

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

MASTİTİSLİ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN
ESCHERİCHIA COLI SUŞLARINDA VİRÜLENS GENLERİN
ARAŞTIRILMASI

NERGİZ VURUCU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

AYDIN-2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Nergiz VURUCU tarafından hazırlanan “**Mastitisli Sütlerden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında Virülens Genlerin Araştırılması**” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19/01/2016

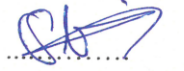
Üye : Prof.Dr. Şükrü KIRKAN

ADÜ



Üye(Tez Danışmanı): Doç.Dr. Serap SAVAŞAN

ADÜ



Üye : Doç.Dr. Esra ŞEKER

AKÜ



ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Serap SAVAŞAN'a ve Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Araştırma Görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın numune toplama aşamasında yardımlarını esirgemeyen Vet. Hekim Turan YILMAZ ve eşim Vet. Hekim Murat VURUCU' ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca yardımlarını ve destekleri esirgemeyen Uzm. Vet. Hek. Albay Ahmet YILMAZ, Dr. Vet. Hek. Albay Fikret KİL, Uzm. Vet. Albay Kemal ÖZKAYA ve Uzm. Vet. Hek. Ümit Cenk KAHRAMAN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan Araş. Gör. Tuğba Yüksel'e ayrıca teşekkür ederim.

En sıkıntılı anlarımda bana anlayış gösteren, her zaman destek olan, ne olursa olsun bana sevgi, şefkat ve güler yüz ile yaklaşan aileme, hayatıma yeni giren ve güler yüzüyle moral kaynağı olan kızıma çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Meme Yangısı (Mastitis)	2
2.2. Patogenezis	7
2.3. Semptomlar	8
2.4. Teşhis	9
2.5. Laboratuvar Muayenesi	9
2.5.1. Bakteriyoskop	9
2.5.2. Kültür	9
2.6. <i>E. coli</i> 'nin Sınıflandırması	10
2.6.1. Taksonomik Sınıflandırması	10
2.6.2. Serolojik Sınıflandırma	13
2.7. <i>E. coli</i> 'nin virülens faktörleri	14
2.7.1. Adhezinler	15
2.7.2. Toksinler	16
2.7.3. İntimin	17
2.7.4. Serum Dirençliliği	18
2.7.5. Aerobaktin Demir Elde Etme Sistemi	19
2.8. PCR	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Gereç	22

3.1.1. Örneklerin Toplanması	22
3.1.2. Besiyerleri	22
3.1.2.1. Kanlı Agar Base	22
3.1.2.2. Eozin - Metilen Blue (EMB) Agar	23
3.1.2.3. Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar ve CT SMACAgar Katkısı	23
3.1.3. PZR	24
3.1.3.1. Primerler	24
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Örneklerin Alınması	24
3.2.2. <i>E. coli</i> 'nin İzolasyonu	25
3.2.2.1. Fenotipik İdentifikasyon	25
3.2.2.1.1. Sefiksim-Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey Agarda Üreme	25
3.2.2.1.2. Eozin-Metilen Blue (EMB) Agarda Üreme	26
3.2.2.2. Biyokimyasal Testler	26
3.2.2.2.1. Oksidaz Testi	26
3.2.2.2.2. Nitrat Testi	26
3.2.2.3. <i>E. coli</i> Lam Aglütinasyon Testi	27
3.2.2.4. Genotipik İdentifikasyon	27
3.2.2.4.1. PZR.....	28
3.2.2.4.1.1. PZR Karışımı	28
3.2.2.4.1.2. Amplikonların Görüntülenmesi	29
4. BULGULAR	30
4.1. İzolasyon Bulguları	30
4.2. PCR Bulguları	31
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

A/E	: Attacing-Effacing
<i>Aer</i>	: Aerobaktin gen
Bç	: Baz çifti
CesT	: Tir Şaperonu
cfu/ ml	: Mililitredeki koloni oluşturan birim
CMT	: Kalifornia Mastitis Testi
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>eaeA</i>	: İntimin
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EMB	: Eozin - Metilen Blue
EPEC	: Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>
Kbç	: Kilo Baz çifti
L	: Litre
LEE	: Enterosit Yıkımlayıcı Lokus
LPS	: Lipopolisakkarit
LT	: Labil toksin
mA	: Miliamper
MCA	: MacConkey Agar
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
MR	: Metil Red
OMP	: Dış Membran Proteini
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Per	: Plazmid-kodlayan Regülatör
PFGE	: Pulsed-field Jel Elektroforezi
PMN	: Polimorf Nükleer Lökosit

RE	: Restriksiyon Enzim
Rpm	: Revolution per minute (dakikadaki devir)
SLT	: Shiga-Like Toksin
SMAC	: Sorbitol MacConkey
sn	: Saniye
ST	: Stabil Toksin
STEC	: Siga toksin üreten <i>Escherichia coli</i>
Stx	: Shiga Toksin
TE	: Tris-EDTA Buffer
Tir	: Transloke intimin reseptörü
TirM	: Transloke intimin reseptörü bağlanma yeri
TNF- α	: Tümör Nekrozis Faktör-alfa
<i>traT</i>	: <i>TraT</i> proteinlerini kodlayan gen
TSB	: Tryptone Soy Broth
TSI	: Triple Super Iron
UPEC	: Üropatojenik <i>Escherichia coli</i>
VP	: Voges Proskaver
VT	: Vero Toksin
VTEC	: Verositotoksin üreten <i>Escherichia coli</i>
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
μ l	: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i> (EPEC)' nin pedestal formasyonu.....	18
---	----

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Meme bezinin yapısı	2
Resim 2.	Mastitisli Süt Örnekleri	3
Resim 3.	Etkenlerin Bulaşma Şeması	4
Resim 4.	<i>Escherichia coli</i>	10
Resim 5.	Kanlı agara yapılan ekim sonucu üreyen saflaştırılmış koloniler	30
Resim 6.	<i>E. coli</i> 'nin EMB Agarda Üremesi	31
Resim 7.	<i>Escherichia coli</i> mikroskopik görüntüsü	31
Resim 8.	<i>Escherichia coli</i> PCR sonuçları	32
Resim 9.	<i>E. coli</i> izolatlarında <i>eae</i> PCR sonuçları	32
Resim 10.	<i>E. coli</i> izolatlarında <i>traT</i> PCR sonuçları	33

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.	Mastitis oluşumunda etkili olan faktörler	5
Tablo 2.	<i>E. coli</i> biyokimyasal özellikleri	12
Tablo 3.	Diyarojenik <i>E. coli</i> 'nin 5 farklı sınıfının karakteristik özellikleri	13
Tablo 4.	PCR' da Kullanılan Genler İçin Primerler	24

ÖZET

MASTITİSLİ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARINDA VİRÜLENS GENLERİN ARAŞTIRILMASI

Vurucu N. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2015.

Ülkemizde ve dünyada mastitise birçok bakterinin neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bunların başını *Staphylococcus* ve *Streptococcus* gibi Gram pozitif bakteriler çekmektedir, bunları Gram negatif bakterilerden *Escherichia coli* izlemektedir. Bu çalışmada özellikle yetiştiriciliği çok yapılan süt sığırları örnekleme materyali olarak kullanılmıştır. Böylece yetiştiricilere rehber olunması, ayrıca moleküler metotların etkin olarak uygulanması amaçlanmıştır. PZR kullanılarak ineklerin klinik mastitis vakalarından izole edilen *E. coli* suşlarında bazı virulens faktör genlerinin araştırılması amaçlandı. Aydın ve İzmir çevresindeki bazı süt çiftliklerinden toplanan 100 adet süt numunesinden 12 adet *E. coli* suşu izole edildi. Bunlardan 1 tanesinde *eaeA* geni, 2 tanesinde *traT* geni tespit edilmiştir fakat izolatların hiçbirinde *aer* genine rastlanamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Mastitis, *E. coli*, PZR, *aer* gen, *eaeA* gen, *traT* gen.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF VIRULENCE GENES OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM MASTITIS MILK

Vurucu N. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Department of Microbiology, Master Thesis, Aydın, 2015.

In our country and in the world has been shown by studies of mastitis caused by various bacteria. These head Gram positive bacteria like *Staphylococcus* and *Streptococcus* draw is followed from these Gram negative bacteria *Escherichia coli*. Especially dairy cattle breeding too made in this study was used as sample material. Thus, when the guide for growers is also intended to ensure effective enforcement of molecular methods. PCR using clinical mastitis cases in cows isolated *E. coli* strains have been investigated in some virulence factor genes. *E. coli* strains were isolated out of 12 from 100 milk samples which were collected from cattle farms around Aydın and Izmir region. They are one of them in the *eaeA* gene, *traT* gene was detected in 2 of them into *aer* gene but is not found in any of the isolates.

Keywords : Mastitis, *E. coli*, PCR, *aer* gene, *eaeA* gene, *traT* gene.

1.GİRİŞ

Theodor Escherich tarafından *Escherichia coli* ilk olarak 1885 yılında tanımlanmıştır. Bu bakteri önceleri *Bacterium coli commune* olarak bilinmektedir ve 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 ve 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 çalışmalarda enteritis, ürogenital enfeksiyonlar, yara enfeksiyonları, mastitis, septisemi ve meningitis gibi hastalıklara neden olan patojen etkenlerden biri olduğu tespit edilmiştir (Wasteson, 2002).

Tüm dünyada, mikroorganizmaların neden olduğu mastitis sığır yetiştiricilerinin en çok ekonomik kayba neden olan hastalığı olarak bilinmektedir. Sığırlarda mastitis çok sık görünmesi dışında ekonomik kayıplara neden olduğundan önemli bir problemdir. Klinik ve subklinik karakterde, akut ve kronik seyirli olabilen mastitisler, sığırlarda verim düşüklüğü, ürün kaybı ve tedavi masrafları nedeniyle ekonomik kayıplara yol açabildiği gibi, insan sağlığı açısından da risk oluşturabilmektedir (Savaşan ve ark, 2004).

Mastitise neden olan bakterilerin başını *Staphylococcus* ve *Streptococcus* gibi Gram pozitif bakteriler çekmektedir, bunları Gram negatif bakterilerden *Escherichia coli* izlemektedir (Savaşan ve ark, 2004).

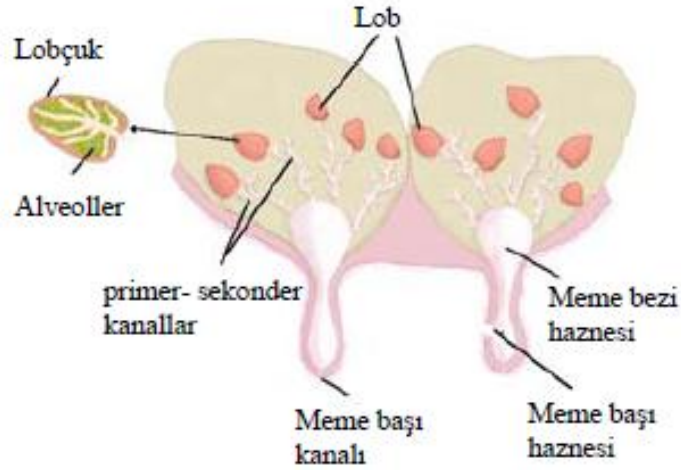
Klinik mastitisin insidensinde son kırk yılda belirgin bir azalma gözlenmektedir. Ayrıca mastitise sebep olan patojenlerde önemli bir değişim görülmektedir. Sığırlarda mastitise neden olan iki temel sebep vardır. Bunlar *Escherichia coli* ve *Streptococcus uberis*'tir (Ferguson ve ark, 2007; Bradley, 2002).

Bu çalışmanın amacı Aydın ve İzmir illerindeki sığırlarda mastitisli inek sütlerinden izole edilen *E. coli* suşlarının virulans genlerini belirlemektir. Bu çalışma doğrultusunda Aydın ve İzmir yöresindeki sığır işletmelerinden alınan mastitisli süt örnekleri *E. coli* açısından incelenmiş ve virülens genlerin saptanması hedeflenmiştir. Özellikle yetiştiriciliği çok yapılan süt sığırları örnekleme materyali olarak kullanılmıştır. Böylece yetiştiricilere rehber olunması, ayrıca moleküler metotların etkin olarak uygulanması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİ

2.1.Meme Yangısı (Mastitis)

İneklerde görülen mastitis enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan etiyolojiye sahip meme bezlerinin yangısı olarak tanımlanır (Bradley, 2002). Ayrıca meme bezi içinde yer alan süt kanalları ile bağ dokunun yangısını da kapsar. Enfeksiyöz, travmatik ve toksik etkenlerin neden olduğu mastitis olguları tek bir inekte enfeksiyon yapabileceği gibi bütün sürüyü veya sürünün bir kısmını da etkileyebilir (Alpay ve Yeşilbağ, 2009).



Resim 1. Meme Bezinin Yapısı (Demirci ve ark, 1992)

Mastitiste meme dokusunda fiziksel ve kimyasal değişiklikler görülür. Ayrıca memenin glandular dokusunda patolojik değişikliklere neden olur. Bunlardan farklı olarak memede duyarlılık artışı, şişkinlik, süt morfolojisindeki değişiklikler ve süt veriminde azalma gibi klinik bulgular görülür. Sütte görülen en belirgin değişiklikler; pıhtı oluşumu renk değişimi ve bolca lökositir (Wellenberg ve ark, 2002).



Resim 2. Mastitisli Süt Örnekleri (Kul ve Ark, 2006)

Klinik mastitiste veteriner ve tedavi masrafları olurken, laktasyondaki ineklerde süt üretimi düşer, süt kalitesi düşer, antibiyotik kullanımından dolayı süt azalır, sonradan oluşacak risk faktörleri artar (Heringstad ve ark, 2000). Üreticinin mali kayıplarının, ulusal düzeye kadar yansımalarının nedeni, verimin düşmesi ile süt ürünlerinin üretim maliyetinin artmasından kaynaklanmaktadır. Süt verimi azalırken, artan tedavi giderleri ile süt verimlerinin artarak devam etmesi gerekirken hayvanların erken dönemde elden çıkarılmak zorunda kalınması ve düşük kaliteli süt üretimi nedeni ile primden mahrum kalınması gibi henüz ülkemizde uygulanmayan konular önemli kayıplar olarak karşımıza çıkmaktadır (Göncü, 2000).

