettelheim 1995, Boerlin ve ark. 1999). Son zamanlarda Gyles ve arkadaşları (1998), insanlarla ilişkili olan hastalıklarda EhxA ekspresyonu bulunan serotiplerin ,bu genin ekspresyonunun bulunmadığı serotiplerden daha fazla oranla izole edildiğini bildirmişlerdir.

Son 25 yılda Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nün, sığırdaki STEC dağılımı ile ilgili yayınlanan raporlarında 121 O serogrubu, 4 yeni E serogrubu ve 373 serotipi içeren suşların varlığı bildirilmiştir. Bu STEC serotiplerinin 65 adedi HUS hastalarından izole edilirken, 62 adedinin ise orta ya da kanlı ishal, karın krampları ve HC gibi insan hastalıklarının nedeni olduğu bilinmektedir (WHO 1998, Blanco ve ark. 2003, Bettelheim 2006). STEC kontaminasyonlu sığırlar ile ilgili yayınlanan raporların değerlendirilmesi sonucunda 98 O serogrubu, 2 yeni geçici O serogrubu ve 162 serotiplere ait suşların izolasyonu sağlanmıştır

STEC suşlarının virulans genleri ve serogruplarının belirlenmesinin amaçlandığı çalışmamızda ise, sığırlardan alınan 160 mastitisli süt örneğinden toplam 31 *E. coli* izole edildi. Araştırmamızın serogruplandırma sonuçları değerlendirildiğinde 31 suşun 8 (% 25.8)' inde polivalan antiserum II, 14 (% 45.2)'ünde polivalan antiserum III, 9 (% 29.03)'unda ise polivalan antiserum IV pozitif olarak saptandı. *E. coli* izolatlarında O26, O44, O55, O86,

O111, O112, O114, O119, O124, O125, O126, O127, O128 ve O142 serogrupları tespit edildi.

Wang ve ark. (2002) , 81 *E. coli* O157:H7 suşunun virulans faktörlerini araştırdıkları bir çalışmada, 32 (%39) suşun VT1, 68 suşunda VT2 (%83) ürettiklerini belirtmişlerdir. Momtaz'ın 2010 yılında yaptığı bir çalışmasında, 400 mastitisli süttten izole edilen 42 (%10) *E. coli* suşunun virulans faktörleri araştırılmış ve sonuç olarak 14 (%33) suşun *eaeA*, 10 (%23) suşun ise *stx1* ve *stx2* genlerine sahip olduğu bildirilmiştir. Lira ve ark. 2004 yılında Brezilya'da yaptığı çalışmasında, 2144 mastitisli süttten izole edilen 182 (%8) *E. coli* suşunun virulans faktörlerini araştırmıştır. Bu çalışma sonucunda 22 STEC (%12.08) suşu saptanırken, 22 STEC suşunun 11'inde (%50) *eae*, 5' inde (%22.7) *stx1*, 10' unda (%45.5) *stx2* ve 7 suşda (%31.8) ise *stx1* ile *stx2* genini birlikte taşıdığı bildirilmiştir.

Güler ve ark.(2006) , klinik inek mastitislerinden izole edilen *E. coli* suşlarında potansiyel virulans faktörlerini araştırdıkları çalışmasında ise 100 *E. coli* suşunun sadece 1 (%1) adedinde *eae A* geni tespit edilmiştir. Wenz ve ark.(2006) ' da 123 mastitis izolatının sadece birinde *eaeA* genini saptamıştır. Bazı çalışmalarda da *E. coli* suşlarının Shiga toksin genlerine sahip olmadığı bildirilmiştir (Lipman ve ark. 1995, Murinda ve ark. 2004). Buna karşılık Barrow ve Hill(1989) inceledikleri 237 *E. coli* suşunun sadece 1' inin Stx ürettiğini bildirmiştir. Stephan ve Kühn yaptıkları bir çalışmada (1999), inceledikleri 145 örneğin 4' ünde *ehly* geni ile birlikte *stx* (%2.7) varlığını saptamıştır. Bean ve ark.(2004) ise yaptığı çalışmada, incelediği 80 süt numunesinin %31' inde *stx1*, %3.5' unda ise *eaeA* varlığı tespit edilmiştir.

Farklı ülkelerde yapılan çalışmalar, sığırların % 10-80 oranında STEC taşıdığını bildirmiştir (Wells ve ark. 1991, Beutin ve ark. 1993, Blanco ve ark.1996, Cobbold ve Desmarchelier 2000, Lira ve ark. 2004). Bu çalışmada multipleks PCR yöntemi ile 31 *E. coli* suşunun 6 'sının (%19.3) *stx1, stx2* ve *eae* genlerini taşıyan STEC suşları olduğu saptandı. 6 STEC suşunun 5 adedinde (%83.3) *eae* geni mevcut iken; sadece 1' inde(%16.6) *stx1* geni tespit edildi. Suşlarımızın hiçbirinde *stx2* geninin varlığı saptanmadı. Çalışmamızdaki bulgular, Türkiye'de ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalardaki STEC oranı ile paralellik göstermektedir.

Araştırmamızda STEC suşlarının virulans genleri yönünden izole edilen 31 *E. coli* suşu incelendi. Süt örneklerinden izole edilen *E. coli*' lerden 6 tanesi STEC olarak saptandı.

31 *E. coli* suşunun 6 adet STEC suşunun (%19.3) 5 (% 83.3)'inde *eae* geni mevcut iken, 1' inde (% 16.6) sadece *stxI* geni bulunduğu tespit edilmiştir.

Mastitisli süttten izole edilen *E. coli* serotipleri fekal izolatlar ile benzerlik göstermektedir. Bu durum çiğ süt örneklerinden izole edilen *E. coli* O157:H7 serotipinin fekal kökenli olduğunun bir göstergesidir (Padhye ve Doyle 1991, Rubini ve ark. 1999, Garber ve ark. 1999, Harmon ve ark. 1990). Sığırlarda mastitise neden olan fekal kökenli *E. coli* serotipi, aynı zamanda hemolitik üremik sendrom (HUS) ve hemorajik kolitis (HC) gibi ciddi insan hastalıklarının kaynağını oluşturmaktadır (Karmali ve ark. 1985, Salmon ve ark. 1989).

Eae geni, Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) patotipine ait A/E lezyonlarının oluşumundan sorumlu önemli bir virulans faktördür. Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalarda insanlarda ciddi hastalıklara neden olan STEC suşlarında bulunmadığı görülmektedir (Dytoc ve ark. 1994). Hemolitik üremik sendrom (HUS) gibi birçok sporadik vakada *eae*-negatif non-O157 STEC suşlarının etken olması, hastalığın patogenezisinde intiminin önemli olmadığını göstermektedir. Bazı çalışmalarda ise ciddi hastalıklara neden olan *eae*-pozitif STEC suşlarında, enterohemolizin (*hly* geni) varlığı saptanmıştır. Bakterilerin demir ihtiyacını karşılamak için ferro salınımını gerçekleştiren hemolizin, intestinal ve ekstraintestinal hastalıkların oluşumuna katkı sağlamaktadır (Yamamoto ve ark. 1995, Rey ve ark. 2003). Epidemiyolojik çalışmalar ise, üropatojenik enfeksiyon ve sepsise neden olan *E. coli* suşlarının α -hemolizin ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Yamamoto ve ark. 1995). Non-O157 STEC suşlarında enterohemolizin (*hly* geni) insidansı, CVD419 probu hibridizasyonu ile ortaya konulmaktadır.

Günümüzde *E. coli* O157:H7 ve spesifik virulans genlerin belirlenmesinde multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği sıklıkla kullanılmaktadır. PCR, DNA'nın ortamda polimeraz enzimi ve DNA sentezi için uygun maddeler bulunması halinde karşıt sıralarını sentezleyebilme yeteneğinden faydalanılarak oluşturulan bir reaksiyondur. DNA ve RNA dizilerinin sayısal olarak arttırılması esasına dayanan PCR'in en önemli özelliği seçilmiş bir DNA dizisini çoğaltarak istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasını engellemesidir. Bu özellik sadece dizinin tanınmasını kolaylaştırmakla kalmaz, ayrıca DNA'nın analiz edilmesini de sağlamaktadır. (Kong ve ark. 2002). PCR ile virulans faktör genleri teşhis edilebilmekte ve böylece serotip tanımlanabilmektedir. O veya H antijeni, *Stx* genleri, 60 Mda plazmid gibi virulans faktörleri tespit edilerek *E. coli* O157:H7 serotipi

belirlenmektedir. PCR tekniğinin de *E. coli* O157:H7 'nin diğer *E. coli* serotiplerinden ve diğer gram negatif bakterilerden ayrılmasında duyarlı ve hızlı bir yöntem olduğu belirtilmektedir (Dunn 2003, Kim ve ark. 2005, Jin ve ark. 2005).

