



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MB-D-2008-0003

**BROİLER PİLİÇLERİNDEN *ESCHERİCHİA COLİ* O157:H7
SEROTİPİNİN İDENTİFİKASYONU VE ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

Sinem Gökçe DURSUN (SEKMEN)

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA**

AYDIN - 2008

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MB-D-2008-0003

**BROİLER PİLİÇLERİNDEN *ESCHERİCHIA COLI* O157:H7
SEROTİPİNİN İDENTİFİKASYONU VE ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

Sinem Gökçe DURSUN (SEKMEN)

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA**

AYDIN - 2008

ÖNSÖZ

E. coli O157: H7 serotipi zoonotik ve gıda kaynaklı patojenlerin en önemlilerinden biridir. Etken insanlarda özellikle çocuk ve yaşlılarda diare, hemorajik kolitis ve hemolitik üremik sendroma neden olur. Hastalık karın ağrısı, sulu ya da kanlı ishal gibi gastrointestinal semptomlar ve daha az sıklıkta da sistemik komplikasyonlarla seyreder. *E. coli* O157: H7 serotipi Türkiye ve dünyada insan sağlığı açısından bu kadar önemli olmasının yanında hayvan sağlığı ve ekonomik verim yönünden de büyük önem taşımaktadır. Klinik ve subklinik olarak gerçekleştirdiği veya katıldığı gastrointestinal enfeksiyonlar belirgin olarak olmasa da verim ve dolayısıyla ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Bu çalışmada, İzmir, Aydın, Manisa, Denizli ve Uşak illerinde bulunan fason üretim kümeslerindeki broiler piliçlerinden 500 adet kloakal svap örneği alınıp, örneklerden *E. coli* O157:H7 serotipinin identifikasyonu gerçekleştirilmiş ve antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Böylece Türkiye’de ilk defa bu bakterinin tavuklardan izolasyonu gerçekleştirilmiş ve halk sağlığı için önemli bir zoonotik etkenin tavuk eti tüketiminde risk faktörü olduğu düşünülerek kanatlı endüstrisinin bu konu üzerine eğilmesi gerektiği ortaya çıkarılmıştır.

Bu çalışma “Broiler Piliçlerinden *Escherichia coli* O157:H7 Serotipinin İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi” isimli ve *VTF-07021* kodlu proje olarak **Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri** tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
1. GİRİŞ	1
2. GEREÇ VE YÖNTEM	26
2.1. Gereç	26
2.1.1. Örnekler.....	26
2.1.2. Besiyerleri	26
2.1.2.1. İzolasyon Besiyerleri.....	26
2.1.2.2. İdentifikasyon Besiyerleri	27
2.1.3. Antiserum Test Kitleri	30
2.1.4. Ayrıçlar	33
2.1.5 Boyalar	33
2.1.6. Antibiyotik Diskleri	34
2.2. Yöntem	34
2.2.1. Örneklerin Alınması ve Kültürü	34
2.2.2. İzole edilen suşların identifikasyonu	35
2.2.2.1. Cefixim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey Agarda Üreme.....	35
2.2.2.2. Fluorocult <i>E. Coli</i> O157:H7 Agarda Üreme.....	35
2.2.2.3. <i>E. coli</i> O157 Lam Aglutinasyon Testi.....	36
2.2.2.4. <i>E. coli</i> O157 Lateks Aglutinasyon Testi.....	37
2.2.2.5. H7 Antiserum Tüp Aglutinasyon Testi.....	38
2.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testi	38
3. BULGULAR	40
4. TARTIŞMA	44

5. SONUÇ	50
ÖZET	52
SUMMARY	53
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	73
TEŞEKKÜR	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 3.1.	Broiler piliçlerinden alınan kloakal svaplardan izole ve identifiye edilen mikroorganizmalar	40
Çizelge 3.2.	İllere göre elde edilen <i>E. coli</i> O157:H7 serotipi miktarları ve yüzdeleri	41
Çizelge 3.3.	Kullanılan antibiyotiklerin etkilerine göre inhibisyon zon sınırları.....	42
Çizelge 3.4.	Antibiyotik duyarlılıklarının <i>E. coli</i> O157:H7 izolatlarına göre dağılımı	43