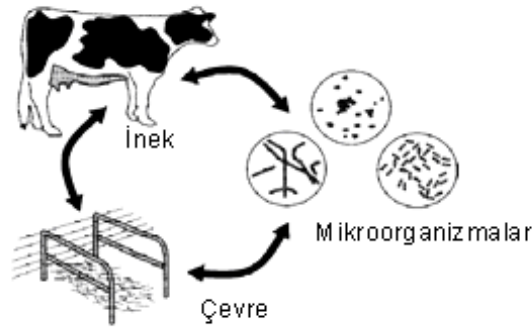
Süt endüstrisinde mastitis nedenli ekonomik kayıplar, süt kalitesinin ve süt veriminin azalması ve buna bağlı olarak da ilaç ve veteriner ve yem giderlerinin artışı sonucunda ortaya çıkmaktadır (Taponen ve Myllys, 1995). Mastitis hayvan sağlığını geri kazanılması açısından da çok pahalı bir hastalıktır. Aynı zamanda, infeksiyonun tedavisi için kullanılan antibiyotiklerin sütte kalıntı bırakması, ilaçların bilinçsiz olarak kullanımına bağlı gelişen antibiyotiklere karşı dirençli bakteriler oluşması ve tedavi olanaklarının sınırlanması gibi olumsuz etkiler meydana gelmektedir (Meiri-Bendek ve ark, 2002; Ferguson ve ark, 2007).

Türkiye’de de birçok ülkede olduğu gibi, gıda ve tarım sektöründe önemli rolü olan süt endüstrisinin ve süt sığırı yetiştiriciliğinin mücadele etmek zorunda olduğu sorunların başında “Mastitis” gelmektedir. Süt veriminin azalması, süt kalitesinin bozulması, sağaltım masrafları ve bunların yanında hayvanların elden çıkarılması gibi nedenlerden dolayı mastitis, ülke ekonomisi için büyük bir öneme sahiptir. Bu durum göz önüne alındığında, mastitise yol açan etkenler ile hastalık patogenezinde rol oynayan faktörlerin belirlenerek, gerekli önlemlerin alınması ve kaliteli süt üretiminin sağlanması hem ülke ekonomisi, hem insan sağlığı, hem de hayvan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Ülkemizde ineklerde mastitisler üzerine birçok

araştırma yapılmış olmasına rağmen günümüzde süt sığırı yetiştiriciliğinin en önemli problemlerinden biri olarak karşımızda durmaktadır.

Mastitis, ayıklama oranını artırır ve yerlerine yenilerin konması ise oldukça pahalıya mal olur, süt sığırlarında hayvanların ayıklanması için meme sağlığı problemleri büyük bir sebeptir. Örneğin, Finlandiya, Norveç ve İsveç'te meme sağlığı problemleri nedeniyle ayıklanan hayvanların oranları sırasıyla, %35, %19 ve %22 dir. Meme sağlığı, Finlandiya'da ana neden olmasına karşın, Norveç ve İsveç'te ise ikinci nedendir. ABD'de ise mastitis ayıklamak için üçüncü önemli nedendir (Shook, 1989).

Türkiye ve çoğu ülkede tarımsal ekonomide geniş bir yer kapladığı bilinen süt endüstrisinin ve süt sığırı yetiştiricilerinin karşılaştığı sorunların en başında mastitis gelmektedir. Türkiye sığır varlığı ile AB ülkeleri içinde 3. sırada, dünyada ise 27. sırada yer almakta ve süt üretimi açısından bakıldığında sığırın payı her geçen yıl artış göstermektedir. ABD'de geçtiğimiz yıllarda mastitis nedeniyle meydana gelen yıllık zararın 2 milyar dolar, İngiltere'de ise 300 milyon sterlin olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye'de ise; mastitisten kaynaklanan yıllık ekonomik zararın 41,5 milyon TL dolayında olduğu fakat etkin bir mastitis kontrol programı için harcanacak her 1 TL'nin sonrasında 5 TL olarak üreticiye geri döneceği düşünülmektedir. Bu nedenle mastitise yol açan etmenlerin bilinmesi ve gerekli önlemlerin alınmasını, hastalıktan kaynaklı zararları azaltmada en önemli adımlar olarak değerlendirmek mümkündür (Atasever ve Erdem, 2008; Memmedova, 2012).



Resim 3. Etkenlerin Bulaşma Şeması (Schroeder, 1997).

Mikroorganizma, çevre ve konakçıya bağlı faktörlerin rol aldığı kompleks bir infeksiyon olan mastitise patojenik *Escherichia coli* suşlarının da yol açtığı bilinmektedir.

E. coli nedenli mastitisler hakkında çok sayıda araştırma yapılmış olmasına karşın hastalığın patogenezi ve prognozu ile ilgili birçok soru cevapsız kalmıştır. Bu nedenle *E. coli*

suşları tarafından oluşturulan olgularda, çevresel kaynaklardan ve mastitislerden izole edilen etkenlerin virulens özelliklerinin araştırılması önemlidir.

Tablo 1. Mastitis oluşumunda etkili olan faktörler (Yavru, 2001).

Mikroorganizmalar	1. Bakteriler 2. Viruslar 3. Mikoplazmalar 4. Mantarlar	
Hayvana ait Faktörler	<i>A. Fizyolojik Faktörler</i> 1. Yaş ve laktasyon durumu 2. Sağım özelliği ve sağım sayısı 3. Süt verimi 4. Irk	<i>B. Mastitise duyarlılığı artıran anatomik faktörler</i> 1. Memenin anatomik ve morfolojik özellikleri 2. Meme ve meme başı yaraları
Çevresel Faktörler	1. Mevsim ve hava koşulları 2. Ahır ve barınak tipi 3. Beslenme 4. Sağım ekipmanları	

E. coli, çoğunlukla yüksek verimli süt ineklerinde rastlanır ve genellikle doğum dönemine yakın veya laktasyonun erken dönemlerinde görülen lokal ve zaman zamanda şiddetli sistemik semptomlarla seyreden bir mastitise yol açar. Çevresel mastitis olarak da bilinen bu durum yüksek verimli süt ineklerinde süt verimini ve kalitesini etkileyebilir ve şiddetli infeksiyonlarda ölüm de şekillenebilir (Burvenich ve ark, 2003).

Koliform mastitisler zaman zaman sporadik veya enzootik olarak seyredebilirler. Enzootik olgular genellikle verimin yüksek olduğu ve diğer mastitis olgularının kontrol altına alındığı sürülerde meydana gelir. Mikroorganizmanın oportunistik olması mastitisin şekillenmesinde rol oynayan faktörler arasındadır ve bu durum konağın fizyolojik ve immunolojik durumuyla ve mikrobiyal faktörlerle ilişkilidir (Sanchez-Carlo ve ark, 1984).

Yüksek süt verimli ineklerin özellikle doğum öncesi dönemlerinde önemli derecede immuno supresyondan etkilendiği bilinmektedir. Yüksek süt üretiminin neden olduğu negatif enerji ve protein dengesi ketozis, nutrisyonel dengesizlikler gibi değişik metabolik bozukluklara yol açarak bağışıklık sistemi üzerinde olumsuz etkilere sebep olur (Goff ve Horst, 1997; Burvenich ve ark, 2003).

Bununla birlikte kandaki keton cisimciklerinin artan plazma konsantrasyonunun, laktasyonun başlangıcındaki hayvanlarda yüksek oranda enerji gereksinimine yol açtığı ve bu durumun da PMN (polimorf nükleer lökosit) lökosit fonksiyonu üzerinde negatif etkiye neden olduğu ve mastitise duyarlılığın arttığı bildirilmiştir (Burvenich ve ark, 2003).

E. coli nedenli mastitislerde dışkı ile kontaminasyon enfeksiyonun başlıca kaynağıdır. *E. coli* ineklerin bağırsak florasında ve yaşadıkları çevrede bol miktarda bulunduğundan dolayı meme başlarına bulaşma riski daima söz konusudur. Ayrıca, çeşitli yetiştirme faktörleri çevrede yüksek oranda bulunan koliform etkenlere laktasyondaki meme bezlerinin maruz kalması üzerinde etkilidir. Koliform bakterilerin asıl kaynakları arasında altlık, temizlenmemiş kaplar, enfekte sular sayılabilir. Bulaşma kaynakları olarak özellikle kontamine altlıklar, koliform mastitisin şekillenmesinde en önemli nedenlerdendir. Altlıklardaki bakteri sayısının azalmasıyla koliform etkenlerin neden olduğu klinik mastitislerin görülme oranı doğru orantılıdır. Bunun dışında toprak, su ve bakıcılar da ayrı bir bulaşma kaynağıdır. Bununla birlikte barınma koşulları, barınaktaki nem oranı da enfeksiyon için gerekli ön koşullara zemin hazırlar. Bu nedenle kötü ahır şartları ve yetiştirme hataları, koliform mastitislerin şekillenmesi için predispoze etkenlerdir (Nemeth ve ark, 1994; Burvenich ve ark, 2003).

İnfeksiyon genellikle çevrenin *E. coli* ile fekal kontaminasyonunu takiben etkenin meme kanalı yolu ile meme bezine ulaşması neticesinde şekillenmektedir. Ayrıca vasküler veya lenfatik sistem vasıtasıyla da etkenler meme bezine ulaşarak mastitise yol açabilir (Kaipainen ve ark, 2002; Hogan ve ark, 2003).

E. coli mastitisleri tipik olarak ani başlar ve genellikle erken postpartum dönemde akut formda görülür. Ancak akut enfeksiyonların yanı sıra perakut, periyodik akut parlamaların şekillendiği kronik ve subklinik enfeksiyonlar da oluşabilir (Jain, 1979; Tmanova, 2003).

Mikroorganizmanın geçişi memeyi sağanların elleri, sağım makineleri gibi sağım esnasında yayılma şekillenir. Bu şekilde infekte hayvanlardan sağlıklı hayvanlara mikroorganizmalar geçer (Tmanova, 2003).

İneklerin *E. coli* kaynaklı mastitislere duyarlılığı ve enfeksiyonun şiddeti patojen etkene ve hayvanın immun yanıtına bağlı olduğu için *E. coli* nedenli mastitislerin sonucu ve şiddeti aynı sürüdeki inekler arasında ve aynı hayvanın farklı laktasyon dönemlerinde çeşitlilik gösterir. Bu nedenle *E. coli*'nin neden olduğu mastitislerin oranı ülkelere göre farklılıklar göstermektedir. Örneğin, Finlandiya'da bu oran %20'den az, İngiltere'de %14,4, İsrail'de %60'dan fazla olarak bildirilmiştir (Bradley, 2002).

2.2. Patogenez

Koliform mastitisler, genellikle patojen etkenin meme başı kanalından meme başı sisternasına geçmesi ile başlar (Wellenberg ve ark, 2002). Özellikle enteritis ve septisemiden sonra kan yoluyla memeye taşınan infeksiyonlar bildirilmişse de, bu durum çok seyrek meydana gelir. Memeye giriş yolları aynı olmasına rağmen, koliform bakteriler kokal etkenlerden farklı olarak meme başı kanalına kolonize olmazlar. Streptokok ve Stafilokok mastitislerinde infekte memeden infekte olmayan memeye bulaşma sağım esnasında sağıcıların elleri, meme havluları ve süt malzemeleri ile olurken koliform bakteriler, memeye sağım esnasında değil, asıl sağım dışındaki bir zamanda girerler (Wellenberg ve ark, 2002). Ayrıca, bir çok olguda etkenler meme bezi epiteline veya paranzimine adhere ya da invaze olmazlar. Ancak kronik veya tekrarlayan mastitislere neden olan bazı *E. coli* suşları epitel dokuya adhezyon ve invazyon yeteneğine sahip olabilmektedirler (Dopfer ve ark, 2000).

Meme bezine ulaşan bakteriler burada hızla çoğalır ve birkaç saat süresinde sütteki konsantrasyonları yaklaşık olarak 10^8 cfu/ml'ye ulaşır. Bu erken dönemi takiben meme dokusuna lökosit göçü başlar. Bu nedenle etkenin çoğalması meme bezindeki lökosit sayısına ve lökositlerin bölgeye hareket hızına bağlıdır. Hastalığın ortaya çıkışı ve şiddeti özellikle vasküler nötrofillerin toplanması ve aktivasyonuna bağlıdır ve koliform mastitisin patogenezinde kilit rol oynar. Çok sayıdaki polimorf lökositler koliformları fagosite ederler. Fagositoz olayı nedeniyle bakteri sayısı hızla azalırken, lize olan bakterilerden açığa çıkan endotoksin miktarı artar. Açığa çıkan endotoksin yangısal reaksiyon zincirinin başlamasına sebep olur. IL-1 (interlökin-1) ve TNF (tümör nekrozis faktör) gibi yangı mediatörleri bu yolla aktive olan fagositlerden serbest kalır ve absorbe edilen endotoksinlerin de etkisiyle semptomlar şekillenir (Burvenich ve ark, 2003; Hogan ve Smith, 2003).

Hastalığın başlaması için ön koşul hızlı bakteriyel proliferasyondur ve klinik bulguların şiddeti ve iyileşme oranı ile ilişkilidir. Deneysel olarak infekte edilen ineklerin sütlerinde etken sayısının infeksiyondan 12-24 saat sonra en üst düzeye çıktığı bildirilmiştir. Bakteriyel üreme oranlarının yaşlı hayvanlarda ve doğum sonrası dönemde daha yüksek olduğu ve bu artışın da hastalığın şiddeti ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu olguların gidişatı sitokinler gibi yangı mediatörlerinin salınımıyla meme bezi hücrelerinin organizmayı tanıması ile ilişkilidir. Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), interferon- γ , interleukin-1 (IL-1) ve interleukin-8 (IL-8) gibi sitokinler meme bezindeki lökositler ile vasküler lökositlerin endotelial hücrelere göçü ve adhezyonunu aktive ederler (Shpigel, 2001).