5. SONUÇ

Aydın yöresindeki sığır işletmelerinden alınan mastitisli süt örneklerinin *E. coli* açısından kontrol edilmesi ve sero gruplandırma ile birlikte toksin saptanmasının hedeflendiği bu çalışmada, sığırlardan alınan 160 mastitisli süt örneğinden toplam 31 *Escherichia coli* izole edildi. Süt örneklerinden izole edilen *E. coli* 'lerden 6 adedi STEC pozitif olarak saptandı. 6 (%19.3) STEC pozitif suşun 5 (% 83.3)'inde *eae* geni mevcut iken, 1' inde (% 16.6) sadece *stx1* geni bulunduğu tespit edilmiştir. STEC pozitif suşlarının hiçbirinde *stx2* geni bulunmadı. Multipleks PCR; tek bir reaksiyon ile kısa süre içinde birden fazla hedef tespitini sağlayan hızlı bir yöntemdir. Kullandığımız multipleks PCR yöntemi ile enterohemorajik *E. coli* olarak bilinen 6 suşun% 16.6 'sının *stx1* genini, % 83.3' ünün ise *eae* genini taşıdığı ortaya konuldu. Böylece Aydın ili ve çevresindeki sığırlarda *E. coli* varlığı ve shiga toksin 1 ürettikleri gösterilmiş oldu. Aynı zamanda Polivalan II, Polivalan III ve Polivalan IV seraları ile *E. coli* izolatlarına uygulanan lam aglutinasyon testi sonucunda *Escherichia coli* suşunun sero grupları belirlendi. Bu değerlendirmeye göre 31 izolatın 8' i polivalan antiserum II, 14'ü polivalan antiserum III ve 9'u ise polivalan antiserum IV pozitif olarak saptandı. Buna göre çalışmamızdaki izolatların sero grupları; O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 ve O158 olarak belirlendi.

EPEC bakterisinin bir suşu olarak bilinen *E. coli* O157:H7' nin Shiga toksin genlerini kazanmasıyla daha virulent bir organizma olarak gelişmekte ve STEC adıyla anılmaktadır. Aynı zamanda kanlı ishal (HC) ve hemolitik üremik sendrom (HUS) gibi birçok ciddi insan hastalıklarına da neden olan STEC suşlarının büyük çoğunluğunda *stx2* saptanmıştır. Bu durum *stx2*' nin insan sağlığı için patojen bir etken olduğunun, *stx1* genin ise normal florada da bulunduğu göstergesi olmaktadır. Genellikle enteropatojenik *E. coli* suşlarında bulunan intimin (*eae*) geni ise, A/E lezyonlarının oluşumunda görevlidir. Fakat bu gen enterohemorajik serotiplere sahip STEC suşlarının çoğunda da varlığını sürdürmektedir. *eae*

önemli bir virulans faktör olmasına rağmen insanlarda ciddi hastalıklara neden olan STEC suşlarında bulunmamaktadır. Çalışmamızda ise STEC suşlarının hiçbirinde *stx2* genine rastlanmazken, %83.3 'ünde *eae* varlığı dikkat çekmektedir.

Bu çalışma ile Aydın ili çevresinde bulunan sığırlardan *E. coli* izolasyonu, izole edilen suşların serogruplandırılması gerçekleştirildi ve izole edilen *E. coli* suşlarının shiga toksin ve intimin üretilip üretilmediği belirlendi. Elde edilen bulgular ışığında, sığır mastitislerinde Shiga toksin üreten *E. coli*' lerin etiolojide önemli bir rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır.

Bu çalışma ile; *E. coli*' nin insanlar için patojen olduğu ve dünyada letal etkili bir çok salgına yol açtığı göz önüne alınırsa, sığır işletmelerinden başlayarak gıda üretim yerlerinde, hammaddeden son ürüne kadar genel hijyenik kuralların uygulanmasının ve kros-kontaminasyonu engelleyici önlemlerin alınmasının gerekliliği ortaya konulmuştur.

ÖZET

Mastitisli sığırlardan izole edilen shiga toksini üreten *Escherichia coli* suşlarının virulans faktörlerinin saptanması

Shiga toksini üreten *Escherichia coli* (STEC) kanlı ishal, hemorajik kolitis ve hemolitik üremik sendromu gibi ciddi insan hastalıklarına neden olan önemli bir patojendir. STEC, gelişmiş ülkelerin oldukça önemli bir sorunudur. STEC suşlarının genel habitatu, özellikle sığır ve koyun gibi ruminantların intestinal sistemleridir. Sığır ve koyun gibi ruminantların dışkıları ile kontamine gıdalar, insanlarda enfeksiyonların temel kaynağını oluşturmaktadır.

Bu çalışmada, Aydın ilindeki sığırlarda mastitisli sütlerden izole edilen shiga toksini üreten *Escherichia coli* (STEC) suşlarında intimin (*eaeA*), *stx1* ve *stx2* genlerinin varlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile belirlenmesi, bu izolatların serogruplandırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda subklinik mastitisli olarak belirlenen 160 sığırdan 160 süt örneği materyal olarak kullanıldı. Fenotipik identifikasyon ile *E. coli* olarak belirlenen 31 izolatın, genotipik olarak intimin (*eaeA*) ve shiga toksin (*stx1* ve *stx2*) genlerinin incelenmesi ile 6 izolatın STEC olduğu saptandı. İzolatlarda intimin (*eaeA*) ve shiga toksin (*stx1* ve *stx2*) genlerinin varlığı, PCR ile spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirildi. *E. coli* izolatları; O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 ve O158 serogruplarına karşı polivalan (II, III ve IV) sera kullanarak lam aglütinasyon testi ile tespit edildi. PolivalanII, PolivalanIII ve Polivalan IV seraları ile bu izolatlara lam aglütinasyon testi uygulandı. Yapılan lam aglütinasyon testi sonucunda *Escherichia coli* suşunun serogrupları belirlendi. Bu değerlendirmeye göre 31 izolatın 8' i polivalan antiserum II, 14'ü polivalan antiserum III ve 9'u ise polivalan antiserum IV pozitif olarak saptandı. Sığırlarda, intimin (*eaeA*) pozitif STEC suşlarının neden oldukları enfeksiyonların durumunu açıklığa kavuşturulabilmesi için, bu konuda daha geniş kapsamlı epidemiyolojik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli*, STEC, Mastitis, Shiga toksin (*stx1* ve *stx2*), İntimin (*eaeA*), Serogruplandırma, PCR

SUMMARY

Determining virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis

Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) is a major pathogen causing severe diseases in humans, like diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic-uraemic syndrome. The usual habitat of STEC is the intestinal tract of ruminants, especially cattle. STEC is an important problem in development countries. Foods that become contaminated with faeces from these animals serve as the primary source of human infection.

The aim of this study is to determine the presence of shiga toxin (*stx1* and *stx2*) and intimin (*eaeA*) genes in shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) strains that isolated from bovine milk in Aydın with Polimerase Chain Reaction (PCR) and serotyping of these isolates. The material of our study were consisted to 160 milk samples taken from 160 subclinic mastitic dairy cows. By phenotypical identification, 31 isolates that were determined as *Escherichia coli* were also performed genetically identification. The presence of shiga toxin (*stx1* and *stx2*) and intimin (*eaeA*) genes in this isolates was revealed with multiplex PCR using spesific primers. *E. coli* isolates were identified to determine O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 and O158 serotypes by slide agglutination method with polyvalent (II, III and IV) sera. These isolates was carried out using the slide agglutination method with polyvalent II, polyvalent III and polyvalent IV sera. *E. coli* serotypes were determined using the slide agglutination method. According to this assessment, a total of 8 of 31 isolates were identified as polyvalent II, 14 of 31 isolates were identified as polyvalent III and 9 of 31 isolates were identified as polyvalent IV. For investigation of the precise status of the infections caused by *eaeA* positive STEC strains in dairy cows further epidemiologic studies should be designed.

Key words: *Escherichia coli*, STEC, Mastitis, Shiga toxin (*stx1* and *stx2*), Intimin (*eaeA*), Serogrouping, PCR

KAYNAKLAR

Abdul-Raouf UM, Ammar MS, Beuchat LR. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from some Egyptian foods. Int. J. Food Microbiol. 1996; 29: 423-426.

Abe A, de Grado M, Pfuetzner RA, Sanchez-Sanmartin C, Devinney R, Puente JL, Strynadka NC, Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion. Mol. Microbiol. 1999;33:1162-1175.

Acheson DWK, Keusch GT. Which Shiga toxin-producing types of *E. coli* are important? ASM News. 1996; 62:302–306.

Adu-Bobie J, Frankel G, Bain C, Goncalves AG, Trabulsi LR, Douce G, Knutton S, Dougan G. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. J. Clin. Microbiol. 1998; 36:662-668.

Albert MJ, Faruque SM, Ansaruzzaman M, Islam MM, Haider K, Alain K, Kabir L, Robins-Browne R. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. J. Med. Microbiol. 1992; 37:310-314.

Anonim 1 http://www.microbionet.com.au/frames/feature_brief01/vtec/.html Erişim tarihi 25.04.2012

Anonim 2 <http://www.biotech.ubc.ca/faculty/finlay/EPEC.HTM> Erişim tarihi 15.05.2012

Arab S, Lingwood CA. Influence of phospholipid chain length on verotoxin/globotriaosyl ceramide binding in model membranes: comparison of a supported bilayer film and liposomes. Glycoconjugate J. 1996;13:159-166.

Armstrong G, Hollingsworth LJ, Morris Jr JG. Emerging foodborne pathogens; *Escherichia coli* O157:H7 as a mode? of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. Epidemiol. Rev. 1996;18:29-51.

Aslantaş O, Erdoğan S, Cantekin Z, Gülaçtı I, Evrendilek G.A. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from Turkish cattle, J. Food Microbiol. 2006; 106(3):338-42.

Austin PR, Jablonski PE, Bobach GA, Dunker AK, Hovde CJ. Evidence that the A2 fragment of Shiga-like toxin type I is required for holotoxin integrity. *Infect. Immun.* 1994;62:1768-1775.