1. GİRİŞ

E. coli O157:H7 serotipi zoonotik ve gıda kaynaklı patojenlerin en önemlilerinden biridir. Etken özellikle insan sağlığı açısından Türkiye ve dünyada, hastalığa neden olduğunun belirlendiği 1983 yılından beri büyük önem taşımaktadır (Riley ve ark 1983). *E. coli* O157:H7 insanlarda hemolitik üremik sendrom (HUS) ve hemorajik kolitis olarak bilinen ve ölümlle sonuçlanabilen gıda ve su kaynaklı salgınlara neden olmaktadır. HUS insanlarda karın ağrısı, sulu ya da kanlı ishal gibi gastrointestinal semptomlar ve daha az sıklıkta da sistemik komplikasyonlarla seyreder (Nataro ve Kaper 1998, Paton ve Paton 1998).

Etkenin Türkiye ve dünyada insan sağlığı açısından bu kadar önemli olmasının yanında, hayvan sağlığı ve ekonomik verim yönünden de büyük önem taşıdığı görülmektedir. Klinik ve subklinik olarak gerçekleştirdiği veya katıldığı gastrointestinal infeksiyonlar belirgin olarak olmasa da verim ve dolayısıyla ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

E. coli O157:H7 serotipi genel olarak Kuzey Amerika kıtası ülkelerinde daha sıklıkla görülmekle beraber, bugün 6 kıtada en az 16 ülkede giderek artan sayıda vakaya rastlandığı, genel olarak mayıs - ekim aylarında vaka sayısında artış olduğu, hastalığın 5 yaş ve daha altındaki çocuklar ile 65 ve daha yukarı yaşlılarda daha fazla görüldüğü bildirilmektedir. Enfektif dozunun 0,3-15 hücre/g gibi çok düşük düzeyde olması

salgınların yayılmasında kişiden kişiye bulaşmaların temel etken olduğunu göstermektedir (Doyle ve ark 1997, Park ve ark 1999).

E. coli O157:H7 asıl konak sığırlar olmak üzere koyun, geyik, köpek ve kuşlarda hastalığa neden olmaktadır. *E. coli* O157:H7 serotipinin kaynağı üzerinde farklı görüşler bulunmaktadır. Çeşitli araştırma sonuçları bu bakterinin başta süt inekleri olmak üzere sıcak kanlı hayvanlar olarak tanımlanan memeli ve kanatlı hayvanların dışkıları ile ete, süte, toprağa, suya ve dolayısı ile tüm çevreye yayıldığını göstermiştir (Halkman ve ark 1998). *E. coli* O157:H7'nin prevalansı; coğrafi bölge, mevsim, hayvanın türü, yaşı ve cinsiyeti, beslenme şekli gibi birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Sığırlar, koyunlara ve mısır silajıyla beslenen hayvanlar beslenmeyenlere göre daha yüksek bir kontaminasyon göstermektedir. Yaz aylarında prevalansı daha yüksek çıkmaktadır. Süt inekleri, besiye alınan boğalardan ve genç hayvanlar, yaşlı hayvanlardan daha yüksek taşıyıcılık göstermektedir. Ayrıca kesim yapılan mezbahanın hijyenik şartları ve çalışma koşulları, kesim sonrası etin işlenmesi ve son tüketim safhasına kadar olan tüm aşamalarda hijyen kurallarına titizlikle uyulmaması tüm tabloyu olumsuz etkilemektedir (Chapman ve ark 2001).

Kanatlı hayvanlarda doğal infeksiyona yol açtığı nadir vakalar bulunmaktadır. Özellikle Türkiye'de etkenin kanatlı hayvanlardan izolasyonuna dair bir çalışma olmaması bu hayvanlarda infeksiyona yol açmadığının kanıtı değildir. Dünya çapında yapılan araştırmaların bazılarında kanatlı etlerinden ve dışkı örneklerinden *E. coli* O157:H7 izole ve identifiye edildiği belirtilmiştir (Samadpour ve ark 1994, Schoeni ve Doyle 1994, Sowers ve ark 1996, Sueyoshi ve Nakazawa 1994).