2.3.Semptomlar

E. coli nedenli mastitisler çoğunlukla sporadiktir ve klinik belirtiler çok şiddetlidir. Yalnızca meme bezlerinde lokal belirtiler gösterebileceği gibi öldürücü olabilen formda da görülebilir. Hastalığın şiddeti konak yanıtına bağlıdır ve etkenin virulens faktörlerinin de önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Shipigel ve ark, 1998; Kaipainen ve ark, 2002). Ayrıca, meme loblarında ve sütte görülen değişikliklerin mastitisin saptanmasındaki ilk bulgular olmasına rağmen, bunların infeksiyonun şiddetinin tahmin edilmesinde yeterli olmadığı belirlenmiştir. Çünkü *E. coli* nedenli mastitislerde infeksiyonun şiddetinin direkt olarak sütteki bakteri sayısı ve infekte olmamış meme lobunun süt üretimindeki azalma ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Burvenich ve ark, 2003).

E. coli mastitisleri tipiktir ve ani başlar. Genellikle erken postpartum dönemde akut formda şekillenir fakat akut infeksiyonların yanı sıra perakut, periyodik akut parlamaların şekillendiği kronik ve subklinik infeksiyonlar da meydana gelebilir (Jain, 1979). Tipik olarak perakut olgular, kısa sürede şiddetli semptomlar ile ve çoğunlukla doğumdan hemen sonra şekillenirler. İnfekte meme şiş, sıcak ve dokunulduğunda ağrılıdır. Süt ise yeşilimsi renkte, pıhtı ve flakonlar içerir ve sulanmıştır.

Hayvanda iştahsızlık, ateş, tremor, depresyon ve rumen stazisi görülür. Bazı durumlarda ise beden ısısı aşırı düşmüş olabilir (Baştan, 2002). Perakut mastitisli ineklerde hastalığa ait herhangi bir semptom şekillenmeksizin endotoksemi sonucu bir kaç gün içerisinde ölüm de şekillenebilir. Eğer inek güçlü bir immun sisteme sahip ise *E. coli* ile infeksiyondan 12 saat sonra bütün bakteriler elimine de edilebilir. Bu ineklerde mastitise ait hiç bir semptom gözlenmez. Fakat bakteriyemi ve endotoksemi nadiren de olsa görülür ve yalnızca çok şiddetli olgularda şekillenir. Deneysel olarak inokule edilen koliform mastitislerde etkenin meme bezinden orijin alarak, sistemik invazyonu ve bakteriyeminin şekillenmediği görülmüştür (Pyörälä ve ark, 1994; Shipigel ve ark, 1998).

Akut koliform mastitisler yaz aylarında ısı stresi altındaki ineklerde daha sık görülür ve bazen tedavisi yapılsa dahi ölümler şekillenebilir (Baştan, 2002). Akut olgularda infeksiyon meme parankiminde şiddetli bir bozukluk şekillendirmez bu sebeple de iyileşmeyi takiben süt veriminde bir düşüş şekillenmez ancak çok şiddetli olgularda hayvan ölmese de süt üretimi kalıcı olarak kaybedilebilir. İnfekte meme bölümü sert, şişkin ve duyarlıdır. Süt sulu ve seröz yapıda olabilir. Özellikle ilk sağılan sütte pıhtılar bulunabilir ve bu birkaç gün devam edebilir (Jain, 1979).

2.4. Teşhis

Mastitislerin teşhisi, sütün klinik muayenesi ve meme lobları ile sütün fiziksel, kimyasal, hücresel ve bakteriyolojik muayeneleri vasıtasıyla yapılır. Meme loblarının inspeksiyonu ve palpasyonu, sütün genel görünümü (kokusu, rengi, kan veya serum varlığı) klinik mastitislerde teşhis için önemlidir. Subklinik mastitislerde ise sütün görünümünde bir değişiklik olmadığı için somatik hücre sayımı, süt pH'sının belirlenmesi, çeşitli biyokimyasal testler, sütün elektrik iletkenliğinin ölçülmesi, California Mastitis Test (CMT), sütün bakteriyolojik muayenesi ile teşhis edilebilir. Yine de koliform mastitisin kesin teşhisi bakteriyolojik incelemeler ile mümkündür (Baştan, 2002; Hamann ve ark, 2005).

2.5. Laboratuvar Muayenesi

Laboratuvar muayenesi için sütün laboratuvara uygun koşullarda getirilmesi gerekir. Bunun için memeler önce temiz su ile yıkanır, sonrasında %70'lik alkol veya bir dezenfektan ile dezenfekte edilir, steril tülbent yardımı ile kurulanır. İlk süt sağılarak atıldıktan sonra steril tüplere her memeden ayrı ayrı alınır, süt örnekleri bekletilmeden laboratuvara gönderilir. Eğer örnekler hemen gönderilmeyecekse soğukta saklanır (Leloğlu, 1999).

2.5.1. Bakteriyoskopi

Süt örneğinden bir öze yardımı ile alınarak lam üzerine yayma froti hazırlanır ve Gram boyama yapıldıktan sonra mikroskopta incelenir. Bu muayene direkt süt örneğinden yapılabildiği gibi santrifüj edilip tortudan da froti hazırlanarak inceleme yapılabilir (Aydın ve Akay, 1984).

2.5.2. Kültür

Süt örneklerinden Kanlı agara, Mac Conkey agara direkt olarak ekim yapılabileceği gibi santrifüj edildikten sonra tortudan da ekim yapılabilir. 37 °C'de 24-48 saatlik inkubasyondan sonra üreyen koloniler *E. coli* yönünden makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ve

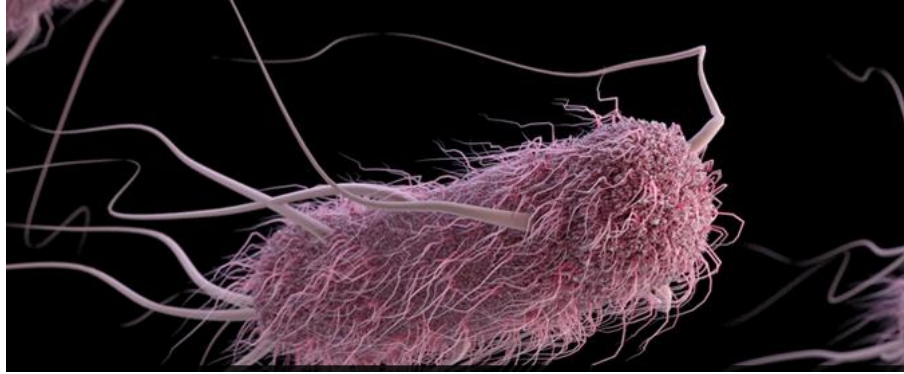
biyokimyasal özelliklerine göre (karbonhidrat fermentasyon testleri, H₂S, İndol, MR (metil red), VP (voges proskaver), Nitrat, vs. identifiye edilirler (İzgür, 1999; Quinn ve ark, 2002).

2.6. *Escherichia coli*'nin Sınıflandırılması

2.1.1. Taksonomik Sınıflandırma

Escherichia coli 1885 yılında ilk olarak Theodor Escherich tarafından belirlenmiştir. Daha önceden *Bacterium coli commune* olarak bilinen bu mikroorganizma sonradan *Escherichia coli* olarak adlandırılmıştır. Bu organizmalar çoğunlukla konak hücreye zarar vermeden, doğumdan itibaren bebeklerin gastrointestinal sistemlerinde kolonize olmaktadır (Drasar ve ark, 1974).

E. coli *Bacteria* aleminin, *Proteobacteria* bölümü, *Gamma proteobacteria* sınıfı, *Enterobacteriales* takımı, *Enterobacteriaceae* ailesi, *Escherichia* cinsi içerisinde yer alan ve prokaryotlar içerisinde çok iyi tanımlanarak sayısız biyokimyasal, biyolojik ve biyoteknolojik çalışmada model olarak kullanılabilen bir bakteri türüdür. (Scheutz ve Strockbine, 2005; Han ve Lee, 2006).



Resim 4. *Escherichia coli* (CDC 2015).

E. coli, düzgün, silindirik, 1,1-1,5 µm x 2,0-6,0 µm boyutlarında insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde predominant olarak bulunan fakültatif anaerofilik Gram-negatif bir bakteridir (Drasar ve ark, 1974). Çomak şekilli olan *E. coli*, sporsuz, aerofilik veya fakültatif anaerofilik ve genellikle peritrik flagellaya sahip hareketli bir bakteridir. *E. coli* suşlarında

kapsül veya mikrokapsül sıklıkla mevcuttur ve *E. coli* pH 5,0-9,0 değerlerinde ürer. Sıvı besiyerinde hızlı üreyerek kısa sürede bulanıklık oluşturan *E. coli* nutrient agar, kanlı agar ile selektif ve diferansiyel besiyerleri olan Sorbitol MacConkey agar(SMAC) ve Eosine Methylen Blue (EMB) agarda 37 °C’de 24 saatte gözle görülebilir yuvarlak 1,2 mm çapında, parlak, düzgün kenarlı S tipli koloniler oluşturur Bazı *E. coli* suşları için Kanlı agarda hemoliz karakteristik bir özelliktir (Sussman, 1997; İzgür, 1999; Quinn ve ark, 2002; Scheutz ve Strockbine, 2005).

Etken laktozu fermente ettiği için MC agarda pembe renkli koloniler, identifikasyonunda kullanılan Eosin-methylene blue (EMB) agarda koyu yeşil-siyah metalik parıldama meydana getirir. Ayrıca besiyerlerinde kenarları düzgün olmayan, küçük ve kuru görünümlü R- tipli koloniler ile mukoid özellikteki koloniler de görülür. Genellikle, patojen olan bazı suşları kanlı agarda hemoliz oluşturma yeteneğindedir. Buyyonda kısa bir süre içerisinde hafif bir bulanıklık oluşturarak ürer (Bisping ve Amtsberg, 1988).

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, septisemi ve meningitis gibi hastalıkların patojenik etkenleri arasında da bulunduğu anlaşılmıştır (Wasteson, 2002).

Bu bakteri genellikle karakteristik biyokimyasal reaksiyonlar yardımıyla identifiye edilmektedir. *E. coli*’nin diğer Enterobakterilerden ayırımında çeşitli moleküler ve biyokimyasal özelliklerinden de yararlanır. *E. coli*’nin glukozu fermente etme yeteneği ve gaz oluşturma 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*’ de % G+C oranı 48-52’ dir. Üreaz aktivitesi, Triple Sugar Iron (TSI) Agarda H₂S üretimi, Oksidaz testi, Voges Proskauer testi ve sitrattan yararlanım özelliği negatiftir. *E. coli* nitratı nitrite indirger. Glikoz, laktoz, D-mannitol, D-mannoz, Dsorbitol, L-arabinoz, D-ksiloz, maltoz, trehaloz, ramnoz gibi karbonhidratları asit ve gaz oluşturarak ayrıştırır (Koneman ve ark, 1992; Sussman, 1997; Quinn ve ark, 2002).

Tablo 2. *E. coli* biyokimyasal özellikleri (Koneman ve ark, 1997)

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

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

E. coli' nin önemli bir transformasyona uğradığı ve bunun süreceği bildirilmiştir. Başlangıçta bağırsaklarda zararsız bir bakteri olarak bilinen *E. coli*'nin bazı suşlarının aslında insan ve hayvanlarda hastalığa neden olan patojenler olduğu anlaşılmıştır. *E. coli* nedeniyle oluşan hastalık salgınları binlerce kişiyi etkileyebilmektedir (Nataro ve Kaper, 1998).

E. coli kaynaklı enfeksiyon sonucunda enterik/ ishalleri hastalıklar, üriner sistem enfeksiyonları, sepsis/menanjit gözlenmektedir. *E. coli*'nin patojenik suşları farklı patotiplere ayrılabilir, her patotip ise farklı bir hastalığa neden olmaktadır. 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 (Kaper ve ark, 2004).

En yaygın ekstraintestinal patotip, üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan üropatojenik *E. coli* (UPEC)' dir. Bu grupta yer alan diğer önemli patotip ise menanjit/sepsis ilişkili *E. coli* (MNEC)'dir. İlginç bir durum olarak, fonksiyonel çalışmalarda 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; Paresh ve ark, 2013).

Bu patotiplerin her biri benzer virulans genleri taşıyan yakın ilişkili organizmaların bir koleksiyonundan oluşmaktadır. Örneğin; bütün ETEC izolatları benzer yapıda ısıya duyarlı yada ısıya dirençli toksinler üretebilmektedir. Aynı şekilde bütün EPEC izolatları virulans için gerekli olan tip III sekresyon sistemine sahiptir (Kaper ve ark, 2004).

Diyaröjenik *E. coli* suşlarının sınıflandırılması ise; adhezyon, invaziv ve toksin üretme yeteneğine dayanmaktadır (Çizelge 2.).

Tablo 3. Diyaröjenik *E. coli*'nin 5 farklı sınıfının karakteristik özellikleri (Nataro ve Kaper, 1998).

Patotip	Virulans Determinantları	Adhezyon ve İnvazyon özellikleri	Hastalık ilişkisi
Enterotoksijenik <i>E.coli</i> (ETEC)	labil(LT) ve stabil (ST) enterotoksin	Adheziv ve noninvaziv	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	Mukoid ishal, sulu ishal
Enteropatojenik <i>E.coli</i> (EPEC)	Yalancı pili oluşumu; kromozomal patojeniteada ürünleri (LEE)	Kümeler halinde adhezyon. A/E lezyon oluşumuna yol açmaktadır	Az gelişmiş ülkelerde bebek ishali
Enterohemorajik <i>E.coli</i> (EHEC, STEC)	Şiga toksin; LEE patojeniteada ürünleri.	Yüksek derece adheziv, Non-invaziv	Kanlı ishal, Hemorajik kolitis(HC), Hemolitik Üremik Sendrom(HUS)

2.1.2. 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 (kapsüler) ve iv) F (fimbrial) antijendir (Orskov ve ark, 1982; Lior ve ark, 1996). 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. Her biri ayrı bir serogrubu ifade eden 170 farklı O antijeni tanımlanmıştır (Nataro ve Kaper, 1998; Kaper ve ark, 2004).