Aydın F, İça T, Yontar A. Investigation with Conventional and Molecular Method of *Escherichia coli* O157:H7 in Dairy Cattle in Kayseri Region. *J. Health Sci.* 19. 2010; No 3 , 159–166.

Barba J, Bustamante VH, Flores-Valdez MA, Deng W, Finlay BB, Puente JL. A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J. Bacteriol.* 2005; 187:7918–7930.

Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007; 23:1620.

Barrett TJ, Kaper JB, Jerse AE, Wachsmuth LK. Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. *J. Infect. Dis.* 1992;165:979-980.

Barrow PA, Hill AW. The virulence characteristics of strains of *Escherichia coli* isolated from cases of bovine mastitis in England and Wales. *Vet. Microbiol.* 1989; 20: 35-48.

Bast DJ, Banerjee L, Clark C, Read RJ, Brunton JL. The identification of three biologically relevant globotriaosyl ceramide receptor binding sites on the Verotoxin 1 B subunit. *Mol. Microbiol.* 1999; 32:953-960.

Bastian SN, Carle I, Grinont F. Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of stx genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 1998; 149:457-472.

Batchelor M, Prasannan S, Daniell S, Reece S, Connerton L, Bloomberg G, Dougan G, Frankel G, Matthews S. Structural basis for recognition of the translocated intimin receptor (Tir) by intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO J.* 2000; 19:2452-2464.

Bauer ME, Welch RA. Characterization of an RTX toxin from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 1996; 64:167-175

Bean A, Williamson J, Cursons RT. Virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from mastitic milk. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health,* 2004; 51: 285-287.

Begum D, Strockbine NA, Sowers EG, Jackson MP. Evaluation of a technique for identification of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled probes. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:3153- 3156.

Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, Bartleson CA, Lewis JH, Barrett TJ, Wells JG. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA.* 1994; 272:1349–1353.

Berin MC, Darfeuille-Michaud A, Egan LJ, Miyamoto Y, Kagnoff MF. Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF-kappaB and MAP

kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. *Cell. Microbiol.* 2002; 4:635–648.

Bertin Y, Boukhors K, Pradel N, Livrelli V, Martin C. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France-Detection of a new stx2 subtype and correlation with additional virulence factors *J. Clin. Microbiol.* 2001;39:3060-3065.

Bettelheim KA, Lennox-King SM. The acquisition of *Escherichia coli* by new-born babies. *Infection.* 1976; 4:174-179.

Bettelheim KA. Identification of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* by means of their production of enterohaemolysin. *J. Appl. Bacteriol.* 1995; 79:178-180.

Bettelheim KA, Bensink JC, Sidjabat-Tambunan H. Serotypes of verotoxin-producing (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli* isolated from healthy sheep. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2000; 23:1-7.

Bettelheim KA. Non-O157 verotoxin-producing *Escherichia coli*: A problem, paradox, and paradigm. *Exp. Biol. Med.* 2003; 228:333–344.

Bettelheim KA. Serotypes of VTEC: The VTEC Table. <http://www.microbionet.com.au/vtetable.htm> Accessed Jan. 9, 2006.

Beutin L, Montenegro MA, Orskov L, Orskov F, Prada J, Zimmermann S, Stephan R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohaemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27:2559- 2564.

Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Schentz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:2483-2488.

Beutin L, Aleksic S, Zimmermann S, Gleier K. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. *Med. Microbiol. Immun.* 1994;183:13-21.

Beutin I, Geier D, Zimmermann S, Karih H. Virulence markers of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:631-635.

Beutin L, Geier D, Zimmermann S, Aleksic S, Gillespie HA, Whittam TS. Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63:2175-2180.

Bidet P, Mariani-Kurkdjian P, Grimont F, Brahimi N, Courroux C, Grimont P, Bingen E. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France, *J. Med. Microbiol.* 2005; 54: 71-75.

Bieber D, Ramer SW, Wu CY, Murray WJ, Tobe I, Fernandez R, Schoolnik GK. Type IV pill, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 1998; 280:2114-2118.

Bisping W, Amtsberg G. Colour atlas for the diagnosis of bacterial pathogens in animals, Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. 1988; p:160-168.

Bitzan M, Richardson S, Huang C, Boyd B, Petric M, Karmali MA. Evidence that verotoxins (Shiga-like toxins) from *Escherichia coli* bind to P blood group antigens of human erythrocytes in vitro. *Infect. Immun.* 1994; 62:3337-3347.

Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Gonzalez EA, Mora A, Prado C, Fernandez I, Rio M. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. *Epidemiology and Infection.* 1996; 117:251–257.

Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Alonso MP, Gonzales EA, Bernardez MI. Epidemiology of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in Ruminants. In: Verocytotoxigenic *Escherichia coli*, Ed.: G. Duffy, P. Garvey, D.A. McDowell. Trumbull, Connecticut, USA: Food & Nutrition Press. 2001, p: 113-148.

Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Gonzalez EA, Bernardez MI, Alonso MP, Coira A, Rodriguez A, Rey J, Alonso JM, Usera MA. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: Prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp. Biol. Med.* 2003; 228:345–351.

Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, Gonzalez EA, Bernardez MI, Blanco J. 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.* 2004b; 42:645–651.

Blanco M, Schumacher S, Tasara T, Zweifel C, Blanco JE, Dahbi G, Blanco J, Stephan R. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-eta2). *BMC Microbiol.* 2005; 5:23.

Blattner FR, Plunkett GR, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew A. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997; 277:1453-1474.

Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson B, Johnson RP, Gyles CL. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans, *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:497-503.

Bonnet R, Souweine B, Gauthier G, Rich C, Livrelli V, Sirot J, Joly B, Forestier C. Non-O157:H7 Stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of haemolytic-uremic syndrome in adults. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36:1777-1780.

Boyd B, Lingwood C. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron.* 1989; 51:207-210.

Boyd B, Magnusson G, Zhiuyan Z, Lingwood CA. Lipid modulation of glycolipid receptor function. Availability of Gal(alpha 1-4)Gal disaccharide for verotoxin binding in natural and synthetic glycolipids. *Eur. J. Biochem.*1994; 223:873-878.

Brooks BJ, Mollison BD, Bettelheim KA, Matejka K, Paterson KA, Ward VK. Occurrence and virulence factors of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meat in Dunedin, New Zealand. *Lett. Appl Microbiol.* 2001; 32:118- 122.

Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *J. Infect. Dis.*2005; 192:1422–1429.

Brown CA, Harmon BG, Zhao T, Doyle MP. Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. *Appl. Environ. Microbiol.*1997; **63**:27-32.

Brunder W, Schmidt H, Karch H. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 *Microbiology.* 1996;142:3305-3315.

Brunder W, Schmidt H, Karch H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol. Microbiol.* 1997; 24:767-778.

Burland V, Shao Y, Perna NT, Plunkett G, Sofia HJ, Blattner FR. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:117. *Nucleic Acids Res.*1998; 26:4196-4204,

Butler DG, Clarke RC. Diarrhoea and dysentery in calves. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C. L. Gyles ed. CAB International, Wallingford. U.K. 1994; p. 91-116.

Bürk C, Braumiller IGB, Becker H, Martlbauer E. Nuclease fluorescence assay for the detection of verotoxin genes in raw milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 2002; 35:153–156.

Cameron AS, Beers MY, Walker CC, Rose N, Aneer E, Manatakis Z, Kirke K, Calder L, Jenkins F, Goldwater PN, Paton A, Paton J, Jureidini K, Hoffman A, Henning P, Hansman D, Lawrence A, Miller R, Ratcliff R, Doyle R, Murray C, Davos D, Cameron P, Seymour-Murray J, Linn J, Lanser I, Selvey L, Beaton S. Community outbreak of haemolytic uraemic syndrome attributable to *Escherichia coli* O111:NM - South Australia, 1995. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 44:550-558.

Cantarelli VV, Takahashi A, Akeda Y, Nagayama K, Honda T. Interaction of enteropathogenic or enterohaemorrhagic *Escherichia coli* with HeLa cells results in translocation of cortactin to the bacterial adherence site. *Infect. Immun.*2000;68:382-386.

Caprioli A, Tozzi AE. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in continental Europe. In Kaper JB, O'Brien AD (ed), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. 1998; p. 38-48. ASM Press, Washington, DC.

Caprioli A, Tozzi AE, Rizzoni G, Karch H. Non-0157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 1997; 3:578-579.

Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Emerging Issues on Virulence and Modes of Transmission, *Vet. Res.* 36.2005; p :289-311.

Cebula TA, Payne YVL, Feng P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:248-250.

Chandler ME, Bettelheim KA. A rapid method of identifying *Escherichia coli* H antigens. *Zentralbl Bakteriol. Hyg. Abt. Orig. A.* 1974; 129:74-79.

Chapman PA, Siddons CA, Zadik PM, Jewes L. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.* 1991;35:107-110.

Chart H. Are all infections with *Escherichia coli* O157 associated with cattle? *Lancet.* 1998;352:1005.

Chatterjee S, Kwiterovich POJ. Glycosphingolipids and plasma lipoproteins; a review. *Canadian J. Biochem. Cell Biol.* 1984; 62:385-397.

China B, Vinciane P, Mainil J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; p. 3462–3465.

Cheetham BF, Katz ME. A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol. Microbiol.* 1995; 18:201-208.

Chinyu S, Brandt LJ. *Escherichia coli* O157: H7 infection in humans, *Annals of Internal Medicine.* 1995; 123 (9): 698-707.