Escherichia coli serotipleri kanatlı hayvanlarda enteritis, selülit, septisemi, perikarditis, perihepatitis, artrit, omfalitis, salpingitis ve yumurta sarısı infeksiyonu gibi hastalıklara neden olur. Kanatlı patojenik *E. coli* suşları genellikle solunum sistemi infeksiyonlarına yol açarlar ve hastalık özellikle genç broilerlerde şekillenir. Kanatlı patojenik *E. coli* (APEC) suşları çoğunlukla O serogruplarına dahildir. Tavuklardan en çok izole edilen suşlar O1, O2, O35 ve O78' dir (Dho ve Fairbrother 1999, Gross 1994, Sojka ve Carnaghan 1961). *E. coli* O157:H7 serotipinin tavuklarda doğal infeksiyona yol

açtığına dair çok az veri olmasına karşın, inokulasyon yoluyla oluşturulan infeksiyonların varlığı bildirilmiştir (Beery ve ark 1985, Best ve ark 2003, Gülhan 2003, Stavric ve ark 1993).

Sığırlarda görülen bovine spongiform ensefalopati gibi bazı hastalıklardan dolayı son yıllarda dünya çapında ve ülkemizde tavuk etine yönelim artmıştır. Kanatlı sektörünün hızlı gelişimi insan ve hayvan sağlığı yönünden son ürün hijyeninin ne kadar önemli olduğunu bir kere daha göz önüne koymuştur. Bu yüzden hastalıktan arı hayvanlar yetiştirmek ve bunları hijyenik olarak tüketime sunmak zorunlu kılınmıştır.

Dünyada ve Türkiye’ de kanatlı endüstrisinde çok büyük verim kayıplarına neden olan *E. coli* etkeni gıda kaynaklı infeksiyon ve toksikasyonlarda da çok fazla karşımıza çıkmaktadır. *E. coli* infeksiyonları, hem etlik piliç üretimini hem de insan sağlığını tehdit etmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Özellikle *E. coli* O157:H7 serotipinin neden olduğu infeksiyon ve toksikasyonlardan korunmak amacıyla, Türkiye’ deki etlik piliç popülasyonunun bu etkenin varlığı yönünden incelenmesinin kanatlı sektörü ve halk sağlığı açısından yapılacak koruma kontrol programları ve aşı çalışmaları için önemli olduğu düşünülmektedir. Bakteriyel etkenlerin en önemlilerinden biri olan *E. coli* O157:H7 suşu genellikle ruminant etlerinden ve ürünlerinden izole edilmesine rağmen tavuklarda da bulunduğu dair kanıtlar sunulmuştur (Beery ve ark 1985, Best ve ark 2003).

E. coli, insan, memeli ve kuşların gastrointestinal sistemlerindeki bakteriyel mikrofloranın en önemli üyelerinden biridir. *E. coli* türlerinin çoğu patojen değildir, ancak küçük bir kısmı dünya çapında görülen hastalıklara neden olurlar. Patojen *E. coli* türleri virülens faktörleri, biyokimyasal ve serolojik özelliklerine göre klasifiye edilmişlerdir (Fairbrother ve Nadeau 2006).

İlk olarak Theodor Escherich (1889) tarafından 1885 yılında yeni doğan bebeklerin dışkılarından izole edilen bakteri *Bacterium coli commune*, daha sonra *Escherichia coli* olarak tanımlanmıştır. Günümüzde 16 S ribozomal RNA ünitesindeki benzerliğe göre yapılan *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*’nin 2. baskısındaki sınıflandırmaya

göre *E. coli*, *Proteobacteria* bölümünde, *Gammaproteobacteria* sınıfında, *Enterobacteriales* takımında, *Enterobacteriaceae* familyasında *Escherichia* cins adı altında yer almaktadır (Garrity ve ark 2005).

Escherichia cins adı altında yer alan ve biyokimyasal testlerle *E. coli*' den ayrılan diğer türler *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* ve *E. vulgaris* 'tir (Arda ve ark 1992).