Flagellar (H) antijenin antijenik çeşitliliği, flagella yapısında bulunan farklı tiplerdeki flagellin proteinine dayanmaktadır. Fakat flagelları gelişmiş hücreler organizmanın yarı agardan pasajlanmasıyla elde edilebilir. Hareketli olmayan bu suşlar non-motile (NM) ya da H- olarak ifade edilmektedir (Chandler ve Bettelheim, 1974).

Kapsüler (K) antijen, O-spesifik lipopolisakkaritten bağımsız olarak asidik polisakkaritlerden 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).

2.7. *E. coli*'nin Virulens Faktörleri

E. coli patojenitesi, patotipe göre değişen ve çok sayıda virulens faktörü içeren kompleks, multi-faktöriyel bir mekanizmadır. Patojenik *E. coli* suşları neden oldukları hastalık tipine ve infekte ettikleri hayvan türüne spesifiktirler ve spesifik hastalıkların patogeneğinde sahip oldukları virulens faktörlerinin önemli rolü vardır. Çünkü patojenik *E. coli* suşları ile konak organizma arasındaki ilişki bakteri tarafından sentezlenen virulens faktörlerin varlığına bağlıdır (China ve Goffaux, 1999; İzgür, 1999; Kuhnert ve ark, 2000).

Virulens faktörleri kodlayan genler, bakteri genomunda veya plazmidlerde bulunurlar. Virulens faktörler konağı infekte etmede, konağın savunma sistemi ile savaşmada ve kolonizasyonda rol oynarlar. Özellikle ekstraintestinal infeksiyonların şekillenmesinde mukozal yüzeylere kolonizasyon, epitel hücre tabakasını geçiş, komplementin bakterisidal etkisine direnç, fagositozdan kurtulma ve canlı kalarak çoğalma yeteneği önemlidir (Harel ve ark, 1993; Le Bouguenec ve Bertin, 1999).

Ancak bakteriler sürekli olarak virulens faktörleri sentezlemezler, yalnızca çevreden veya konakçıdan ilgili sinyalleri aldıkları zaman sentezlerler. Yapılan çalışmalarla, *invitro* olarak virulens gen ekspresyonunu uyaran faktörler saptanmıştır. Bu faktörlere örnek olarak sıcaklık, ozmolarite, pH, nitrojen, demir, şeker ve aminoasit konsantrasyonları verilebilir (Lehtolainen, 2004).

E. coli suşlarına ait virulens faktörlerin ana grubunda adhezinler, toksinler, konak hücrelerine salınan proteinler, polisakkarit kapsül, komplement tarafından öldürülmeye direnç ve aerobaktin sideroforları gibi çeşitli faktörler vardır (Harel ve ark, 1993; China ve Goffaux, 1999).

2.7.1. Adhezinler

Patojenik mikroorganizmalar kendilerini korumak ve konakçı bariyerlerini aşmak için çeşitli ortak yollara sahiptirler. Bu yolların ilk aşaması mikroorganizmanın konak hücreye sıkı bir şekilde yapışması yani adhezyondur. Adhezyon, bakteri hücrelerinin kolonizasyonu ve infeksiyonun oluşumunda büyük önem taşımaktadır. Bakterilerin ökaryotik hücrelere adhezyon yeteneği, konakçı dokularına kolonizasyon için oldukça gerekli bir özelliktir. Birçok patojenik organizma için adherens, epitelyal hücre yüzeylerine başarılı bir kolonizasyon açısından kommensal mikroorganizmalar ile rekabette büyük bir öneme sahiptir (Gaastra ve Graaf, 1982; Clegg ve Gerlach, 1987) .

Mikroorganizmalar konakçı sekresyonlarındaki immun sistemle ilişkili olan yada olmayan engelleri aştıktan sonra mukoza yüzeyini yıkayan sekresyonlar ile uzaklaştırılmaktan kurtulmak için hücre epitellerine bağlanmalarının yanı sıra burada üreyerek epitel hücrelerinin dökülmesiyle uzaklaştırılan bakterilerin yerlerine yeni bakterilerin yapışmasını sağladıklarından adhezyon patojenite yönünden önem taşımaktadır. Patojenik mikroorganizmalar konak dokularına bağlanarak idrar, kan, bağırsak içeriği vb. sekresyonların etkisinden kurtulurlar ki bağlanma işlemi mukozal yüzeylere kolonizasyon için gerekli ilk basamaktır (Johnson, 1991; Bülbül, 2000).

Bakteri konak hücreye adhezyon ve kolonizasyon için adhezine ihtiyaç duyar. Konak hücrelere kolonizasyon bakteri yüzeyindeki adhezinlerle sağlanır ki bu adhezinler konak hücre yüzeyindeki spesifik reseptörleri tanıma ve bağlanma özelliğindedirler. Fimbria bakteri ile konakçı hücre arasında teması sağlar, fimbriyanın distalinde yer alan ve adhezin olarak tanımlanan protein yapı ise konak hücre üzerindeki reseptörlere bağlanarak adhezyonu

gerçekleştirir. Adhezinler fimbria üzerinde yer alabildiği gibi direkt mikroorganizma üzerinde yer alan afimbrial adhezinler de mevcuttur. Sığırlarda infeksiyona neden olan *E. coli* suşlarında çok sayıda farklı adhezin saptanmıştır (Le Bougenic ve Bertin, 1999; Soto ve Hutgren, 1999; Wizeman ve ark, 1999).

E. coli suşlarına ait fimbrialar hemagglütinasyon özelliklerine göre Tip I ve Tip II olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Hemagglütinasyon aktivitesi D-mannoz varlığında inhibe edilen fimbrialar mannoz duyarlı (Tip I / F1) fimbrialar olarak tanımlanırken hemagglütinasyon aktivitesinin D-mannoz ile önlenemediği fimbrialar mannoz dirençli (Tip II; P fimbria, S fimbria vb.) fimbrialar olarak adlandırılırlar (Johnson, 1991; İzgür, 1999).

2.7.2. Toksinler

Patojenik *E. coli* suşları, farklı aktivitelere sahip toksinler üretebilmektedirler ve *E. coli* suşları ekzotoksinler ve endotoksinler olarak sınıflandırılan toksinleriyle patolojik etkilere neden olurlar. Mikroorganizmalar tarafından bağırsakta üretilen toksinler enterotoksinler olarak tanımlanırlar (Bülbül, 2000). Enterotoksinler genellikle buzağı, kuzu, domuz yavrusu gibi genç hayvanlarda bağırsak infeksiyonlarına neden olan *E. coli* suşları tarafından sentezlenirler (İzgür, 1999). İnsan ve hayvanlarda hastalıklara yol açan toksijenik *E. coli* suşları Enterotoksijenik *E. coli* suşları (ETEC), Verotoksijenik *E. coli* suşları (VTEC) ve Nekrotoksijenik *E. coli* suşları (NTEC) olarak üç grupta incelenirler (Blanco ve ark, 1997).

Enterotoksijenik suşlar, patogeneizde önemli rol oynayan ısıya dayanıklı stabil toksin (ST) ve ısıya duyarlı labil toksin (LT) olmak üzere temel iki grup enterotoksin üreterek çocuklarda, buzağılarda, domuz yavrularında, kuzularda diyareye yol açarlar ve bu toksinler diyarenin ana nedenidirler. Isıya duyarlı toksinleri LTI ile LTII ve ısıya dayanıklı toksinleri STIa, STIb ve STII genetik, antijenik ve fonksiyonel olarak iyi bir şekilde nitelendirilmişlerdir (Blanco ve ark, 1997; Nataro ve Kaper, 1998).

Verotoksijenik suşlar, Verotoksin (VT) üretirler ki bu toksine Siga benzeri toksin (SLT) de denilir. Verotoksin, O157:H7 serotipindeki enterohemorajik *E. coli* suşları ve bazı enteropatojenik *E. coli* suşları tarafından üretilir. Verotoksijenik *E. coli* suşları insanlarda diyare, hemorajik kolitis, hemolitik üremik sendrom ve trombotik purpuraya neden olurken, hayvanlarda diyare ve ödem hastalığına yol açarlar. Verotoksinler VT1, VT2 ve VT2 varyantları (VT2v, vtx2ha, vtx2hb) şeklinde antijenik, genetik ve fonksiyonel olarak üç grupta incelenmişlerdir (Blanco ve ark, 1990; Nataro ve Kaper, 1998). Nemeth ve ark (1994) sığır

mastitislerinden izole ettikleri *E. coli* suşlarının yalnızca %8'inin vero hücrelerde toksik etki gösterdiğini saptamışlardır.

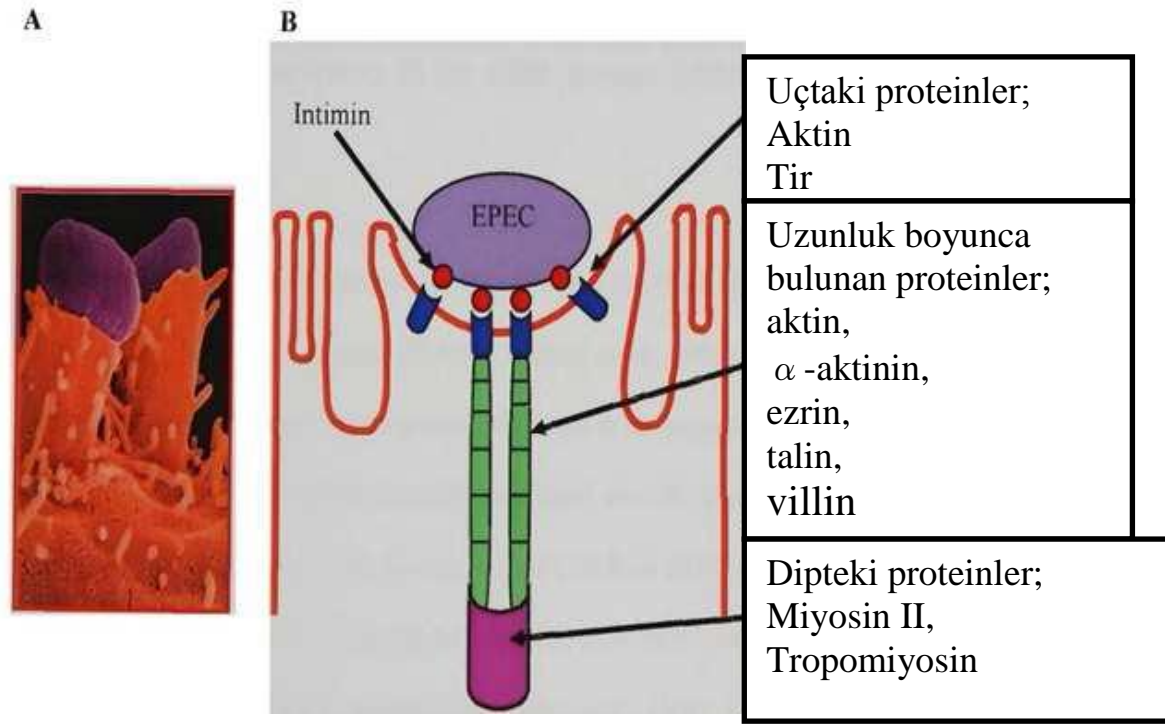
E. coli suşlarında patojenitede önemli rol oynayan faktörlerden birisi de endotoksin veya lipopolisakkarittir (LPS). LPS, toksik özelliği sağlayan Lipid A ve "O" antijen olarak tanımlanan polisakkarid ünitelerden oluşur (Burvenich ve ark, 2003). Gram negatif bakterilerde, konakçıda hasara yol açan temel virulens faktör endotoksindir. Endotoksin, hem toksik bir bileşiktir hem de konağın savunma mekanizmasını indükler. Endotoksin, bakteri öldüğünde açığa çıkarak yangısal yanıtı başlatır. Ruminantlarda patofizyolojik etkileri doza bağlı olup, metabolik ve klinik belirtilerin çeşitliliğine yol açar. Klinik mastitislerde anoreksi, ateş, dehidrasyon, diyare ve süt üretiminde azalma gibi belirtilerin direkt ya da dolaylı olarak endotoksinin sistemik veya lokal etkisi sonucu olduğu bildirilmiştir. Koliform mastitisler, kan-süt bariyeri hasar gördüğünde bakteriyemi ve septisemiye neden olabilir. Septisemi ile sonuçlanan koliform mastitislere nadiren rastlanır fakat septisemi şekillenmiş ise çoğunlukla ölümle sonuçlanır (Hogan ve Smith, 2003).

2.7.3. İntimin

İntimin *E. coli*'nin virulans faktörlerinden birisidir ve 94-97 kDa ağırlığında bir dış membran proteinidir (OMP) (McDaniel ve ark, 1995). İntimin, insan ve hayvan modellerinde virülens 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 (bağlanma) ve effacing (silinme) (A/E) lezyonlarının oluşumuna yol açan konak epitelyal membranda STEC adhezyonunda görevlidir (Paton ve Paton, 1998). Bu bağlayıcı ve yıkımlatıcı A/E lezyonları bakterinin konakçı hücre membranına yerleşip intestinal epitelyal hücreleri dejeneretmesi 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 (Rosenshine ve ark, 1996; Kalman ve ark, 1999). *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 STEC suşları tarafından üretilen A/E lezyonları başarılı bir şekilde çalışılmakta ve bu prosteparadigma olarak hizmet etmektedir.