Clarke MB, Sperandio V. Events at the host-microbial interface of the gastrointestinal tract III. Cell-to-cell signaling among microbial flora, host, and pathogens: there is a whole lot of talking going on. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2005; 288:G1105–G1109.

Cobbold, R, Desmarchelier P. A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Vet. Microbiol.* 2000; 71:125–137.

Coia JE. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 1998; 20: 1-9.

Cooling LL, Walker KE, Gille T, Koerner TA. Shiga toxin binds human platelets via globotriaosylceramide (Pk antigen) and a novel platelet glycosphingolipid. *Infect. Immun.* 1998; 66:4355-4366.

Crane JK, Wehner MS, Bolen EJ, Sando JJ, Linden J, Guerrant RL, Sears CL. Regulation of intestinal guanylate cyclase by the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (STa) and protein kinase C. *Infect. Immun.* 1992; 60:5004-5012.

Cray WCJ, Moon HW. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61:1586-1590.

Dahan S, Wiles S, La Ragione RM, Best A, Woodward MJ, Stevens MP, Shaw RK, Chong Y, Knutton S, Phillips A, Frankel G. EspJ is a prophage-carried type III effector protein of attaching and effacing pathogens that modulates infection dynamics. *Infect. Immun.* 2005; 73:679-786.

Datz M, Janetzki-Mittmann C, Franke S, Gunzer F, Schmidt H, Karch H. Analysis of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 DNA region containing lambdoid phage gene p and Shiga-like toxin structural genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62:791-797.

de Grado M, Abe A, Gauthier A, Steele-Mortimer O, DeVinney R, Finlay BB. Identification of the intimin-binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiol.* 1999;1:7-17.

de Jonge R, Takumi K, Ritmeester WS, van Leusden FM. The adaptive response of *Escherichia coli* O157 in an environment with changing pH. *J. Appl. Microbiol.* 2003; 94:555-560.

Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Cray WCJ, Moon HW. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect. Immun.* 1997; 65:1842-1848.

Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Moon HW, O'Brien AD. *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. *Infect. Immun.* 1998;66:4560-4563.

Deibel C, Kramer S, Chakraborty T, Ebel F. EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein. *Mol. Microbiol.* 1998;28:463-474.

Deibel C, Dersch P, Ebel F. Intimin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its isolated C-terminal domain exhibit different binding properties for Tir and a eukaryotic surface receptor. *Int. J. Med. Microbiol.* 2001; 290:683-691.

Devenish J, Gyles C, LaMarre J. Binding of *Escherichia coli* verotoxins to cell surface protein on wild-type and globotriaosylceramide-deficient Vero cells. *Canadian J. Microbiol.* 1998;44:28-34.

DeVinney R, Stein M, Rincsbéd D, Abe A, Ruschkowski S, Finlay BB. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. 1999;67:2389-2398.

Djafari S, Ebel F, Deibel C, Kramer S, Hudel M, Chakraborty T. Characterisation of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1997; 25:771-784.

Djordjevic SP, Hornitzky MA, Bailey G, Gill P, Vanselow B, Walker K, Bettelheim KA. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:2017-2021,

Donnenberg MS, Tacket CO, James SP, Losonsky G, Nataro JP, Wasserman SS, Kaper JB, Levine MM. Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J. Clin. Invest.* 1993; 92:1412-1417.

Donnenberg MS. VIII. Infections due to *Escherichia coli* and other enteric gram-negative bacilli. *WebMD Scientific American Medicine.* 2002. <http://online.statref.com/document.aspx?fxid=48&docid=1046> Accessed Jun. 25, 2003.

Drasar BS, Hill MJ. Human intestinal flora, 1974; p.36-43. Academic Press Ltd., London, United Kingdom.

Dunn JR. The Epidemiology of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in Louisiana Dairy Cattle, Beef Cattle and White – Tailed Deer, 2003. [<http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-0409103-102328/>], 20/06/2008.

Dytoc MT, Ismaili A, Philpott DJ, Soni R, Brunton JL, Sherman PM. Distinct binding properties of *eaeA*-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21. *Infect. Immun.* 1994; 62:3494–3505.

Ebel F, Podzadel T, Rohde M, Kresse AU, Kramer S, Deibel C, Guzman CA, Chakraborty T. Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. *Mol. Microbiol.* 1998; 30:147-161.

Elliott EJ, Robins-Browne RM, O'Loughlin EV, Bennett-Wood V, Bourke J, Henning P, Hogg GG, Knight J, Powell H, Redmond D. Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. *Archives of Disease in Childhood.* 2001; 85:125-131.

Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, McNamara BP, Donnenberg MS, Kaper JB. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* 1998; 28:1-4.

Elliott SJ, Yu J, Kaper JB. The cloned locus of enterocyte effacement from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *E. coli* K-12. *Infect. Immun.* 1999; 67:4260-4263.

Elliott SJ, Sperandio V, Giron JA, Shin S, Mellies JL, Wainwright L, Hutcheson SW, McDaniel TK, Kaper JB. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE- encoded virulence factors in

enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2000; 68:6115-6126.

Erensoy S (1990). İzmir ve çevresindeki sürgün olgularında enteropatojen *Escherichia coli* ve enterohemorajik *E. coli* kökenlerinin araştırılması, Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.

Ethelberg S, Olsen KE, Scheutz F, Jensen C, Schiellerup P, Enberg J, Petersen AM, Olesen B, Gerner-Smith P, Molbak K. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10:842–847.

Fagan PK, Hornitzky MA, Bettelheim KA, Djordjevic SP. Detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal faeces by multiple ex PCR, *Appl. Environ. Microbiol.* 1999;65:868-872.

Fairbrother JM, Nadeau É. *Escherichia coli: on-farm contamination of animals.* *Revue scientifique et technique-Office International des Epizooties.* 2006; 25 (2): 571-580.

Fang W, Pyorala S. Mastitis causing *Escherichia coli* serum sensitivity and susceptibility to selected antibacterials in milk. *J. Dairy Sci.* 1996; 79: 76-82.

Farmer JJr, Davis BR. H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22:620-625.

Farmer JJr, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley- Carter GP, Asbury MA, Riddle C, Wathen-Grady HG, Elias C, Fanning A. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 21:46-76.

The United States Food and Drug Administration (FDA). 1995; Vol:60, 7: 2767-2768.

Feder IE, Wallace FM, Gray JT, Fratamico PM, Cray PJ, Pearce R, Call JE, Perrine R, Luchansky JB. The Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Intact Colon Samples of Swine at a Swine Slaughter Facility, *Emerg. Inf. Dis.* 2003; 9 (3): 380-383.

Feng P, Lampel KA, Karch H, Whittam TS. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Infect. Dis.* 1998; 177:1750-1753.

Finlay BB, Rosenshine I, Sonnenberg MS, Kaper JB. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. *Infect. Immun.* 1992; 60:2541-2543.

Finlay BB, Ruschkowski S, Kenny B, Stein M, Reinscheid DJ, Stein MA, Rosenshine I. Enteropathogenic *E. coli* exploitation of host epithelial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1996; 797:26–31.

Frankel G, Candy DC, Everest P, Dougan G. Characterization of the C- terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei*. Infect. Immun.1994; 62:1835-1842.

Frankel G, Candy DC, Fabiani E, Adu-Bobie J, Gil S, Novakova M, Phillips AD, Dougan G. Molecular characterization of a carboxy-terminal eukaryotic- cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 1995; 63:4323-4328.

Frankel G, Lider O, Hershkoviz R, Mould AP, Kachalsky SG, Candy DC, Cahalon L, Humphries MJ, Dougan G.The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins J. Biol. Chem. 1996; 271:20359-20364.

Frankel G, Phillips AD, Rosenshine L, Dougan G, Kaper JB, Knutton S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. more subversive elements Mol. Microbiol.1998a; 30:911-921.

Frankel G, Phillips AD, Novakova M, Batchelor M, Hicks S, Dougan G. Generation of *Escherichia coli* intimin derivatives with differing biological activities using site-directed mutagenesis of the intimin C-terminus domain. Mol, Microbiol. 1998b; 29:559-570.

Frankel G, Phillips AD, Trabulsi LR, Knutton S, Dougan G, Matthews S. Intimin and the host cell- is it bound to end in Tir(s)? Trends in Microbiol. 2001; 9:214-218.

Fratamico PM, Sackitey SK, Wiedmann M, Deng MY. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PGR. J. Clin. Microbiol. 1995; 33:2188-2191.

Fratamico PM, Smith JL. *Escherichia coli*, Foodborne Infections and Intoxications, Academic Press. 2005; p: 205-258, New York.

FSIS (Food Safety and Inspection Service) (2001) Risk assessment of the public health impact of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef, Erişim: [http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/00-023N/00-023NReport.pdf], Erişim Tarihi: 15.05.2009.

Fukushima H, Hoshina K, Gomyoda M. Selective isolation of eae-positive strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 2000; 38:1684–1687.

Gannon VP, Teerling C, Masri SA, Gyles CL. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. J. Gen. Microbiol.1990; 136:1125-1135.

Gannon VP, King RK, Kim JL, Thomas EJ. Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol.1992; 58:3809-3815.

Garber L, Wells S, Schroeder-Tucker L Ferris K Factors associated with fecal shedding of verotoxin producing *Escherichia coli* O157 on dairy farms. J. Food Protect. 1999; 62: 307-312.