E. coli türleri memeli ve kuşlarda solunum, sindirim ve ürogenital sistem hastalıkları, yara infeksiyonları, pneumoni, mastitis ve sistemik infeksiyonlara neden olurlar. Bütün yeni doğanlarda gastrointestinal sistem hastalığı kolibasillozise neden olan etken sığır ve koyunlarda koliseptisemisi ve koliform mastitise; kedi ve köpeklerde koliseptisemisi, pyometra ve üriner sistem infeksiyonlarına; atlarda kolibasillozis ve pyometraya; domuzlarda koliseptisemisi, kolibasillozis, ödem, meningitis ve mastitislere; kanatlılarda omphalitis, sarı kesesi yangısı, koliseptisemisi, hava kesesi yangısı, selülitis, enteritis, salpingitis, epikarditis ve koligranulomaya neden olur (Arda ve ark 1992).

Fakültatif anaerobik bir bakteri olan *E. coli* insan kolon mikroflorasının dominant bir üyesidir. Doğumdan hemen sonra *E. coli* gastrointestinal sistemde koloniler oluşturur ve daha sonra bakteri ile konak bundan ortak çıkar sağlar. *E. coli* genellikle intestinal lümen tarafından sınırlandırıldığından zararsız olarak kalır, ancak halsizlik ve vücudun zayıf düşmesi ve gastrointestinal bariyerlerin yıkılması halinde patojenik olmayan *E. coli* kolonileri bile enfeksiyona neden olmaktadır. Patojenik *E. coli* neden olduğu enfeksiyonlar mukozal yüzeyler ile sınırlanabilir veya vücuda yayılabilir. İnsanlarda patojenik *E. coli* türleri üriner sistem infeksiyonları, sepsis, meningitis, diare ve enteritise neden olmaktadır (Nataro ve Kaper 1998). *E. coli* O157:H7 serotipi ise hemolitik üremik sendrom ve hemorajik kolitis gibi ölümcül hastalıklara sebep olur (Halkman ve ark 2001, Nataro ve Kaper 1998, Paton ve Paton 1998).

E. coli türleri Gram negatif özellikte, 1.1-1.5 x 2.0-6.0 µm boyutlarında, çomak şekilli ve fakültatif anaerobik bakterilerdir. Peritrik flagellaya sahip olduklarından hareketlidirler ancak hareketsiz türleri de bulunmaktadır. Kanlı agar, nutrient agar ve *Enterobacteriaceae* türleri için diferensiyel ve selektif olan besiyerlerinde (MacConkey,

EMB vs.) 37 °C 'de 24 saat içinde gözle görülebilir S tipi koloniler oluştururlar. Nutrient buyyonda 37 °C 'de 24 saatte bulanıklık yaparak ürerler. *E. coli* birçok karbonhidratı (laktoz, mannitol, glukoz) asit ve gaz oluşturarak fermente eder. Laktozu ayrıştırdığı için MacConkey agarda pembe renkli koloniler, EMB agarda ise yeşil metalik refle görünümünde koloniler şekillendirirler. Bazı suşları kanlı agarda hemoliz oluşturabilirler. İndol ve Metil Red (MR) testleri pozitifdir; ancak Üre, Voges Preskauer (VP), H₂S ve Sitrat testleri negatif sonuç verir. Oksidaz testi negatif sonuç veren *E. coli* nitratları nitritlere indükleyebilir (Arda ve ark 1992).

E. coli antijenleri ilk olarak Kauffmann (1947)'in yaptığı çalışmayla ortaya konmuştur. Bakterinin son derece karmaşık olan antijenik yapısı özellikle patojen suşlarda önem taşımaktadır. Bunlar somatik (O) antijeni, kapsüler (K) antijenleri, flagellar (H) antijenleri ve fimbrial (Pilus) antijenleridir.