Şekil 1. 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 sematik görünümü.
Tir: Transloke olan intimin reseptörleri

2.7.4. Serum Dirençliliği

Serumun bakterisidal etkisinden kurtulma yeteneği önemli bir virulens faktördür ve patojenitede rol oynar. Plazmidlerin varlığı, polisakkarit kapsül, lipopolisakkarit O yan zincirin tipi ve yüzey proteinlerinin serum dirençliliği ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Sanchez-Carlo ve ark, 1984; Montenegro ve ark, 1985). Serum dirençliliği, Gram negatif bakterilerde en çok çalışılan virulens faktörlerden birisidir. Serumun öldürücü etkisine karşı direnç, özellikle bakteri yüzeyindeki yapılarla ilişkilidir. Kapsül veya dış membran proteinlerinin (*ompA* ve *traT* gibi), komplement komponentlerine ve membran atak kompleksine karşı savunmada rol alarak öldürücü etkiyi önledikleri saptanmıştır (Lehtolainen,

2004). Kısacası, serum dirençliliği *traT* ve iss proteinleri gibi plazmidler tarafından kodlanan dış membran proteinleri ile lipopolisakkarit, K1 kapsül antijeni gibi birçok faktör ile bağlantılıdır (Nemeth ve ark, 1991).

TraT, 25 kDa molekül ağırlığına sahip bir yüzey lipoproteinidir ve *traT*'yi kodlayan *traT* geni büyük konjugatif plazmidler (IncF plazmidler) üzerinde bulunur. *traT*'nin, komplemanın membran atak kompleksinin inhibisyonunda ve bakterinin fagositoza karşı direnç göstermesinde rol aldığı düşünülmüştür (Aguero ve ark, 1984; Montenegro ve ark, 1985). TraT ile birlikte çalıştığı düşünülen K1 kapsüler antijeni, *E. coli* suşlarını serumun öldürücü etkisinden korur. Yapılan bir çalışmada, K1 kapsüler antijen, özellikle ekstraintestinal infeksiyonlara yol açan *E. coli* suşlarının patogenezinde önemli bir virulens faktör olarak gösterilirken, bu etkiyi bakteri hücreleri üzerine komplemant hareketini bloke ederek sağladığı düşünülmüştür ve *traT* proteininin insanlardan izole edilen *E. coli* suşlarında K1 kapsüler antijenin varlığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Montenegro ve ark, 1985). Ancak daha sonraları yapılan çalışmalarda ise, K1'in serum direnci ya da *traT* geni ile bir ilişkisinin saptanamadığı açıklanmıştır (Nemeth ve ark, 1991; Lehtolainen, 2004).

2.7.5. Aerobaktin Demir Elde Etme Sistemi

Birçok enterik bakteride özellikle, invaziv hastalıklarla ilişkili olanlarda, ikinci bir siderofor olarak aerobaktin bulunmaktadır (Payne, 1988; Harel ve ark, 1993; Binderif A ve ark, 1985). Bu hidroksimat, ilk olarak *Aerobacter aerogenes* suşlarında bildirilmiştir. Daha sonra ise, *Shigella flexneri*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp. ve *Morganella* spp. 'de identifiye edilmiştir. Aerobaktin iki lizin ve bir sitrat molekülünden oluşan, moleküler ağırlığı küçük olan bir moleküldür (Johnson, 1991).

Aerobaktin basit bir genetik sistem tarafından kodlanmaktadır ve biyosentezi için dört gen (*iucA*, *iucB*, *iucC*, *iucD*) gereklidir. Biyosentez *iucD* ürünü tarafından lizinin oksidasyonu ile başlar. Hidroksilizinin asetilasyonu ise *iucB*'nin fonksiyonudur. *iucA* ve *iucC*, iki asetil hidroksilizin yan zincirinin sitrata bağlanmasını katalize eden sentetazın alt ünite genleridir. Aerobaktin ile ilişkili olan beşinci gen (*iutA*) ise dış membran reseptörünü kodlar ve bu reseptör *E. coli*'de 74.000 Da büyüklüğündedir. Aerobaktin ile ilgili olan bu beş gen tek bir operon üzerindedir ve *E. coli*'de aerobaktin sentezi *fur* lokusu tarafından kontrol edilir. Bazı *Salmonella* spp., *Shigella* spp. ve enteroinvaziv *E. coli* izolatlarında ilgili genlerin

kromozomal yerleşimli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, aerobaktin genleri plazmid tarafından da kodlanabilmektedir. ColV ve F1me plazmidleri üzerinde bu genler saptanmıştır (Payne, 1988).

Virulenste demir transport sistemlerinin rolü ColV plazmidi taşıyan *E. coli* suşlarında anlaşılmıştır. En erken 1949 yılında *E. coli* suşlarında kolisin V üretimi ile virulens arasında bir korelasyonun olduğu biliniyordu. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalarla ColV plazmidi kaybının suşları ColV+ suşlara göre daha az patojen bir hale getirdiğini saptamışlardır (Payne, 1988). Aerobaktin varlığı, özellikle çiftlik hayvanlarında ekstraintestinal infeksiyonlara, kanatlılarda koliseptisemilere, insanlarda ürosepsis, pyelonefritis ve sistitislere neden olan etkenlerde saptanmıştır (Payne, 1988; Harel ve ark, 1993). Ayrıca, hayvanlarda aerobaktin sentezleyen üropatojenik *E. coli* suşlarının, üretmeyen suşlara göre daha letal etkili olduğu bildirilmiştir (Binderif A ve ark, 1985; Zhang ve Normark, 1996).

2.8. PZR

PZR, 1985 yılında Kary Mulis tarafından ilk uygulaması yapılan bir teknik olup, belirli bir DNA parçasının kopyalanmasına ve çoğaltılmasına olanak sağlayan *in vitro* bir yöntemdir. Avantajları nedeniyle tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarında kalıtsal hastalıkların teşhisi, genetik parmak izlerinin tanımlanması, bulaşıcı hastalıkların teşhisi, genlerin klonlanması, babalık testi ve DNA hesaplaması gibi değişik konularda yaygın bir şekilde kullanılır hale gelmiştir. 1989 yılında, bu çalışma o yıla ait "en büyük bilimsel gelişme" olarak kabul edilmiştir. Dr. Kary B.Mullis 1980'li yıllarda yaptığı bu PCR çalışmaları ile 1993 yılında Kimya alanında Nobel Ödülü almıştır (Wolcott 1992; Anonim, 2015).

Nükleik asitlerin özgün moleküller olmaları PZR'de fenotipik tanı yöntemlerinde karşılaşılan zorluklara göre daha net sonuçlar alınmasını; Çok az miktardaki materyalden bile 24 saat gibi kısa sürede güvenilir sonuçlar almayı sağlamıştır.

PZR yönteminin gelişmesinde en büyük katkıyı Taq Polimeraz (*Thermus aquaticus*) enziminin bulunması yapmıştır çünkü bu enzim yüksek sıcaklıklarda dahi dayanabilen ve özgünlüğü önemli ölçüde arttıran bir enzimdir. Bu enzim ilk olarak Yellowstone milli parkında bir kaplıcada yaşayan termofilik bir bakteriden izole edilmiştir (Saiki ve ark, 1988; Wollenhofer, 1999).

PCR'in temel bileşenleri; kalıp DNA, primerler, polimeraz enzimi, Deoksinükleotid Trifosfat (dNTP) ve tampon solüsyonlardır. PZR, 3 temel aşamada gerçekleşir:

1) Ayrışma (Denatürasyon) : Çoğaltılması istenen çift sarmal DNA'nın, hidrojen bağlarının ayrılması sağlanır. 93-96 °C'de 1-2 dakikada gerçekleşir. DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir. Ortamdaki tüm çift sarmal DNA tek sarmal DNA formuna dönüştüğünde reaksiyon tamamlanır. Ortamda tampon, dNTPs, hedef DNA'ya özel primerler ve Taq polimeraz enzimi bulunur.

2) Bağlanma (Annealing) : Oligonükleotid primerlerinin açılan birinci aşama sonucu tek iplikçikli hale dönüşen DNA sekanslarının kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgesine yapışması işlemidir. Ortalama 55-65°C gibi daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşir. Yaklaşık 3-4 dakika sürer.

3) Uzama (Ekstensiyon) : Bağlanma aşamasından sonra, primer hibritleştiği DNA'nın karşılığını sentezler. Taq polimeraz enzimi, nükleotidleri orijinal DNA ipliğine komplementer olacak biçimde primere ekler ve uzatır. Bu aşamada ortam ısısı yaklaşık 72 °C'dir.

Bahsettiğimiz üç aşama bir döngü olarak kabul edilir. 3-5 dakika sürer. Bu olay 20-40 kez tekrarlanır. Bu sürecin sonunda bir milyon DNA kopyası elde edilir. PZR'ın uygulanabilmesi için, kesin olarak doğru bir baz dizisi bilgisine ihtiyacımız vardır.

PZR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamid jellerde yürütüldükten sonra, ethidium bromide (EtBr) veya gümüş nitrat (GN) ile boyanarak gözlemlenir.

Son derece duyarlı olması nedeniyle çok küçük miktarlardaki kontaminasyonlar bile yanlış sonuçlara neden olabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örneklerin Toplanması

Araştırma için Aydın ve İzmir illeri ve çevresinde bulunan, özellikle Kiraz ilçesindeki büyük ölçekli (50 ve üzeri sağmal inek) işletmeleri ve aile işletmesi olarak farklı sığırların işletmeleri ziyaret edilerek, birçoğu laktasyon döneminde olan, en az bir doğum yapmış ineklerden 100 adet süt örneği, hayvanların memelerinden tekniğine uygun bir şekilde 20 ml'lik steril enjektörlere alındı ve soğuk zincir uygulanarak aseptik şartlarda Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına ulaştırıldı. Örnekler seçilirken dolgun ve yangılı görünen memelerden süt alınmaya gayret edildi. Doğrulama yapmak amacıyla ilk olarak kalifornia mastitis test (CMT) uygulandı ve pozitif sonuç veren örnekler *E. coli* identifikasyonu için seçildi.

3.1.2. Besiyerleri

Etken izolasyonu amacıyla %5 koyun Kanlı Agar, identifikasyon amacıyla MacConkey Agar ve Eosin Metilen Blue Agar (MERCK) ve izole edilen suşların pasajı için Nutrient Agar ve Nutrient Buyyon (OXOID) kullanıldı. Suşların hemoliz özelliklerinin belirlenmesi için %5 koyun kanlı agardan ve izole edilen suşların hemaglutinasyon aktiviteleri ile kolisin aktivitelerinin incelenmesi öncesinde etkenin üretilmesi amacıyla Nutrient Buyyon'dan yararlanıldı.

3.1.2.1. Kanlı Agar Base (OXOID CM0055)

Blood agar base.....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 %5 oranında steril koyun kanı ilave edildi.

3.1.2.2. Eozin - Metilen Blue (EMB) Agar (MERCK)

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 dakika otoklav edilmek suretiyle steril edildi.

3.1.2.3. Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar (Difco 279100) ve CT SMAC Agar (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 etmektedirler.

3.1.3. PZR

Etkenlerin izolasyon ve identifikasyonunu takiben virulens genlerin belirlenmesi için selektif primerler yardımıyla PZR yöntemi kullanıldı.

3.1.3.1. Primerler

Tablo 4. PZR’ da Kullanılan Genler İçin Primerler

Hedef DNA	Oligonükleotid dizilimi	PZR (bç)	Referans
<i>eae</i>	F 5’-ATATCCGTTTTAATGGCTATCT-3’ R 5’-AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA-3’	425	Güler ve Gündüz (2007)
<i>aer</i>	F 5’-TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT-3’ R 5’-AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG-3’	602	Oliveira ve ark. (2011)
<i>traT</i>	F 5’-GATGGCTGAACCGTGGTTATG-3’ R 5’-CACACGGGTCTGGTATTTATGC-3’	307	Kaipainen ve ark. (2002)
<i>E. coli</i>	F 5’-GCTTGACACTGAACATTGAG-3’ R 5’-GCACTTATCTCTTCCGCATT-3’	662	Abd El-Razik et al. (2010)

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Alınması

Araştırma için Aydın ve İzmir illeri ve çevresinde bulunan, büyük ölçekli (50 ve üzeri sağmal inek) işletmeleri ve aile işletmesi olarak farklı sığır işletmeleri ziyaret edilerek, birçoğu laktasyon döneminde olan, en az bir doğum yapmış ineklerden örnekler, hayvanların memelerinden tekniğine uygun bir şekilde 20 ml’lik steril enjektörlere alındı. Bunun için memeler önce temiz su ile yıkandı, sonrasında %70’lik alkol veya bir dezenfektan ile dezenfekte edildi ve steril tülbent yardımı ile kurulandı. İlk süt sağılarak atıldıktan sonra steril enjektörlere her memeden ayrı ayrı alındı ve soğuk zincir uygulanarak aseptik şartlarda

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına ulaştırıldı.

3.2.2. *E. coli* İzolasyonu

E. coli suşlarının izolasyonu için toplanan örneklerden direkt olarak Kanlı Agar, MacConkey Agar ve Eosin Metilen Blue Agar'a ekim yapılarak 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası şekillenen kolonilerin makroskopik ve mikroskopik morfolojileri incelenerek etken için spesifik olan (İndol, H₂S, MetilRed, Voges Proskaver) biyokimyasal testler ile identifikasyona gidildi (Scheutzve Strockbine, 2005). 24 saat inkübasyon sonunda üreme şekillenen besiyerlerinden preparatlar hazırlanarak Gram boyama yapıldı. Boyama sonucunda belirlenen Gram negatif bakterilerin ait olduğu kolonilere biyokimyasal testler uygulandı.

3.2.2.1. Fenotipik identifikasyonu

İzole edilen izolatların koloni morfolojileri, biyokimyasal test sonuçları ve identifikasyon besiyerleri değerlendirilerek *E. coli* identifikasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla Sorbitol MacConkey Agar ve Eozin - Metilen Blue (EMB) Agar kullanıldı.