Garred O, van Deurs B, Sandvig K. Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. J. Biol. Chem.1995; 270:10817-10821.

Garrido P, Blanco M, Moreno-Paz M, Briones C, Dahbi G, Blanco J, Blanco J, Parro V. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: A new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *J. Clin. Chem.* 2006; 52:192–201.

Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 1991; 13:60–98.

Goldwater PN, Bettelheim KA. New perspectives on the role of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohaemorrhagic *E. coli* serotypes in human disease. *J Med Microbiol.* 1998; 47:1039-1045.

Goosney DL, DeVinney R, Pfuetzner RA, Frey EA, Strynadka NE, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. *Curr. Biol.* 2000; 10:735-738.

Griffin PM, Ostroff SM, Tauxe RV, Greene KD, Wells JG, Lewis JH, Blake PA. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. *Anim. Int. Med.* 1988; 109:705-712.

Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohaemorrhagic *E. coli*, and the associated haemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 1991; 13:60-98.

Gunzer F, Böhm H, Russmann H, Bitzan M, Aiexsic S, Karch H. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with uremic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30:1807-1810.

Güler L, Gündüz K. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from clinical bovine mastitis. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2007; 31(5): 361-36.

Gyles C, Johnson R, Gao A, Ziebell K, Pierard D, Aiexsic S, Boerlin P. Association of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *Appl Environ. Microbiol.* 1998; 64:4134-4141.

Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci.* 2007, 85:E45-E62.

Hall GA, Reynolds DJ, Chanter N, Morgan JH, Parsons KR, Debney TG, Bland AP, Bridger JC. Dysentery caused by *Escherichia coli* (SI02-9) in calves: natural and experimental disease. *Vet Pathol.* 1985; 22:156-163.

Hancock DD, Besser TE, Kinsel ML, Tarr PL, Rice DH, Paros MG. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State *Epidemiol. Infect.* 1994; 113:199-207.

Harmon BG, Cathy AB, Tkalcic S, Mueller POE, Parks A, Jain AV, Zhae T, Doyle MP. Fecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fasted calves. *J. Food Protect.* 1990; 62: 574-576.

Hartland EL, Batchelor M, Deiahay RM, Hale C, Matthews S, Dougan G, Knutton S, Connerton I, Frankel G. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Mol. Microbiol.* 1999; 32:151-158.

Hauf N, Chakraborty T. Suppression of NF-kappa B activation and proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Immunol.* 2003; 170:2074–2082.

Heimer SR, Welch RA, Perna NT, Posfai G, Evans PS, Kaper JB, Blattner FR, Mobley HL. Urease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. evidence for regulation by fur and a trans-acting factor. *Infect. Immun.* 2002; 70:1027-1031.

Henning PH, Tham EB, Martia AA, Beare TH, Jureidini KF. Haemolytic-uraemic syndrome outbreak caused by *Escherichia coli* O111:H- clinical outcomes *Med. J. Aust.* 1998; 168:552-555.

Herold S, Karch H, Schmidt H. Shiga toxin-encoding bacteriophages—Genomes in motion. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004; 294:115–121.

Heuvelink AE, Bleumink B, Van Den Biggelaar FL, Te Giffel MC, Beumer RR, De Boer E. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in Netherlands, *J. Food Protect.* 1998; 61, p: 1597-1601.

Heyderman RS, Soriani M, Hirst TR. Is immune cell activation the missing link in the pathogenesis of post-diarrhoeal HUS? *Trends in Microbiol.* 2001; 9:262-266.

Hicks S, Frankel G, Kaper JB, Dougan G, Phillips AD. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to paediatric intestinal tissue in vitro. *Infect. Immun.* 1998; 66:1570-1578.

Hoey DE, Currie C, Else RW, Nutikka A, Lingwood CA, Gaily DL, Smith DG. Expression of receptors for verotoxin 1 from *Escherichia coli* O157 on bovine intestinal epithelium. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51:143-149.

Hornitzky MA, Bettelheim KA, Djordjevic SP. The detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diagnostic bovine faecal samples using vancomycin-cefixime-cefsulodin blood agar and PCR *FEMS Microbiol. Lett.* 2001; 198:17- 22.

Hurley BP, Thorpe CM, Acheson DW. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect. Immun.* 2001; 69:6148-6155.

Hussein HS. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J Anim Sci.* 2007, 85:E63-E72.

Isberg RR, Voorhis DL, Falkow S. Identification of invasins; a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell.* 1987; 50:769-778.

Ismaili A, Philpott DJ, Dytoc MT, Soni R, Ratnam S, and Sherman PM. Alpha-actin accumulation in epithelial cells infected with attaching and effacing gastrointestinal pathogens. *J. Infect. Dis.* 1995; 172:1393-1396.

Ito H, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Nishibuchi M. Cloning and nucleotide sequencing of Verotoxin 2 variant genes from *Escherichia coli* 091:H21 isolated from a patient with the haemolytic uremic syndrome. *Microb Pathog.* 1990; 8:47-60.

İzğür M, Akan M. Koli İnfeksiyonları. In: Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Medisan Yayınevi, Ankara, 2002; s:55-59.

Jacewicz M, Clausen H, Nudelman E, Donohue-Rolfe A, Keusch GT. Pathogenesis of shigella diarrhoea. XI. Isolation of a shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide *J Experiment. Med.* 1986; 163:1391-1404.

Jacewicz MS, Acheson DW, Binion DG, West GA, Uncicome LL, Fiocchi C, Keusch GT. Responses of human intestinal microvascular endothelial cells to Shiga toxins 1 and 2 and pathogenesis of hemorrhagic colitis. *Infect. Immun.* 1999; 67:1439-1444.

Jacewicz MS, Trachtman H, Newberg DS, Acheson DWK. Abstr. 100th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 2000; B-102:64. (Abstr.).

Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990; 87:7839-7843.

Jin HY, Tao KH, Li YX, Li FO, Li SQ. Microarray Analysis of *Escherichia coli* O157:H7, *World J. Gastroenterol.* 2005; 11(37), p: 5811-5815.

Johnson JR. Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2003, 17:261-278 viii.

Johnson RP, Clarke RC, Wilson JB, Read SC, Rahn K, Renwick SA, Sandhu KA, Alves D, Karmaji MA, Lior H, McEwen SA, Spika JS, Gyles CL. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food. Protect.* 1996; 59:1112-1122.

Johnson WM, Pollard DR, Lior H, Tyler SD, Rozee KR. Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine oedema disease by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28:2351-2353.

Kaipainen T, Pohjanvirta T, Shpigel NY, Shwimmer A, Pyorala S, Pelkonen S. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet. Microbiol.* 2002, 85, 37-46.

Kalman D, Weiner OD, Goosney DL, Sedat JM, Finlay BB, Abo A, Bishop JM. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form act in pedestals. *Nature Cell Biol.* 1999; 1:389-391.

Kaper JB, Gansheroff LJ, Wachtel MR, O'Brien AD. Intimin-mediated adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and attaching and effacing pathogens. In **Kaper JB, O'Brien AD**(ed). *Escherichia coli* 0157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, 1998b; p:148-156. ASM Press, Washington, DC.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004, 2:123-140.

Kaper JB, Sperandio V. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* 2005; 73:3197–3209.

Kaper JB, Karmali MA. The continuing evolution of a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008; 105 (12): 4535-4536.

Karch H, Bohm H, Schmidt H, Gunzer F, Aleksic S, Heesemann J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* 0157:H7. *Clin Microbiol.* 1993; 31:1200-1205.

Karch H, Geitz C, Schmidt H. Increased incidence of infections with EHEC O103:H2. *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanita.* 1997; 10(3):2.

Karch H, Schmidt H, Brunder W. Plasmid-encoded determinants of *Escherichia coli* O157:H7. In Kaper, J. B., and A. D O'Brien (ed), *Escherichia coli* 0157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, 1998; p. 183-194. ASM Press, Washington, DC.

Karch H, Bielaszewska M, Bitzan M, Schmidt H. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1999; 34:229–243.

Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 2005; 295 (6-7): 405-418.

Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet.* 1983; 1:619–620.

Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic-uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 1985; 151:775–782.

Karmali MA. Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Mol. Biotechnol.* 2004; 26:117–122.

Kehl SC. Role of Laboratory in the Diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections, *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40, p: 2711-2715.

Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell.* 1997; 91:511-520.

Kenny B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol. Microbiol.* 1999; 31:1229-1241.

Kiarash A, Boyd B, Lingwood CA. Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially recognize different globotriaosyl ceramide fatty acid homologues. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:11138-11146.

Kim JY, Kiro SH, Kwon NH, Bae WK, Lim JY, Koo HC, Kim JM, Noh KM, Jong WK, Park KT, Park YH (2005). Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 Using Different Detection Methods Molecular Determination by Multiplex PCR and RAPD, *J. Clin. Microbiol.* 6(1), p: 7-19.

Kleanthous H, Smith HR, Scotland SM, Gross RJ, Rowe B, Taylor CM, Milford DV. Haemolytic uraemic syndromes in the British Isles, 1985-8: association with verocytotoxin producing *Escherichia coli*. Part 2: Microbiological aspects. *Arch. Dis. in Childhood.* 1990; 65:722-727.

Knutton S, Baldwin T, Williams P. Actin in cell attachment. 1992; *Nature* 359:369.

Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, Wolff C, Dougan G, Frankel G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.* 1998; 17:2166-2176.

Kong RYC, Lee SKY, Law TWF, Law SHW, Wu RSS (2002). Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR, *Water Research*, 36, p: 2802-2812.