Somatik O antijenleri *E. coli* hücre duvarı yapısında bulunan lipopolisakkarit komplekslerden oluşmuş, ısıya dayanıklı yüzey antijenleridir. Hücrenin lizisi sonucunda ortaya çıkarlar ve ısıya dirençliliği sağlayan bir protein fraksiyonu bağlanmış polisakkarit-fosfolipit kompleksi yapısındadırlar (Paton ve Paton 1998). Somatik O antijeni aglutinasyon testi ile açığa çıkarılabilir, ancak kapsüler ve flagellar antijene sahip suşlarda ısı uygulamasından (50 °C 'de 24 saat veya 200°C 'de 2 saat) sonra aglutinasyon uygulanmalıdır. Bazı O antijenleri diğer mikroorganizmaların antijenleriyle aynı kimyasal ve serolojik yapıda olabilir. Bu durumda iki bakteri arasında çapraz reaksiyon şekillenir. *E. coli* türlerinin bazılarının O antijeni *Shigella sonnei* haricindeki *Shigella* antijenleriyle çapraz reaksiyon vermektedir. Benzer şekilde *Salmonella* türleriyle de çapraz reaksiyon şekillenmektedir. Bunların en önemlisi *E. coli* O111 ve *Salmonella* O35 arasında görülmüştür (Nataro ve Kaper 1998).

Flagellar (H) antijeni flagella yapısında bulunan flagellin proteininin çeşitliliğine bağlı olarak farklılıklar gösterir. Somatik antijenin tersine ısıya dayanıksızdırlar ve aglutinasyonla belirlenebilirler. Çoğu *E. coli* suşu ilk izolasyonda az hareketli ya da hareketsizdir. Buna rağmen birçoğu da yarıkatı agarda pasajlandıklarında hareketli olarak gözlenmişlerdir (Paton ve Paton 1998).

Kapsüler (K) antijenleri % 2 oranında azaltılmış şeker içeren polimerik asit yapıdadırlar. Hücre yüzeyinde O antijeninin dışında yer alırlar ve O antijeninin aglutinasyonuna bu şekilde engel olurlar. Isıya duyarlılıklarına göre A ve B olmak üzere 2 alt sınıfta incelenirler. A tip K antijenleri 121 °C'de 1 saatte aglutine olurken, B tipleri için 100 °C 'de 1 saat yeterlidir. Ancak B tip K antijenlerinin antikora bağlanma yeteneği 121 °C 'de inaktive olur (Nataro ve Kaper 1998).

K antijeninin tiplendirilmesinde nomenklatür açısından bazı hatalar vardır. K12 suşunun K12 antijeni ile hiçbir alakası yoktur. K88 ve K99 gibi fimbrial antijenler ise K antijeni olarak tanımlanmışlardır (Paton ve Paton 1998).

Fimbria (Pilus) antijenleri *E. coli* bakterisinin dış yüzeyindeki uzantı şeklindeki yapının içinde bulunan protein karakterinde antijenlerdir. Fimbriaların seks pilusu dışındaki piluslarında bulunan ve bakterinin barsak epitel hücrelerine adhezyonunu sağlayarak virülens özelliği kazandıran antijenlerdir. Fimbria antijenleri hemaglutinasyon özelliklerine göre 2 grupta incelenirler. Tip-I antijenlerinin hemaglutinasyon yetenekleri mannoz ile inhibe edilebilir (mannoz duyarlı-MS). Bu tip antijenlere F1 adı da verilir. Tip-II antijenleri ise mannoza dirençlidir (MR). Bütün *E. coli* suşlarının (nonpatojenikler dahil) ortak özelliği fimbria geninin bulunmasıdır. Diarejenik *E. coli* suşlarının sahip olduğu fimbrialar bakterinin intestinal kolonizasyon yeteneğini artırır ve normalde lokalize olamayacağı ince barsak mukozasına yerleşmesini sağlar (Nataro ve Kaper 1998).

Diğer birçok mukozal patojende olduğu gibi *E. coli* de enfeksiyon için gerekli şu stratejileri izler : (i) mukozal alanda kolonileşme, (ii) konağın savunmasını yıkma, (iii) çoğalma ve (iv) konağa zarar verme. İshale yol açan *E. coli* suşlarının en belirgin niteliği, barsağın kendi florasıyla besinler için verilen rekabet ve peristaltik hareketlere rağmen intestinal mukozal yüzeyde koloniler oluşturabilmesidir (Nataro ve Kaper 1998).