3.2.2.1.1. Sefksim-Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agarda üreme

Kanlı agarda 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 bırakıldı. İnkübasyon sonunda renksiz olan koloniler sorbitol negatif, pembe kırmızı koloniler ise sorbitol pozitif olarak değerlendirildi (Doyle ve Schoeni, 1987).

3.2.2.1.2. Eozin - Metilen Blue (EMB) Agarda üreme

Kanlı agarda üredikten sonra saflaştırılan, gram boyama ile Gram negatif olarak belirlenen ve biyokimyasal testler açısından *E. coli* şüpheli kolonilerden EMB agarlara öze ile ekim yapıldıktan sonra petri kutuları 37 °C’de 24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda laktozu kullanamayan bakteriler renksiz koloniler, laktozu kullanabilen *E. coli* için tipik koloniler ise yeşilimsi ve parlak metalik renkte koloniler olarak değerlendirildi (Doyle ve Schoeni, 1987).

3.2.2.2. 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. İnkubasyondan sonra tüpler değerlendirildi ve *E. coli* izolatlarının identifikasyonları gerçekleştirildi. (Holt ve ark, 1994; Koneman ve ark, 1997).

3.2.2.2.1. 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).

3.2.2.2.2. 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 ayıraçlarından (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).

3.2.2.3. *E. coli* Lam Aglutinasyon Testi

E. coli olarak belirlenen kolonilere O antijeninin varlığının araştırılması amacıyla O antijen lam aglutinasyon testi uygulandı (Sakazaki, 1992). *E. coli* olarak belirlenen kolonilerden 30 µl alınarak Nutrient broth içeren mikro santrifüj tüplerine inoküle edildi. 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 sağlandı. İnaktive antijen eşit miktarlarda distile su ile yıkanarak 20 dakika boyunca 900 rpm’ de santrifüj edildi. Yıkama ve santrifüj işlemi 3 kez tekrarlandı. Tüplerdeki süpernatant uzaklaştırılıp çökelti 0.5 ml fizyolojik tuzlu su ile süspansiyon edilerek antijenik solüsyon olarak kullanıldı.

Sonraki aşamada her polivalan antiserumdan bir damla ve 30 µl fizyolojik tuzlu su asetat kalem ile bölümlere ayrılmış temiz lamlar üzerine damlatıldı. Lam üzerindeki her antiserum-fizyolojik tuzlu su karışımının üzerine antijenik süspansiyondan 5-10 µl damlatıldı. Lamlar sağa sola 1 dakika boyunca eğilerek süspansiyonların karışması sağlandıktan sonra O pozitif olan karışımlarda aglutinasyon deseni şekillendi. Aglutinasyon florasan ışığı altında lamlara bakılarak aglutinasyon net olarak gözlendi. Aglutinasyon ilk 1 dk sonunda şekillendiği için aglutinasyon oluşmayan veya hafif oluşan örnekler negatif olarak değerlendirilirken tam aglutinasyon şekillenenler pozitif olarak değerlendirildi. Polivalan serum ile pozitif sonuç veren numuneler aglutinasyon pozitif O antiserumlar, polivalan serum ile negatif sonuç veren numuneler ise aglutinasyon negatif O antiserumlar olarak belirlendi.

3.2.2.4. Genotipik identifikasyon

PZR’da kullanılmak üzere *E. coli* izolatlarından total DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemi ile aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

- *Süpheli koloniler nutrient agar’a ekildi ve 37° C’de 24-48 saat inkübe edildi.
- * Koloniler öze yardımı ile toplanarak, 500 µl DNase-RNase free ependorf tüpünde deiyonize su ile süspansiyon edildi ve 100 °C’de 10 dk kaynatıldı.
- * Daha sonra 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı PZR’da hedef DNA olarak kullanılmak üzere saklandı.

3.2.2.4.1. PZR

3.2.2.4.1.1. PZR Karışımı

E. coli şüpheli izolatların PZR ile identifikasyonu Abd El-Razik ve ark. (2010)'nın kullandıkları protokolün modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Bu amaçla 25 µl son hacim içinde olmak üzere 5 mikrolitre templeyt DNA, 1X PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 1 µM primer, 0,2 mM dNTP ve 2 U Taq polimeraz içeren PCR karışımı hazırlandı. Amplifikasyon koşulları olarak 95°C'de 2' ilk denatürasyon, 35 siklus 94°C'de 45sn denatürasyon, 57°C'de 45sn bağlanma, 72°C'de 45 sn uzama ve son siklustan sonra 72°C'de 10' son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. *E. coli* için 662 bç'lik bant görülmesi pozitif olarak kabul edildi. İdentifiye edilen *E. coli* izolatlarının bazı virülans genlerinin belirlenmesi için aşağıdaki koşullarda PZR gerçekleştirildi:

Güler ve Gündüz (2007) tarafından bildirilen koşullarda *eae* için 25 µl toplam hacimde PCR karışımı hazırlanmıştır. Karışım 1X Taq buffer, 1,5 mM MgCl, 250 µM dNTP, 0,5 µM primer, 1,25 U Taq polimeraz ve 5 mikrolitre DNA içerecek şekilde hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 25 siklus için 94°C 30sn, 50°C 45sn, 70°C 90 sn ve son uzama için 70°C'de 10dakika. olacak şekilde ayarlandı ve 425 bç'lik bant varlığı pozitif olarak kabul edildi.

Oliveira ve ark. (2011) tarafından bildirilen koşullarda *aer* için 25 mikrolitrelik toplam hacimde PCR karışımı hazırlandı. Karışım 1X Taq buffer, 1,5 mM MgCl, 200 µM dNTP, 0.4 µM primer, 1 U Taq polimeraz ve 5 mikrolitre DNA içerecek şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon koşulları 94°C 60sn'lik ilk denaturasyonu takiben 30 siklus için 94°C 60sn, 63°C 30 sn, 70°C 90sn ve son uzama için 70°C'de 5 dk olacak şekilde ayarlandı. Görüntüleme sonucunda 602 bç'lik bant varlığı pozitif olarak kabul edildi.

İzolatlarda *traT* gen varlığının belirlenmesi için Kaipainen ve ark. (2002) tarafından bildirilen şekilde 25 mikrolitrelik PCR karışımı hazırlandı. Karışım 1X Taq buffer 2,5 mM MgCl, 250 µM dNTP, 1 µM primer, 1,25 U Taq polimeraz ve 5 mikrolitre DNA içerecek şekilde hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 25 siklus için 95°C 2dk, 55°C 1 dk., 72°C 1 dk, ve son uzama için 70°C'de 10 dk olacak şekilde ayarlandı. Görüntüleme sonucunda 307 bç'lik bant varlığı pozitif olarak kabul edildi.

3.2.2.4.1.2. Amplikonların Görüntülenmesi

Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %1-3'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi.

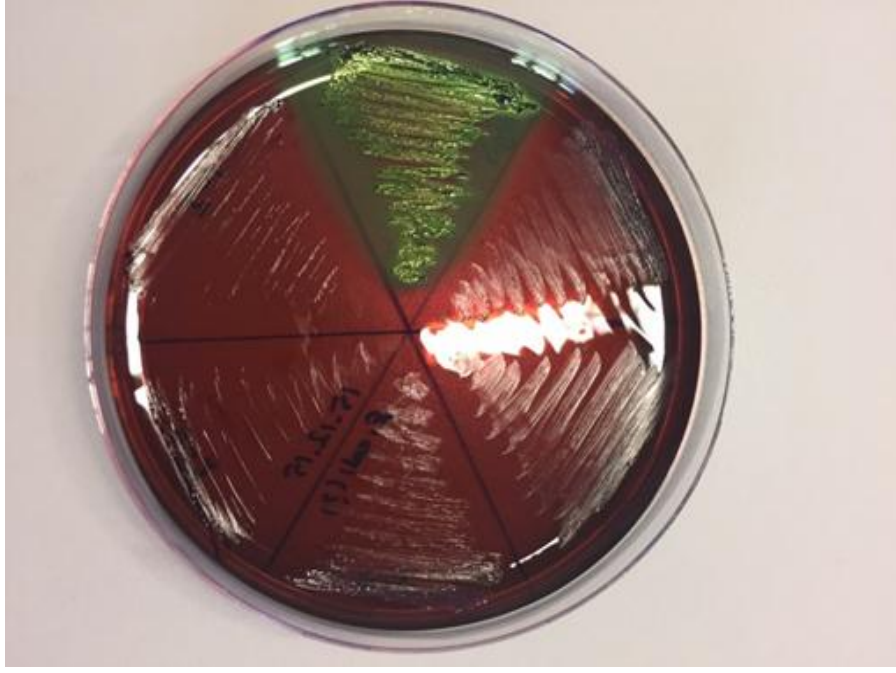
4. BULGULAR

4.1. İzolasyon Bulguları

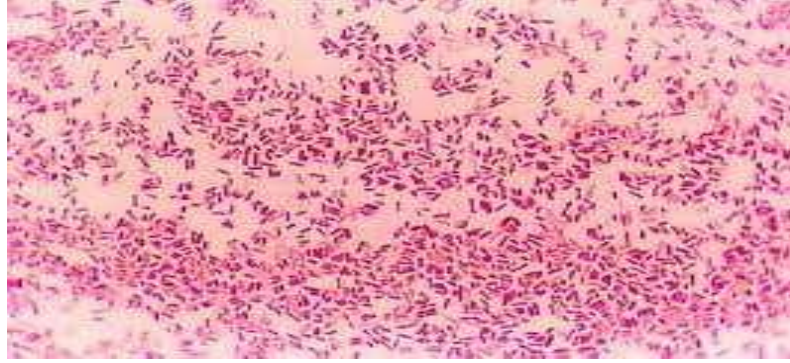
Araştırma için Aydın ve İzmir illeri ve çevresinde bulunan, büyük işletmeleri ve aile işletmesi olarak farklı sığır işletmeleri ziyaret edilerek, birçoğu laktasyon döneminde olan hayvanların memelerinden sütler tekniğine uygun bir şekilde 20 ml'lik steril enjektörlere alınan süt numuneleri Kalifornia Mastitis Testi (CMT) ile incelendi. CMT ile subklinik mastitisli olarak belirlenen 100 adet süt örnekleri incelendi. Sütlerin *E. coli* varlığı yönünden incelenmesi sonucunda fenotipik ve genotipik olarak toplam 12 adet *E. coli* izolatu belirlendi. Bunlardan 1 tanesinde *eaeA* geni, 2 tanesinde *traT* geni tespit edilmiştir fakat izolatların hiçbirinde *aer* genine rastlanamamıştır.



Resim 5. Kanlı agara yapılan ekim sonucu üreyen saflaştırılmış koloniler.



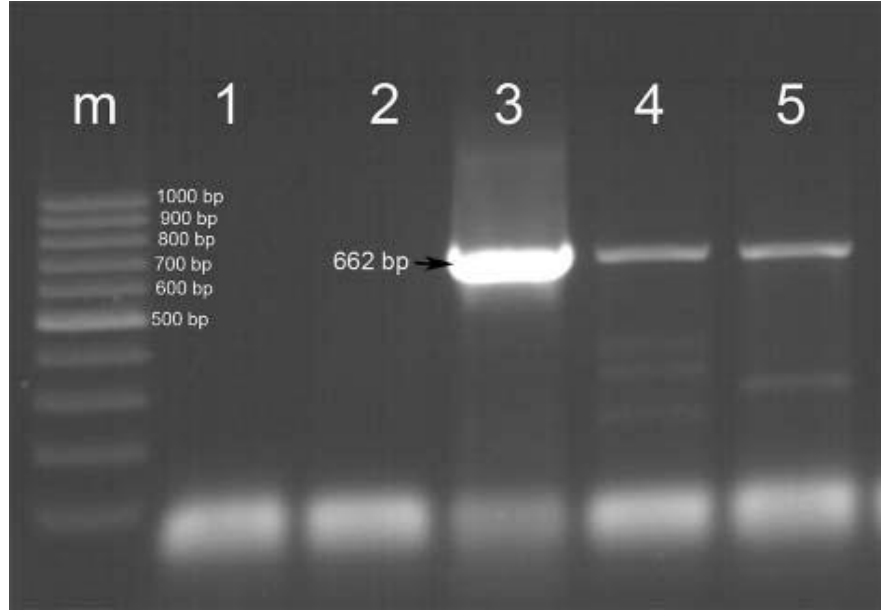
Resim 6. *E. coli*'nin EMB Agarda Üremesi.



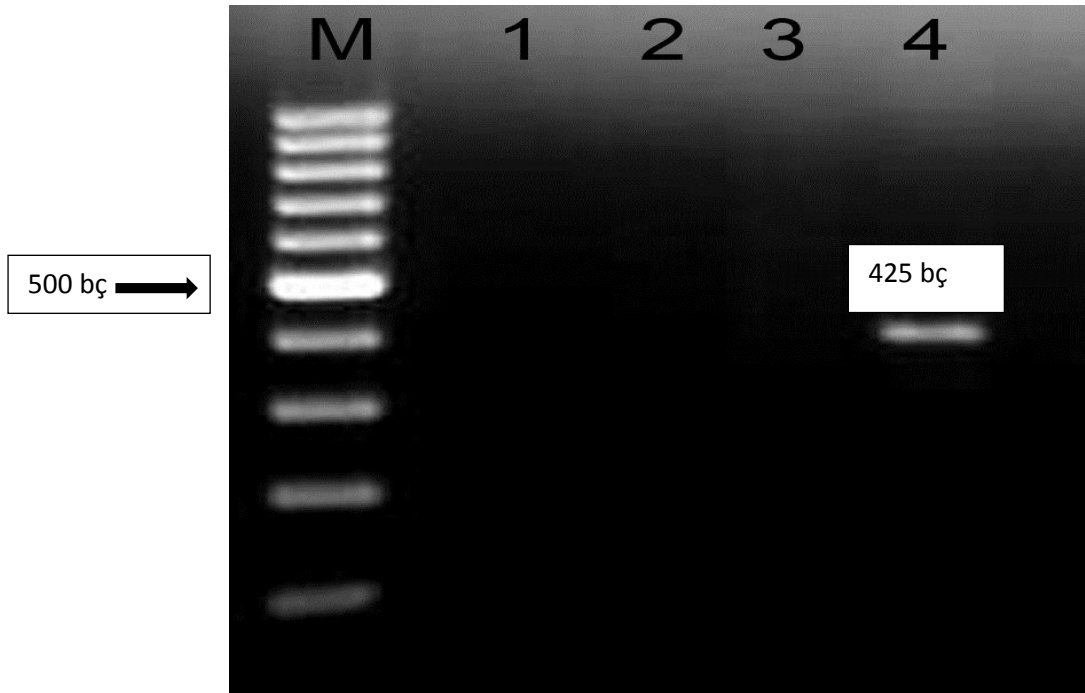
Resim 7. *E. coli*'nin mikroskobik görüntüsü.