Konowalchuk J, Speirs JL, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1977; 18:775-779.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Shreckberger PG, Winn WC (1997). *Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology, Enteric Gram Negative Rods, Chapter 4, Fifth Edition*, Lippincott, Philadelphia, New York, 196-199.

Kozlov Y, Kabishev AA, Lukyanov EV, Bayev AA. The primary structure of the Operons coding for *Shigella dysenteriae* toxin and temperature phage H30 shiga-like toxin. *Gene.* 1988; 67:213-221.

Krause G, Zimmermann S, Beutin L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin (eae) gene positive *Escherichia coli* types. *Vet. Microbiol.* 2005; 106:87-95.

Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *Clin. Microbiol.* 1996; 34:431-433.

Kudva LT, Hatfield PG, Hovde CJ. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:892-899.

Large TM, Walk ST, Whittam TS. Variation in acid resistance among shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71:2493–2500.

Law D, Kelly J. Use of heme and haemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* serogroups. *Infect. Immun.*1995;63:700-702.

Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli* J. *Appl. Microbiol.*2000; 88:729-745.

Lehmacher A, Meier H, Aleksic S, Bockemuhl J. Detection of hemolysin variants of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR and culture on vancomycin- cefixime-cefsulodin blood agar. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64:2449-2453.

Levine MM, Xu JG, Kaper JB, Lior H, Prado V, Tall B, Nataro J, Karch H, Wachsmuth K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* 1987; 156:175–182.

Lindberg AA, Brown JE, Stromberg N, Westling-Ryd M, Schultz JE, Karlsson KA. Identification of the carbohydrate receptor for shiga-toxin produced by *Shigella dysenteriae*. *J. Biol. Chem.*1987; 262:1179-1785.

Ling H, Boodhoo A, Hazes B, Cummings MD, Armstrong GD, Brunton JL, Read RJ. Structure of the shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3 *Biochemistry.*1998; 37:1777-1788.

Lingwood CA, Law H, Richardson S, Petric M, Brunton JL, De Grandis S, Karmali M. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J. Biol. Chem.* 1987; 262:8834-8839.

Lingwood CA. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends in Microbiol.* 1996; 4:147-153.

Lior H. Classification of *Escherichia coli*.1994.P: 31–72 in *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. C. L. Gyles, ed. CAB Int., Wallingford, UK.

Lior H. Classification of *Escherichia coli*. 1996. p. 31-72. in C L. Gyles (éd.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International/ Wallingford, United Kingdom.

Lior H, Magoun L, Leong JM. Beta1-chain integrins are not essential for intimin-mediated host cell attachment and enteropathogenic *Escherichia coli* induced actin condensation. *Infect. Immun.*1999;67:2045-2049.

Lipman LJA, de Nijs A, Gaastra W. Isolation and identification of fimbriae and toxin production by *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis. *Vet. Microbiol.*, 1995; 47: 1-7.

Lira WM, Macedo C, Marin JM. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *J. Appl. Microbiol.*, 2004; 97: 861-866.

Lopez EL, Diaz M, Grinstein S, Devoto S, Mendilaharsu F, Murray BE, Ashkenazi S, Rubeglio E, Woloj M, Vasquez A. Haemolytic uremic syndrome and diarrhoea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J. Infect. Dis.* 1989;160:469-475.

Louise CB, Obrig TG. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7- derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J. Infect.* 1995; 172:1397- 1401.

Luo Y, Frey EA, Pfuetzner RA, Creagh AL, Knoechel DG, Haynes CA, Finlay BB, Strynadka NC. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature.* 2000; 405:1073-1077.

Makino K, Yokoyama K, Kubota Y, Yutsudo CH, Kimura S, Kurokawa K, Ishii K, Hattori M, Tatsuno I, Abe A. Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:117 derived from the Sakai outbreak. *Genes & Genetic Systems.* 1999; 74:227-239.

Manning PA. The *tcp* gene cluster of *Vibrio cholerae*. *Gene.* 1997;192:63-70.

March SB, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin. Microbiol.* 1986;23:869-872.

Mariani-Kurkdjian P, Denamur E, Milon A, Picard B, Cave H, Lambert-Zechovsky N, Loirat C, Goulet P, Sansonetti P, Elion J. Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic uremic syndrome in France. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:296–301.

Massa S, Goffredo E, Altieri C, et al. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8 °C. *Lett. Appl. Microbiol.* 1999; 28:89-92.

McDaniel TK., Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92:1664-1668.

McKee ML, Melton-Celsa AR, Moxley RA, Francis DH, O'Brien AD. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 1995; 63:3739-3744.

Mellies JL, Elliott SJ, Sperandio V, Donnenberg MS, Kaper JB. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*; identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol. Microbiol.* 1999; 33:296-306.

Melton-Celsa AR, Darnell SC, O'Brien AD. Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* Q91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect. Immun.* 1996; 64:1569-1576.

Mills M, Payne SM. Genetics and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7 J. Bacteriol.1995;177:3004-3009.

Miyamoto Y, Imura M, Kaper JB, Torres AG, Kagnoff MF. Role of Shiga toxin versus H7 flagellin in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* signalling of human colon epithelium in vivo. Cell. Microbiol. 2006; 8:869–879.

Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. Microbiol. Rev.1995; 59:451-480.

Momtaz H. Investigation of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis. J. Vet. Med., 13. 2010; 2:122–126.

Morabito S, Karch H, Mariani-Kurkdjian P, Schmidt H, Minelli F, Bingen E, Caprioli A. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. 1998; 36:840–842.

Morrison DM, Tyrrell DL, Jewell LD. Colonic biopsy in verotoxin-induced hemorrhagic colitis and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). American J. Clin. Pathol. 1985;86:108-112.

Muniesa M, Jofre J. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene Appl Environ Microbiol. 1998; 64:2443-2448.

Muniesa M, de Simon M, Prats G, Ferrer D, Panella H, Jofre J. Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. Infect. Immun. 2003; 71:4554–4562.

Murinda SE, Nguyen LT, Landers TL, Draughon FA, Mathew AG, Hogan JS, Smith KL, Hancock DD, Oliver SP. Comparison of *Escherichia coli* isolates from humans, food, and farm and companion animals for presence of Shiga toxin-producing *E. coli* virulence markers. Foodborne Pathog. Dis. 2004; 1:178–184.

Nakano M, Iida T, Ohnishi M, Kurokawa K, Takahashi A, Tsukamoto T, Yasunaga T, Hayashi T, Honda T. Association of the urease gene with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains irrespective of their serogroups, J. Clin. Microbiol.2001; 39:4541-4543.

Nash S, Stafford J, Madara JL. Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on the barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. J. Clin. Invest. 1987; 80:1104-1113.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol.1998; Rev. 11:142-201.

Neely MN, Friedman DI. Arrangement and functional identification of genes in the regulatory region of lambdaoid phage H-19B, a carrier of a Shiga-like toxin Gene. 1998;223:105-113.

- Neill MA.** Overview of verotoxigenic *Escherichia coli*. J. Food Protect. 1997; 60:1444–1446.
- Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM.** Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. Mol. Microbiol. 2000; 35:275-288.
- Nielsen EM, Scheutz F, Torpdahl M.** Continuous surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by pulsed-field gel electrophoresis shows that most infections are sporadic. Foodborne Pathol. Dis. 2006; 3:81–87.
- Nyholm PG, Brunton JL, Lingwood CA.** Modelling of the interaction of verotoxin1 (VT1) with its glycolipid receptor, globotriaosylceramide (Gb3). Intl. J. Biol. Macromol. 1995; 17:199-204.
- Nyholm PG, Magnusson G, Zheng Z, Norel R, Binnington-Boyd B, Lingwood CA.** Two distinct binding sites for globotriaosyl ceramide on verotoxins: identification by molecular modelling and confirmation using deoxy analogues and a new glycolipid receptor for all verotoxins, Chem. Biol. 1996; 3:263-275.
- O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB.** Production of *Shigella dysenteriae* type 1 -like cytotoxin by *Escherichia coli*. J. Infect Dis. 1982; 146-763-769.
- O'Brien AD, LaVeck GD.** Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli* Infect. Immun. 1983; 40:675-683.
- O'Brien AD, Holmes RK.** Shiga and Shiga-like toxins, Microbiol. 1987; Rev, 51:206- 220.
- O'Brien, AD, Tesh VL, Donohue-Rolfe A, Jackson MP, Olsnes S, Sandvig K, Lindberg AA, Keusch GT.** Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. Curr Top, Microbiol. Immun. 1992;180:65-94.
- Obrig TG, Moran TP, Brown JE.** The mode of action of Shiga toxin on peptide elongation of eukaryotic protein synthesis. Biochem, J. 1987; 244:287-294.
- Obrig TG, Louise CB, Lingwood CA, Boyd B, Barlev-Maloney L , Daniel TO.** Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses. Biol. 1993; 268:15484-15488.
- Ojeda A, Prado V, Martine J, Arellano C, Borezyk A, Johnson W, Lior H, Levine MM.** Sorbitol-negative phenotype among enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. J Clin. Microbiol. 1995; 33:2199-2201.
- O'Loughlin E, Robins-Browne R.** Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. Microb. Inf. 2001;3:493-507.
- Orskov F, Orskov I.** *Escherichia coli* serotyping an disease in man and animals. Can. J. Microbiol. 1992, 38, 699–704.