E. coli türleri intestinal hastalıkları oluşturabilme yeteneklerine göre 6 serolojik sınıfa ayrılmışlardır. Bunlar: Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), Diffuz-Adherent *E. coli* (DAEC) ve Entero-Agregativ *E. coli* (EAEC) 'dir (Nataro ve Kaper 1998).

Koloni oluşumundan sonra ishale yol açan *E. coli* suşlarının patojenik stratejileri birçok farklılık göstermektedir. İshale yol açan *E. coli* için üç genel paradigma tanımlanmaktadır ;

1. Enterotoksin üretimi (ETEC ve EAEC)
2. İnvazyon (EIEC)
3. Membran uyarımıyla özel bağlanma (EPEC ve EHEC)

Bununla beraber, mikroorganizmanın intestinal mukoza ile etkileşimi her kategori için özel olarak tanımlanmaktadır (Nataro ve Kaper 1998).

E. coli genomunun çok yönlülüğü başlıca iki genetik biçimde açıklanır: Virülens ilişkili plasmidler ve kromozomal patojenite adaları. Günümüzde tanımlanmış olan altı *E. coli* tipinin hepsi en az bir plasmid üzerinde bir virülens özelliği taşımaktadırlar. EIEC, EHEC, EAEC ve EPEC suşlarının her biri multiple virülens faktörleri içeren plasmid aileleridir. McDaniel ve Kaper' in (1997) yaptığı çalışma EPEC ve EHEC' in kromozomal virülens genlerinin patojenite adası şeklinde organize kümeleri kapsadığını göstermiştir.

ETEC, düşük ateşli ya da ateşsiz sulu ishal ile karakterize edilen ishal halinin nedensel ajanlarından biridir. ETEC enfeksiyonları genellikle gelişmemiş ülkelerde görülmesine karşın, ara sıra da olsa, taze peynirlerin, çiğ sebzelerin ve az pişmiş yemeklerin tüketildiği bölgelerde su kaynaklı salgınlarla gözlenmektedir. ETEC'in patojenitesi herhangi bir enterotoksinin üretimi ile oluşabilir. ETEC "kolera toksinine" (CT) boyut (86 kDa), diziliş ve fonksiyonel olarak çok benzer "ısıya dayanıksız enterotoksin" (LT) üretebilmektedir. ETEC aynı zamanda kaynama sıcaklığına 30 dakika dayanabilen, çok küçük moleküler yapıda (4 kDa), "ısıya dayanıklı toksin" (ST)

üretebilmektedir. ST nin bir çok çeşiti vardır; *E. coli* de bulunan ST1a ya da STp insan ve hayvanlarda çok nadir görülse de, ST1b ve STh sadece insanda görülmektedir. ETEC'in etkisiz dozu erişkinlerde 10^8 hücre olarak tahmin edilse de bu doz yaşlı, çocuk ve hastalarda daha düşük kabul edilmelidir. ETEC'in yüksek enfeksiyon dozuna sahip olmasından dolayı genellikle yiyecek maddelerinde yüksek miktarlarda *E. coli* bulunmadan analizi yapılmaktadır. Eğer ETEC tespit edilmişse, etkilenmiş yiyeceğin potansiyel tehlikesinin belli olması için numerik olarak ifade edilmelidir. Üremiş olan LT miktarı serolojik olarak ticari pasif lateks agglutinasyon testi ve ELISA testi ile mümkündür (Nataro ve Kaper 1998). Üremiş olan ST miktarı ise yine ELISA ve infant fare testi ile belirlenebilir (Thompson ve ark 1984). ST ve LT genlerinin her ikisi de dizilim olarak ve gen araştırma testleri ile belirlenebilmektedir (Tsen ve ark 1996, Weagant ve ark 2000). Gen prob/koloni hibridizasyonu kullanılarak ekilmiş kolonilerin analizi yiyecek maddelerindeki ETEC miktarına sayısal bir yaklaşım getirmektedir.