4.2. PZR Bulguları

Fenotipik olarak *E.coli* şüpheli izolatların PZR ile analizi sonrasında 12 adet izolatın 662 bç.'lik ürün verdiği görüldü (Resim 7). İncelenen 12 adet izolat da *E. coli* olarak identifiye edildi.

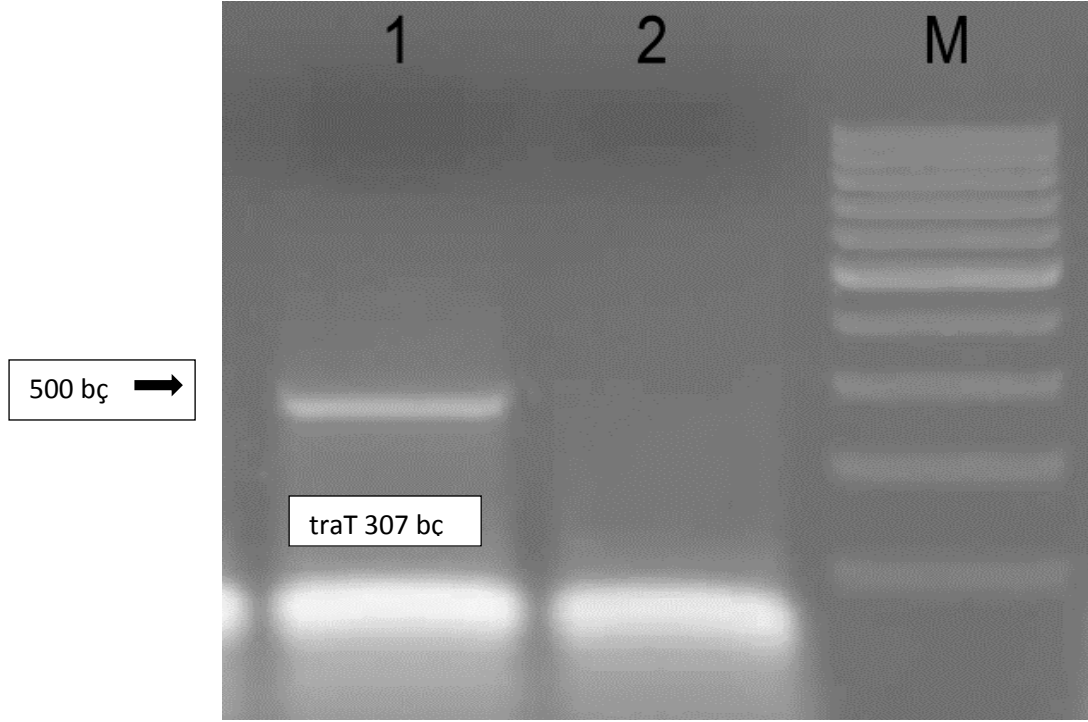


Resim 8. *E. coli* PZR sonuçları. M: marker (100 bç, Fermentas); 1-2: negatif; 3: *E.coli* (662 bç).



Resim 9. *E. coli* izolatlarında *eae* PZR sonuçları. M: marker (100 bç, Fermentas) ; 1-3: negatif; 4: pozitif (425 bç).

PZR ile identifikasyonu yapılan 12 adet *E. coli* izolatında aerobaktin (*aer*), dış membran proteini (*traT*) ve intimin (*eae*) genlerini saptamak için ayrı ayrı PZR uygulandı. İdentifiye edilen 12 adet *E. coli* izolatlarının 1 (%8,3)'inde *eae* geni mevcut iken (Resim 9), 2 (%16,6)'sinde de *traT* geni (Resim 10) bulunmuştur. İzolatların hiçbirisinde *aer* genine rastlanmadı.



Resim 10. *E. coli* izolatlarında *traT* PZR sonuçları. M: marker (100 bç, Fermentas); 1-2: pozitif (307 bç)

5.TARTIŞMA

E. coli mastitislerinin önemi ciddi semptomlara yol açması, pahalıya mal olan bir hastalık olması ile birlikte infeksiyon insidensinin artıyor olmasıdır. İnsidensteki bu artışın özellikle Gram pozitif etkenlere karşı yapılan kuru dönem tedavisi ve sağım sonrası yapılan teat-dipping uygulamasından kaynaklandığı ve meme bezlerinde *E. coli* nedenli infeksiyonların muhtemel kaynağının çevresel kontaminasyon (dışkı, altlık vb.) olduğu düşünülmektedir (Correa ve Marin, 2002).

Sığırlarda *E. coli* nedenli klinik mastitislerin görülme oranı ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir. Schukken ve ark (1989) Hollanda'da saptadıkları 1140 klinik mastitis olgusundan %16,2 oranında *E. coli* izole ettiklerini bildirmiştir. Hollanda'nın güneyinde yapılan bir başka çalışmada ise, incelenen mastitis olgularından %16,9'unun *E. coli* nedenli olduğu saptanmıştır (Miltenburg ve ark, 1996). Shipigel ve ark (1998) tarafından İsrail'de yapılan bir çalışmada saptanan 1124 adet klinik mastitis olgusunun %60,2'sinin koliform etkenler tarafından şekillendirildiği belirlenirken, Finlandiya'da *E. coli* nedenli mastitislerin görülme oranının %20'den az olduğu bildirilmiştir (Kaipainen ve ark, 2002).

Bradley (2002) 1998 yılında yaptığı bir çalışma ile İngiltere'de *E. coli* nedenli mastitis oranının %14,4 olarak bulunduğunu bildirmiştir. Bradley ve Green (2001) inceledikleri 6 süt ineği sürüsünde *E. coli* nedenli mastitisleri % 34,7 oranında bulmuşlardır. Correa ve Marin (2002) ise Brezilya'da yaptıkları bir çalışmada 2144 adet klinik ve subklinik mastitisli hayvana ait süt örneğinden 182 adet (%8) *E. coli* izole etmişlerdir. Bradley ve ark (2007) İngiltere'de saptadıkları mastitis olgularından %19,8'ini *E. coli* nedenli mastitis olarak belirlemişlerdir. Unnerstad ve ark (2009) ise İsveç'de inceledikleri mastitis olgularının %15,9'undan *E. coli* izole etmişlerdir.

Nemeth ve ark (1991) tarafından yapılan bir çalışmada sığır mastitislerinden izole ettikleri 95 *E. coli* suşunun %64'ünün, sağım makinesi filtresinden izole ettikleri 47 *E. coli* suşunun %53'ünün, 36 adet fekal orijinli enterotoksijenik *E. coli* suşundan %47'sinin ve 43 adet fekal orijinli verotoksijenik *E. coli* suşundan %47'sinin *traT* geni tarafından oluşturulan serum dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Yine Nemeth ve ark (1994) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise sığır mastitislerinden izole edilen 50 *E. coli* suşunun %76'sının, mastitisli ineklere ait fekal orijinli 50 suşun %84'ünün ve sağlıklı hayvanlara ait 50 adet fekal orijinli *E.*

coli suşunun %66'sının serum dirençli olduğu saptanmıştır. Fang ve Pyörälä (1996), mastitise neden olan 169 *E. coli* suşunun %68'inin sığır serumuna karşı dirençli olduğunu bildirmiştir.

Lipopolisakkarit, K1 kapsüler antijen ile *TraT* ve iss proteinleri gibi dış membran proteinleri ile ilişkili olan serum dirençliliğinin mastitise neden olan *E. Coli* suşları için önemi araştırılmıştır (Taylor, 1983; Nemeth ve ark, 1991). Sanchez- Carlo ve ark (1984) akut mastitisli ineklerden izole ettikleri *E. coli* suşlarının sığır, buzağı, insan ve kobay serumu kullanarak yaptıkları testte suşların tamamının (%100) serum dirençli olduğunu saptamışlardır. Barrow ve Hill (1989) mastitis olgularından izole ettikleri *E. coli* suşlarının %99'unun serum dirençli olduğunu ve dolayısıyla serum dirençliliğinin virulenste önemli rol oynadığını bildirmişlerdir. Serum dirençliliği ile ilişkili olduğu düşünülen *TraT* proteinlerini kodlayan *traT* geninin varlığı çeşitli çalışmalarda incelenmiştir (Montenegro ve ark, 1985; Nemeth ve ark, 1991; Kaipainen ve ark, 2002; Lehtolainen, 2004). Sığır mastitislerinden izole edilen *E. coli*'lerde serum dirençliliği ile *traT* genini araştıran bir çalışmada, incelenen 95 adet mastitis orijinli *E. coli* suşunun %43'ünde, sağım makinesi filtresinden izole edilen 47 *E. coli* suşunun %40'ında, 36 adet fekal orijinli ETEC suşunun %31'inde ve 43 adet VTEC suşunun %44'ünde *traT* geninin belirlendiği ifade edilmiştir (Nemeth ve ark, 1991). Kaipainen ve ark (2002) Finlandiya'dan izole ettikleri mastitis orijinli 160 *E. coli* suşunun %37'sinde, İsrail'den izole ettikleri 113 *E. coli* suşunun ise %41'inde *traT* genini saptamışlardır. Lehtolainen (2004) ise, *traT* genini incelediği mastitis orijinli *E. coli* suşlarının %38'inde belirlemiştir. Bu çalışmada ise incelenen 100 adet süt örneklerinden sadece 12 sinde PZR kullanılarak *E. coli* identifikasyonu gerçekleştirildi ve incelenen suşların 2 sinde (%16,6) *traT* geni saptandı.

Aerobaktin varlığının sığır mastitislerindeki rolü üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Nemeth ve ark (1994) mastitis olgularından izole ettikleri *E. coli* suşlarının %20'sinde aerobaktin varlığını saptamışlardır. Kaipainen ve ark (2002) mastitise neden olan Finlandiya orijinli *E. coli* suşlarının %11,3'ünde, İsrail orijinli *E. coli* suşlarının ise %4,4'ünde aerobaktin kodlayan geni (*aer*) saptamışlardır. Lehtolainen (2004) mastitisli ineklerden izole ettiği *E. coli* suşlarının %8,4'ünü aerobaktin pozitif olarak bulmuştur (Hogan ve Smith, 2003). Bu çalışmada ise incelenen suşların hiçbirinde *aer* geni saptanamadı. Yapılan çalışmalardaki verilerin farklılıklarının nedeni örneklemenin farklı bölgelerden yapılmasıdır.

Güler ve ark (2006) klinik inek mastitislerinden izole edilen *E. coli* suşlarında potansiyel virülens faktörlerini araştırdıkları çalışmasında 100 *E. coli* suşunun sadece 1 (%1) adedinde *eaeA* geni tespit etmişlerdir. Wenz ve ark (2006) 123 mastitis izolatının sadece 1'inde *eaeA* genini saptamıştır. Bean ve ark.'nın (2004) yaptığı bir çalışmada, incelenen 80

süt numunesinin %3,75' unda *eaeA* varlığı tespit edilmiştir. Stella ve ark (2012) yaptıkları çalışmada incelenen 22 süt numunesinin hiçbirinde *eaeA* genine rastlamamışlardır. Bu çalışmada ise incelenen suşların sadece 1 (%8,3)'inde *eaeA* geni saptandı.

Cengiz ve ark (2014) yaptıkları çalışmada 56 *E. coli* suşunda 42 *traT* gene (%75), 8 intimin (*eae*) gen tespit etmelerine rağmen çalıştıkları suşlarda aerobaktin gene rastlamamışlardır. Yapılan bu çalışma Cengiz ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sığır mastitislerinden izole edilen *E. coli* suşlarının çeşitli virulens genlerinin fenotipik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada aşağıda belirtilen sonuçlara varıldı.

Araştırma için Aydın ve İzmir illeri ve çevresinde bulunan, büyük işletmeler ve aile işletmesi olarak farklı sığır işletmeleri ziyaret edilerek, birçoğu laktasyon döneminde olan hayvanların memelerinden alınan süt örneklerinden izolasyon ve identifikasyon sonucunda elde edilen toplam 12 *E. coli* izolatında aerobaktin (*aer*), *traT* ve intimin (*eae*) genlerini saptamak için PZR uygulanmıştır. İdentifiye edilen 12 adet *E. coli* suşunda spesifik primerler kullanılarak uygulanan PZR sonucunda sadece 1 (%8,3)'inde *eae* geni mevcut iken, 2 (%16,6)'inde *traT* geni bulunmuştur, fakat suşların hiçbirinde *aer* genine rastlanmamıştır.

PZR; kısa süre içinde tek bir reaksiyon ile birden fazla hedef tespitini sağlayan hızlı bir yöntemdir. İncelenen çeşitli virulens özelliklerin saptanmasında fenotipik yöntemler ile PZR tekniği uyumluluk göstermesine karşın, bazı özelliklerde PZR tekniği ile saptanan sonuçların fenotipik sonuçlara kıyasla düşük bulunması fenotipik çalışmaların özelliklerin belirlenmesinde gerekli olduğunu, moleküler çalışmaların ise çok sayıda gen ile ilişkili bir özelliğin ayrıntılı olarak incelenmesinde yarar sağladığını ve her iki yöntemin bir arada kullanılmasının daha güvenilir bir sonuç elde etmede önemli olduğunu ortaya koydu.