Ostroff SM, Tarr PI, Neili MA, Lewis JH, Hargrett-Bean N, Kohayashi JM. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157.H7 infections, *J. Infect. Dis.* 1989; 160:994-998.

Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marches O, Caprioli A. Typing of intimin genes in human and animal enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant, *Infect. Immun.* 2000;68:64-71.

Öksüz Ö, Arici M, Kurultay S, Gümüs T. Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. *Food Control* 2004; 15: 453-456.

Padhye NY, Doyle MP. Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in food, *Appl. Environ. Microbiol.* 57. 1991; p: 2693-2698.

Paton AW, Paton JC, Heuzenroeder MW, Goldwater PN, Manning PA. Cloning and nucleotide sequence of a variant Shiga-like toxin II gene from *Escherichia coli* OX3:H21 isolated from a case of sudden infant death syndrome. *Microbiol. Pathol.*1992;13:225-236.

Paton AW, Paton JC, Manning PA. Polymerase Chain reaction amplification, cloning and sequencing of variant *Escherichia coli* Shiga-like toxin type II operons. *Microbiol. Pathog.* 1993; 15:77-82.

Paton AW, Paton JC, Goldwater PN, Heuzenroeder MW, Manning PA. Sequence of a variant Shiga-like toxin type-I operon of *Escherichia coli* O157:H7 gene.1993; 129:87-92.

Paton AW, Beutin L, Paton JC. Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons gene.1995; 153:71-74.

Paton AW, Bourne AJ, Manning PA, Paton JC. Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons. *Infect. Immun.*1995; 63:2450-2458.

Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohaemorrhagic *E. coli hlyA*, *rjbOU1*, and *rfbO51*. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:598-602

Paton AW, Wood MC, Doyle RM, Lanser JA, Paton JC. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:3357-3361.

Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement- negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.*2001; 69:6999-7009.

Paton AW, Paton JC. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa* *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:271-274.

Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol.* 1998; 11:450-479.

Paton JC, Paton AW. Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections. *Sci. Med. (Phila.)*2000; May/June:28–37.

Pearson GR, Bazelev KJ, Jones JR, Gunning RF, Green MJ, Cookson A, Woodward MJ. Attaching and effacing lesions in the large intestine of an eight-month-old heifer associated with *Escherichia coli* O26 infection in a group of animals with dysentery. *Vet. Rec.*1999;145:370-373.

Perna NT, Mayhew GF, Posfai G, Elliott S, Donnenberg MS, Kaper JB, Blattner FR. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohaemorrhagic *Escherichiacoli* O157:H7. *Infect. Immun.* 1998; 66:3810-3817.

Perna NT, Plunkett GR, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick A. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature.*2001; 409:529-533.

Petridis H, Kidder G, Ogram A *E. coli* O157:H7 A Potential Health Concern, Erişim: [<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/SS/SS19700.pdf>], (1998) Erişim Tarihi: 25.04.2010.

Phillips AD, Frankel G. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J. Infect. Dis.*2000;181:1496-1500.

Phillips AD, Navabpour S, Hicks S, Dougan G, Wallis T, Frankel G. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:117 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut.* 2000; 47:377-381.

Pickering LK, Obrig TG, Stapleton FB. Uremic syndrome and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Pediat. Infect. Dis. J.*1994; 13:459-475.

Picozzi C, Foschino R, Heuvelink A, Beumer R. Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol-negative or slow-fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated milk samples in Lombardy region. *Lett. Appl. Microbiol.* 2005; 40: 491-496.

Pierard D, Muyldermans G, Moriau L, Stevens D, Lauwers S. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.*1998; 36:3317-3322.

Plunkett GR, Rose DJ, Durfee TJ, Blattner FR. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product *J. Bacteriol.* 1999; 181:1767-1778.

Pruimboom-Brees IM, Morgan TW, Ackermann MR, Nystrom ED, Samuel JE, Cornick NA, Moon HW. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins *Proc. Natl. Acad. Sci.*2000;97:10325-10329.

Ramachandran V. Characterisation of virulence genes (Shiga toxins 1 and 2, and intimin) in shiga toxin producing *Escherichia coli*(STEC) of ovine origin and an assessment of the role of these STEC in human pathogenesis, Doktor of philosophy thesis, Department of biological sciences, University of Wollongong 2002. <http://ro.uow.edu.au/theses/1039>.

Ramegowda B, Samuel JE, Tesh VL. Interaction of Shiga toxins with human brain microvascular endothelial cells; cytokines as sensitising agents. *J. Infect Dis.* 1999; 180:1205-1213.

Ramegowda B, Tesh VL. Differentiation-associated toxin receptor modulation, cytokine production, and sensitivity to Shiga-like toxins in human monocytes and monocytic cell lines. *Infect, Immun.*1996; 64:1173-1180.

Recktenwald J, Schmidt H. The nucleotide sequence of Shiga toxin2 (Stx2) encoding phage ϕ P27 is not related to other Stx phage genomes, but the modular genetic structure is conserved. *Infect, Immun.* 2002; 70:1896-1908

Reece S, Simmons CP, Fitzhenry RJ, Matthews S, Phillips AD, Dougan G, Frankel G. Site-directed mutagenesis of intimin alpha modulates intimin-mediated tissue tropism and host specificity. *Mol. Microbiol.*2001; 40:86-98.

Reid SD, Betting DJ, Whittam TS. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *J. Clin Microbiol.* 1999; 37:2719-2722.

Reilly A. Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections: memorandum from a WHO meeting. WHO Consultation on Prevention and Control of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Infections, Bulletin of the World Health Organization. 1998; 76 (3): 245–255.

Rey J, Blanco JE, Blanco M, Mora A, Dahbi G. Serotypes, phage types and virulence genes of shiga producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. *Vet. Microbiol.* 2003; 94: 47-56.

Richardson JM, Evans PD, Homans SW, Donohue-Rolfe A. Solution structure of the carbohydrate-binding B-subunit homopentamer of verotoxin (VT) from *E. coli*. *Nature Structural Biology.*1997; 4:190-193.

Riley LW. The epidemiologic, clinical, and microbiologic features of hemorrhagic colitis. *Annu. Rev. Microbiol.* 1987; 41:383-407.

Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett A. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl J. Med.*1983; 308:681-685.

Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldan CD, Balbi L, Garcia B, Fiorilli G, Sosa-Estani S, Kincaid S, Rangel J, Griffin PM. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. The Case-Control Study Group. *Foodborne Pathog. Dis.* 2006; 3:88–96.

Robins-Browne RM, Elliot E, Desmarchelier P. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Australia. In Kaper, J. B., and A. D. O'Brien (ed), *Escherichia coli* 0157 H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. 1998, p. 66-72. ASM Press, Washington, DC.

Robins-Browne RM. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: an emerging food-borne pathogen. *Today's Life Sci.* 2000;32-37.

Rocchi G, Capozzi M. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection, *Recenti Prog Med.* 1999; 90 (11): 613-618.

Roldan ML, Chinen I, Otero J, Miliwebsky ES, Alfaro N. Isolation, characterization and typing of *Escherichia coli* O157:H7 strains from beef products and milk, *Revista Argentina de Microbiol.* 2007; 39: 113-119.

Rosenshine I, Ruschkowski S, Stein M, Reinscheid DX, Mills SD, Finlay BB. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J.* 1996; 15:2613-2624.

Rubini S, Cardeti G, Amiti S, Manna G, Onovati R, Caprioli A, Morabito S. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in sheep milk. *Vet. Rec.* 1999; 144: p. 56.

Salmon RL, Farrell ID, Hutchison JGP, Coleman DJ, Gross RJ, Fry NK, Rowe B, Palmer SR. A christening party outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O157: H7. *Epidemiol. Infect.* 1989; 103: 249-254.

Saunders JR, Sergent MJ, McCarthy AJ, Mobbs KJ, Hart CA, Marks TS, Sharp RJ. Genetics and molecular ecology of *Escherichia coli* O157. 1999. Pages 1–25 in *Escherichia coli* O157 in Farm Animals. C. S. Stewart and H. J. Flint, ed. CAB International, Wallingford, UK.

Savarino SJ, Fasano A, Robertson DC, Levine MM. Enteraggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J Clin. Invest.* 1991; 87:1450-1455.

Saxena SK, O'Brien AD, Ackerman EJ. Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 1989; 264:596–601.

Schauer DB, Falkow S. The *eae* gene of *Citrobacter freundii* biotype 4280 is necessary for colonization in transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect, Immun.* 1993;61:4654-4661.

Schlundt J, Toyofuku H, Jansen J, Herbst SA. Emerging food-borne zoonoses, *Revue Scientifique et Technique - Office International des Épizooties.* 2004; 23 (2): 513-533.

Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:117 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 1995; 63:1055-1061.

Schmidt IL, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66:1205-1208.

Schmidt H. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res. Microbiol.* 2001; 152:687-695.

Schmidt CK, McKee ML, O'Brien AD. Two copies of Shiga-like toxin II- related genes common in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect. Immun.*1991; 59:1065- 1073.

Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.*1996; **60**:167-215.

Spears KJ, Roe AJ, Gally DL. A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006; 255:187–202.

Sperandio V, Kaper JB, Bortolini MR, Neves BC, Keller R, Trabuisi LR. Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS Microbiol. Lett.*1998; 164:133-139.

Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB. Bacteria-host communication: The language of hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100:8951–8956.

Srimanote P, Paton AW, Paton JC. Characterization of a novel type IV pilus locus encoded on the large plasmid of locus of enterocyte effacement-negative Shiga- toxicogenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.* 2002; 70:3094- 3100.