EIEC *Shigella* 'yı yakından andırır ve insanlarda dizanteri formunda ishale yol açar (Dupont ve ark 1971). *Shigella*'da olduğu gibi EIEC'nin hayvanlarda görüldüğüne dair bir kayıt bulunmamaktadır ve bundan dolayı EIEC için birincil kaynak enfekte insan vücududur. *Shigella*'da 10 ile birkaç yüz hücrenin hastalığa yol açmasına rağmen, gönüllü hastalarda yapılan çalışmalar en azından 10^6 organizmanın sağlıklı bir yetişkini hasta edebildiğini göstermiştir. Tipik bir *E. coli*'den farklı olarak EIEC non-motildir, lizini dekarboksile etmez ve laktozu fermente etmez, yani anaerobiktirler. EIEC'nin patojenitesi kolonik dokuyu istila etme ve yok etme yeteneğine doğrudan bağlıdır. HeLa veya Hep-2 doku kültür hücreleri, PZR veya invaziv gen problemleri kullanılarak yüksek moleküler ağırlıklı plasmid ile kodlanmış invazyon fenotipi bulunabilmektedir (Dupont ve ark 1971, Mehlman ve ark 1982).

Gelişmekte olan ülkelerde çocuk ishallerinin ana nedenlerinden biri olan EPEC aşırı sulu daireye neden olmaktadır. EPEC salgınları kontamine su ve et ürünlerinin tüketimi ile şekillenir. Gönüllü sağlıklı yetişkinlerle yapılan çalışmalarda EPEC bakterisinin enfeksiyon oluşturabilecek miktarı 10^6 olarak belirlenmiştir. EPEC suşunun patogenezi bağlanma-yıkılma lezyonlarına neden olan intimin proteinini (*eae* geni ile kodlanan protein) kapsamaktadır (Hicks ve ark 1998). Aynı zamanda EPEC, bakterinin

intestinal hücelere lokalize olmasını sağlayan ve EPEC yapışma faktörü (EAF) diye de anılan plasmid kodlayan proteini içermektedir (Tobe ve ark 1999). EAF üretimi Hep-2 hücre testi ve *eae* geni varlığı ise PZR analiz testiyle belirlenebilir (Nataro ve Kaper 1998).

Diffuz-Adherent *E. coli* (DAEC) terimi ile HEp-2 hücelerine yapışan ancak EPEC benzeri mikrokoloniler oluşturmayan *E. coli* suşları belirtilmiştir. EAEC virotipinin bulunmasıyla DAEC diarejenik *E. coli* türlerinin bağımsız bir üyesi olarak tanımlanmıştır. Cravioto ve arkadaşlarının (1979) yaptıkları HEp-2 yapışma testiyle EAEC ve DAEC ayrımı gerçekleştirilmiştir. DAEC serotipleri özellikle yeni doğanlarda ve 5 yaşına kadar çocuklarda diareye neden olmaktadır (Lewine ve ark 1992), ancak hastalığın patogenezi hakkında yeterince bilgi yoktur. Bilge ve arkadaşları yaptıkları iki çalışma (1989, 1993) ile suşun klonlanma ve yüzeysel fimbria karakterizasyonu hakkında edindikleri bilgiye göre F1845 adı verilen kromozomal veya plasmid kökenli bir genin patojeniteden sorumlu olduğunu bulmuşlardır.

EHEC, ölümcül hemolitik üremik sendromuna (HUS) kadar ilerleyebilecek hemorajik kolitis (HC) ya da kanlı ishalin primer nedeni olarak bilinmektedir. EHEC' in farklı bir patojenik *E. coli* sınıfı olarak klasifiye edilmesi iki epidemiyolojik gözleme dayanmaktadır. Bunlardan birincisi olan Riley ve arkadaşlarının (1983) çalışmasında şiddetli abdominal ağrı, sulu diareyi takip eden aşırı kanlı diare ve hafif ateşle karakterize edilen iki farklı gastrointestinal hastalık belirlenmiştir. Bu hastalık az pişmiş hamburgerlerin tüketilmesi ile bağlantılı olan hemorajik kolitis olarak tanımlanmıştır. Hastalardan alınan dışkı örneklerinden hazırlanan kültürlerde daha önceleri nadiren izole edilen *E. coli* O157:H7 suşu elde edilmiştir. İkinci gözlem yine aynı yılda Karmali ve arkadaşları (1983) tarafından yapılmış ve sporadik hemolitik üremik sendromu (HUS) vakalarının fekal sitotoksinler ile sitotoksin sentezleyen *E. coli* suşlarıyla ilişkili olduğu tanımlanmıştır. Akut renal yetmezlik, trombositopeni ve mikroanjiyopatik hemolitik anemi sendromlarıyla karakterize olan HUS tipik kanlı ishalle seyreden bir hastalık olan HC 'den ayırt edilemez. Her ne kadar iki klinik mikrobiyolojik gözlemden birisi az miktarda *E. coli* serotipine ve diğeri spesifik sitotoksin üretimine bağlı gözükse de makalelerin yazılmasına yeterli olmuş ve intestinal ve renal hastalıklara neden olan enterik patojenlerin gittikçe daha önemli olan bir sınıfını ortaya çıkarmıştır.