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.

KAYNAKLAR

- Aguero, M. E, Aron, L, Deluca, A. G, Timmis, K. N, Cabello, F. C.** A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. *Infeccion and Immunity*. 46 1984,740-746.
- Alpay G, Yeşilbağ K,** Mastitis Olgularında Virusların Rolü. *Uludag University Journal of Faculty Veterinary Medicine* 28, 2009.
- Atasever, S. ve Erdem, H.**Süt sığırlarında mastitis ile sütün elektriksel iletkenliği arasındaki ilişkiler, *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2008, 23(2), 131-136.
- Barrow, P. A, Hill, A. W.** The virulence characteristics of strains of *Escherichia coli* isolated from cases of bovine mastitis in England and Wales. *Veterinary Microbiology* 1998, 20, 35–48.
- Bean A, Williamson J, Cursons RT.** Virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from mastitic milk. *Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 2004, 51(6), 285-287.
- Bindereif A. and Neilands J. B.** Aerobactin Genes in Clinical Isolates of *Escherichia coli* Department of Biochemistry, University of California, Berkeley, California 94720 *Journal of Bacteriology*, Feb. 1985, 727-735
- Bisping W, Amtsberg G.** Colour atlas for the diagnosis of bacterial pathogens in animals, *Paul Parey Scientific Publishers*, Berlin and Hamburg. 1988, 160-168.
- Blanco, J. E, Blanco, M, Mora, A, Blanco, J.** Production of toxins(enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicaemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *Journal of Clinical Microbiology* 1997,35, 2953–2957.
- Bradley, A. J, Green, M. J.** Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *Journal of Clinical Microbiology* 2001,39, 1845-1849.
- Bradley, A. J, Leach, K. A, Breen, J, Green, L. E, Green, M. J.** Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record* 2007, 160, 253-257.
- Bradley, A. J.** Bovine mastitis: an evolving disease. *Veterinary Journal* 2002, 164, 116-128.
- Burvenich, C, Van Merris, V, Mehrzad, J, Diez-fraile, A, Duchateau, L.** Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary Research* 2003, 34, 521–564.

Bülbül, H. Sığır ve koyun mastitislerinden izole edilen *Escherichia coli*'lerin çeşitli özelliklerinin araştırılması. Doktora Tezi. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü* 2000.

Cengiz S, Dinçgöz G, Söğüt M. Detection of Several Virulence Properties, Antibiotic Resistance and Phylogenetic Relationship in *E. coli* Isolates Originated From Cow Mastitis, *Acta Veterinaria-Beograd* 2014, 64(4), 413-425.

China, B, Goffaux, F. ; Secretion of virulence factors by *Escherichia coli*. *Veterinary Research* 1999, 30, 181-202.

Clegg, S, Gerlach, G.F. Enterobacterial fimbria. *Journal of Bacteriology* 1987, 169, 934-938.

Correa, M. G. P, Marín, J. M. O-serogroups, *eae* gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Veterinary Microbiology* 2002,85, 125-132.

Dopfer, D, Almeida, R. A, Lam, T. J. G. M, Nederbragt, H, Olver, S. P, Gaastra, W. Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. *Veterinary Microbiology* 2000,74, 331-343.

Drasar BS, Hill MJ The normal colonic bacterial flora, From the Bacterial Metabolism Research Laboratory, *Central Public Health Laboratory, Colindale Hospital, London* 1975.

Erskine, R. J. Coliform mastitis therapy. National Mastitis Council 1995 Regional Meeting, Harrisburg, Pennsylvania; Meeting Proceedings 1995, 72.

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

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. *Journal of Clinical Microbiology* 1985, 46-76.

Ferguson, J. D, Azzaro, G., Gambina, M, Licitra, G. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily from 2000 to 2006. *Journal of Dairy Science* 2007, 90, 5798-5813

Gaastra, W, Graaf, F. K. Host specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiology Reviews* 1982, 46, 129-161.

Goff, J. P, Horst, R. L. Physiology and Management: Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science* 1997, 80, 1260-1268.

Han, M, Lee, A. Y. The *Escherichia coli* proteom: past, present and future prospects. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2006, 362-439.

Harel, J, Fairbrother, J, Forget, C, Desautels, C, Moore, J. Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* isolated from piglets and calves. *Veterinary Microbiology* 1993, 38, 139-155.

- Hogan, J, Smith L. K.** Coliform mastitis. *Veterinary Research* 2003, 34, 507-519.
- İzgür, M.** *Escherichia coli* ve *Escherichia coli* İnfeksiyonları. In: Özel Mikrobiyoloji. 5. Baskı. Ed.: Arda, M, Minbay, A, Leloğlu, N, Aydın, N, Kahraman, M, Akay, Ö, Ilgaz, A, İzgür, M, Diker, K. S. Medisan Yayınevi. Ankara 1999, 45-50.
- İzgür, M.** Koli İnfeksiyonları. In: Kanatlı Hayvan Hastalıkları. 1. Baskı. Ed.: İzgür, M, Akan, M. Medisan Yayınevi. Ankara 2002, 55-60.
- Jain, N. C.** Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. *Journal of Dairy Science* 1979, 62, 128-134.
- Johnson JR.** Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. *Infectious Diseases in Clinics of North America* 2003, 17, 261-278.
- Kaipainen, T, Pohjanvirta, T, Shpigel, N. Y, Shwimmer, A, Pyörala, S, Pelkonen, S.** Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Veterinary Microbiology* 2002, 85, 37-46.
- 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*. *Journal of Infectious Diseases* 1985, 151, 775–782.
- Koneman, W. E, Allen, S. D. Janda, W. M. Schreckenberger, P.C.** Color Atlas and Textbook OF Diagnostic Microbiology 4th. Philadelphia: J.Lippincott Compony, 1992, s 131-133.
- Kuhnert, P, Boerlin, P, Frey, J.** Target genes for virulence assesment of *Escherichia coli* isolates from water, food and environment. *FEMS Microbiology Reviews* 2000, 24, 107-117.
- Kul E, Erdem H, Atasever S.** Süt Sığırlarında Farklı Meme Özelliklerinin Mastitis ve Süt Somatik Hücre Sayısı Üzerine Etkileri. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* 2006, 21(3), 350-356.
- Le bouguenec, C, Bertin, Y.** AFA and F17 adhesions produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Veterinary Research* 1999, 30, 317–342.
- Lehtolainen, T.** *Escherichia coli* mastitis; Bacterial factors and host response. Academic Dissertation. Departmant of clinical Veterinary Sciences Faculty of Veterinary Medicine. Universty of Helsinki 2004.
- Leloğlu, N.** *Streptococcus* ve *Streptococcus* İnfeksiyonları. In; Özel Mikrobiyoloji. 5. Baskı. Ed: Arda, M, Minbay, A, Leloğlu, N, Aydın, N, Kahraman, M., Akay, Ö, Ilgaz, A, İzgür, M., Diker, K. S. Medisan Yayınevi. Ankara. 1999, s 31-39.
- MeirI-Bendek, I, Lıpkın, E, Friedmann, A, Leitner, G, SARAN, A, Friedman, S, Kashi, Y.** A PCR-Based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. *Journal of Dairy Science* 2002, 85, 1717–1723

- Memmedova, N.** Süt sığırlarında mastitisin bazı yapay zeka yöntemleri kullanılarak erken dönemde tespiti, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2012.
- Mikrobiyoloji, cilt 1, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2002, s 1564-1575.
- Miltenburg, J. D, Lange, D, Crauwels, A. P. P, Bongers, J. H, Tielen, M. J. M, Elbers, A. R. W, Schukken, Y. H.** Incidence of clinical mastitis in a random sample of dairy herds in the southern Netherlands. *Veterinary Record* 1996, 139, 204-207.
- Montenegro, M. A, Biter-Suerman, D, Timmis, J. K, Agüero, M. E, Cabello, F. C, Sanyal, S. C, Timmis, K. N.** *traT* gene sequence, serum resistance, and pathogenicity-related factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. *Journal of Genetics and Microbiology* 1985, 131, 1511–1527.
- Nataro JP, Kaper JB.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998, 11, 142-201.
- Nemeth, J, Muckle, C. A, LO, R. Y.** Serum resistance and the *traT* gene in bovine mastitis-causing *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* 1991, 28, 343–351.
- Nemeth, J, Muckle, C.A. and Gyles, C.L.** In vitro comparison of bovine mastitis and faecal *Escherichia coli* isolates. *Veterinary Microbiology* 1994, 40, 231–238.
- Oliveira FA, Paludo KS, Arend LN, Farah SM, Pedrosa FO, Souza EM, Surek M, PichethG, Fadel-Pitcheth CM:** Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Genetics and Molecular Research* 2011, 10, 4114-4125
- Paresh K. Virpari, J. B. Nayak, H. C. Thaker, M. N. Brahmbhat** Isolation of pathogenic *Escherichia coli* form stool samples of diarrhoeal patients with history of raw milk consumption. *Veterinary World* 2013, 2231-0916
- Payne, S. M.** Iron and virulence in the family Enterobacteriaceae. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 1988, 16, 81–111.
- Pyörälä, S, Kaartinen, L, Kock, H, Rainio, V.** Efficacy of two therapy regimens for treatment of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. *Journal of Dairy Science* 1994,77, 453-461.
- Quinn P. J., Markey B. K., Carter M. E., Donnelly W. J., Leonard F.C.** *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. India: Replika Pres Pvt. Ltd. 2002, 106-113.
- Sambrook, J, Russel, W.** *Molecular cloning; a laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Press, New York. 2002.

- Sanchez-Carlo, V, Mcdonald, J. S, Packer, R.A.** Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from cows with acute mastitis. *American Journal of Veterinary Research* 1984, 45, 1775–1777.
- Savaşan S, Kaya O.** Sığır mastitislerinde Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin filtrasyon-boyama yöntemi ile çabuk tanısı, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2004, 51, 29-34.
- Scheutz, F, Strockbine, N. A.** Genus I. *Escherichia Castellani* and Chalmers 1919, 941T . Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2th. Edition, 2005, 607-618.
- Schroeder, J.W.** Mastitis control programs: Bovine mastitis and milking management. *North Dakota State University Extension Service*. 1997, 1129-1130
- Shpigel, N. Y.** Clinical and therapetic aspects of coliform mastitis in dairy cows. *University of Helsinki Faculty of Veterinary Medicine* 1998.
- Soto, E. G, Hultgren, S. J.** Bacterial adhesins: Common themes and variations in architecture and assembly. *Journal of Bacteriology* 1999, 181, 1059-1071.
- Sussman, M.E.** *coli*: Mechanism of Virulence. Ed. Sussman, M. Cambridge Universty Press. 1997.
- Taponen, J, Myllysv.** The Economic Impact of Mastitis. *The Bovine Udder and Mastitis*. Ed: Sandhom, M, Hankanen-Buzalksi, T, Kaartinen, L, Pyörala, S. Gummerus Kirjapaino Oy. Finland, 1995, 261-264.
- Taylor, P.W.** Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against Gram negative bacteria. *Microbiology Reviews* 1983, 47, 46-83.
- Tmanova, L.** Detection of *Mycoplasma bovis*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* by PCR assay Directly from Milk. Phd Thesis 2003.
- Unnerstad, H. E, Lindberg, A, Waller K. P, Ekman, T, Artursson, K, Nilsson-Ost, M, Bengtsson, B.** Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Veterinary Microbiology* 2009, 137, 90-97.
- Vollenhofer S, Burg K, Schmidt J and Kroath H.** Genetically Modified Organisms in Food-Screening and Specific Detection by Polymerase Chain Reaction, Austrian Research Centers Seibersdorf, Biotechnology Unit 1999, 47, 5038-5043
- Walker C.E.** *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, Kankas State University, Kansas. 2008.
- Wasteson Y.** Zoonotic *Escherichia coli* from clinic mastitis, *Acta Veterinaria Scandinavica* 2002, 43, 79-84.

WEB 1. (2015) Center for Disease Control (CDC) web site. <http://www.cdc.gov/ecoli> (08.12.2015).

Anonim Wikipedia https://tr.wikipedia.org/wiki/Polimeraz_zincir_tepkimesi Polimeraz zincir tepkimesi (12.12.2015).

Wellenberg G.J, Van der Poel W.H.M, Van Oirschot J.T. Viral infections and bovine mastitis. J.T. *Veterinary Microbiology* 88, 2002.

Wenz JR, Barrington GM, Garry FB, Ellis RP, Magnuson R.J. *Escherichia coli* isolates serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *Journal of Dairy Science* 2006, 89, 3408-3412.

Wizeman, M, Adamou, J. E, Langerman, S. Adhesins as targets for vaccine development. *Emerging Infectious Diseases* 1999,5, 395-403.

Yavru S. Mastitise sebep olan viral etkenler, Süt İnekçiliğinde Mastitis Sempozyumu, Akdeniz Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Burdur, 2001, 32-41

Zhang, J. P, Normark, S. Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science* 1996, 273, 1234-1236.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Vurucu Nergiz
Uyruk : T.C.Vatandaşı
Doğum yeri ve tarihi : Erzincan 04.09.1987
Telefon : 0(507) 271 02 93
E-mail : akanergiz@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2011

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2013-Halen	Ege Ordu Komutanlığı Gıda Laboratuvarı	Mikrobiyoloji Tahlil Uzmanı

AKADEMİK YAYINLAR

1.MAKALELER

Arzu FINDIK *Nergiz AKAN ** Ertan Emek ONUK *** Duygu ÇAKIROĞLU **** Alper ÇİFTÇİ, Sağlıklı Köpeklerin Burunlarından İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Metisilin Direnç Profili ve Moleküler Tiplendirilmesi, Kafkas Univ Vet Fak Derg 15(6), 2009, 925-930