Stephan R, Kühn K. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in bovine coli mastitis and their antibiotic resistance patterns. *Zentralbl. Veterinärmed. B,* 1999; 46: 423-427.

Stone KD, Zhang HZ, Carlson LK, Donnenberg MS. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol. Microbiol.* 1996;20:325-337.

Strockbine NA, Jackson MP, Sung LM, Holmes RK, O'Brien AD. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J. Bacteriol.*1988; 170:1116-1 S22.

Tarr CL, Whittam TS. Molecular Evolution of the Intimin Gene in 111 Clones, 2002.

Tarr PI, Gordon C, Chandler W. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome, *The Lancet*,2005, 365 (9464): 1073-1086.

Tansuno I, Hone M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, Taguchi H, Kamiya S, Hayashi T, Sasakawa C. toxB gene on p0157 of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157.H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect. Immun.* 2001;69:6660-6669.

Taylor CM, Milford DV, Rose PE, Roy TC, Rowe B. The expression of blood group PI in post-enteropathic haemolytic uraemic syndrome. *Paediatric Nephrology.* 1990; 4:59-61.

Temelli S. Gıda zehirlenmesine neden olan E.coli O157:H7 ve önemi, Uludağ Üniversitesi J.Fac.Vet.Med. 2002; 21: 133-138.

Tesh VL, Samuel JE, Perera LP, Sharefkin JB, O'Brien AD. Evaluation of the role of Shiga and Shiga-like toxins in mediating direct damage to human vascular endothelial cells, *J. Infect. Dis.* 1991; 164:344-352.

Thorpe CM, Hurley BP, Lincicome LL, Jacewicz MS, Keusch GT, Acheson DW. Shiga toxins stimulate secretion of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 1999; 67:5985-5993.

Tilden J, Young JW, McNamara AM, Custer C, Boesel B, Lambert-Fair MA, Majkowski J, Vugia D, Werner SB, Hollingsworth J, Morris Jr JG. A new route of transmission for *Escherichia coli*: Infection from dry fermented salami. *Am. J. Public Health* 1996; 86:1142-1145.

Topçu Aİ, Söyletir G, Doğanay M. Bakteriyel İnfeksiyonlar. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji, cilt 1, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2002; 1564-1575.

Torres AG, Payne SM. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* 1997; 23:825-833.

Tsai WL, Miller CE, Richter ER. Determination of the Sensitivity of a Rapid *Escherichia coli* O157:H7 Assay for Testing 375-Gram Composite Samples, *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66(9), p: 4149-4151.

Turutoğlu H, Mudul S. Is *Escherichia coli* O157:H7 an etiological agent of bovine mastitis? *Israel J. Vet. Med.* 2002; 57:82-83.

Tyler SD, Johnson WV, Lior H, Wang G, Rozee KR. Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29:1339-1343.

Tyler JS, Mills MJ, Friedman DI. The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. *J. Bacteriol.* 2004; 186:7670-7679.

Tzipori S, Gunzer F, Donnenberg MS, de Montigny L, Kaper JB, Donohue-Rolfe A. The role of the *eaeA* gene in diarrhoea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immun.* 1995; 63:3621-3627.

Unkmeir A, Schmidt H. Structural analysis of phage-borne stx genes and their flanking sequences in shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Infect. Immun.* 2000; 68:4856-4864.

van de Kar NC, Monnens LA, Karmali MA, van Hinsbergh VW. Tumour necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells, implications for the pathogenesis of the haemolytic uremic syndrome *Blood.* 1992; 80:2755-2764.

van Setten PA, Monnens LA, Verstraten RG, van den Heuvel LP, van Hinsbergh VW. Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release. *Blood.* 1996; 88:174-183.

van Setten PA, van Hinsbergh VW, van den Heuvel LP, Preyers F, Dijkman HB, Assmann KJ, van der Velden TJ, Monnens LA. Monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 levels in urine and serum of patients with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Res.* 1998; 43:759–767.

Vernozy-Rozand C. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in food. *J. Microbiol.* 1997; Vol 82:537-551.

Wagner PL, Acheson DW, Waldor MK. Isogenic lysogens of diverse Shiga toxin 2-encoding bacteriophages produce markedly different amounts of Shiga toxin. *Infect. Immun.* 1999; 67:6710–6714.

Wagner PL, Neely MN, Zhang X, Acheson DW, Waldor MK, Friedman DL. Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *J. Bacteriol.* 2001; 183:2081-2085.

Wagner PL, Acheson DW, Waldor MK. Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2001a; 69:1934–1937.

Wagner PL, Neely MN, Zhang X, Acheson DW, Waldor MK, Friedman DI. Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *J. Bacteriol.* 2001b; 183:2081–2085.

Wagner PL, Livny J, Neely MN, Acheson DW, Friedman DI, Waldor MK. Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2002; 44:957–970.

Waldor MK. Bacteriophage biology and bacterial virulence. *Trends in Microbiol.* 1998; 6:295-297.

Walker CE *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle: prevalence in gut contents at slaughter and the effect of neomycin supplementation in feed on fecal shedding in experimentally inoculated cattle, Master's Thesis, Kansas State University, Kansas. 2008.

Walters MD, Matthei IU, Kay R, Dillon MJ, Barratt TM. The polymorphonuclear leucocyte count in childhood haemolytic uraemic syndrome *Paediatric Nephrology.* 1989; 3:130-134.

Walters M, Sperandio V. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int. J. Med. Microbiol.* 296:125–131. Waterman, S. R., and P. L. Small. 1996. Characterization of the acid resistance phenotype and *rpoS* alleles of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2006; 64:2808–2811.

Wang G, Clark CG, Rodgers FG. Detection in *Escherichia coli* of the Genes Encoding the Major Virulence Factors, the Genes Defining the O 157:H7 Serotype and Components of the Type 2 Shiga Toxin Family by Multiplex PCR, *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(1): 3619-3619.

Warburton DW, Austin JW, Harrison BH. Survival and Recovery *E. coli* O157:H7 in Inoculated Bottled Water. *J. Food Protect* 1998; 61(8): 948-952.

Wasteson Y. Zoonotic *Escherichia coli*, *Acta Vet Scand* 2002; 43 (Suppl 1): 79-84.

Weinstein DL, Jackson MP, Samuel JE, Holmes RK, O'Brien AD. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for oedema disease of swine. *J. Bacteriol.* 1988; 170:4223-4230.

Weis WI, Drickamer K. Structural basis of Iectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 1996;65:441-473.

Welinder-Olsson C, Kaijser B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Scand. J. Infect. Dis.* 2005; 37:405–416.

Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, Riley LW, Remis RS, Sokolow R, Morris GK. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichiacoli* serotype, *J. Clin. Microbiol.* 1983; 18 (3): 512-520.

Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN, Downes FP, Martin ML. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-producing *Escherichia coli* from dairy cattle. *Journal Clinical Microbiol.* 1991; 29, 985–989.

Wenz JR, Barrington GM, Garry FB, Ellis RP, Magnuson RJ. *Escherichia coli* isolates serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *J. Dairy Sci.* 2006; 89: 3408-3412.

Whittam TS, Wolfe ML, Wachsmuth IK, Orskov F, Orskov I, Wilson RA. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhoea. *Infect. Immun.* 1993; 61:1619-1629.

WHO. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. World Health Organization, Geneva, Switzerland.1998.

Wieler LH, McDaniel TK, Whittam TS, Kaper JB. Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997;156:49-53.

Willshaw GA, Scotland SM, Smith HR, Rowe B. Properties of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* of human origin of O serogroups other than O157. *J. Infect. Dis.*1992; 166:797-802.

Willshaw GA, Scotland SM, Rowe B. Verocytotoxin producing *Escherichia coli*. 1997, pages 421–448 in *Escherichia coli: Mechanisms of Virulence*. M. Sussman, ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.

Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex PCR. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 1995; 12: 85-90.

Yamasaki C, Natori Y, Zeng XT, Ohmura M, Yamasaki S, Takeda Y, Natori Y. Induction of cytokines in a human colon epithelial cell line by Shiga toxin 1 (Stx1) and Stx2 but not by non-toxic mutant Stx1 which lacks N-glycosidase activity. *FEBS Lett.* 1999; 442:231–234.

Yoon JW, Hovde CJ. All blood, No stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection, *J. Vet. Sci.* 2008; 9 (3): 219-231.

Zadik PM, Chapman PA, Siddons CA. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.* 1993; 39:155-158.

Zhang XL, Tsui LS, Yip CM, Fung AW, Wong DK, Dai X, Yang Y, Hacke J, Morris C. *Salmonella enterica* serovar typhi uses type IVB pilus to enter human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 2000; 68:3067-3073.

Zhao T, Doyle MF, Shere J, Garber L. Prevalence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61:1290-1293.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Nazilli’de doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini Nazilli’de tamamladı. Ege Üniversitesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ağırlıklı Biyoloji Bölümü’nde 2009 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2010 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Yabancı dil olarak “İngilizce” bilmektedir.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesi ile bana destek olan danışman hocam Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Şükrü KIRKAN' a ve Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA' ya, aynı zamanda çalışmalarımda desteğini gördüğüm sevgili hocalarım Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ ve Yrd. Doç. Dr. Serap SAVAŐAN' a, tez sürecim boyunca koşulsuz yanımda olan canım aileme ve Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ferda AKAR' a sonsuz teşekkür ederim.