E. coli O157:H7 serotipinin patojenitesi esas olarak sentezlediği toksinlerden kaynaklanır. Bu toksin *Shigella dysenteriae* tip 1 tarafından oluşturulan toksine % 99 oranında benzediği için başlarda shiga benzeri toksin (SLT) olarak adlandırılırken, günümüzde kullanılan terminolojide shiga toksin (Stx) olarak anılmaktadır. Toksinin iki tipi vardır ve bunlar Stx1 ve Stx2 adlarıyla anılırlar. Stx1 ve Stx2 arasında % 55-60 oranında homoloji vardır. Her iki toksin de HeLa ve Vero doku kültürü hücrelerinde sitotoksik etki göstermektedirler ve bu yüzden verotoksin 1 ve 2 olarak isimlendirilmişlerdir (Kim ve ark 2005).

EHEC suşları verotoksin veya shigatoksin (Stx) üretmesine göre tiplendirilir. Stx1 ve Stx2' nin insan hastalıklarında çok sık görülmemelerine rağmen Stx2' nin çok fazla sayıda varyantı vardır. Stx sentezleyen *E. coli*' nin (STEC) birçok serotipi olmasına karşın HC ile klinik olarak bağlantılı olanları EHEC olarak belirtilmiştir. Bunlardan *E. coli* O157:H7 bütün dünyada genellikle hastalığa neden olan prototipik EHEC suşudur (CDC 1993, Garrity ve ark 2005, Karmali 1989). Diğer EHEC serotipleri için belirli bir sayı olmamasına karşın *E. coli* O157:H7 için infeksiyöz doz 10-100 hücre olarak tahmin edilmektedir. Ayrıca *E. coli* O157:H7 serotipinin oldukça dayanıklı olduğu, dışkıda 50 gün, toprakta 130 gün canlı kaldığı ve bu süre içinde infektivitesini koruduğu rapor edilmektedir (Parma ve ark 2000). *E. coli* O157:H7 infeksiyonları genellikle yiyecek-su kaynaklı olup çiğ et ürünleri (CDC 1993, Garrity ve ark 2005), çiğ süt (Riley ve ark 1983), su (Swerdlow ve ark 1992), pastörize edilmemiş elma suyu (CDC 1996) ve sebzelerden kaynaklanır (Como-Sebetti ve ark 1997, Itoh ve ark 1998). Bu nedenle bu patojeni yiyeceklerde belirlemek için bu özellikler kullanılır. Stx1 ve Stx2' nin sentezi piyasada kolaylıkla bulunabilen ELISA, RPLA kitleri, Vero veya HeLa doku kültürü hücreleri gibi sitotoksik testlerle belirlenebilir. Ayrıca Stx1 ve Stx2 için geliştirilmiş gen problemleri, PZR analiz testi ve diğer büyük EHEC belirleyicileri vardır (Feng ve Monday 2000, Hill ve ark 1993) .

E. coli O157:H7 serotipinin hastalık oluşturmada etkili olan birçok virülens faktörü vardır. Bunların başında bağlanma-yıkımlama (attaching-effacing, A/E)

mekanizması, virülens plasmidleri, patojenite adaları, sitotoksinler ve virülens genleri gelmektedir (Paton ve Paton 1998).

Enterik patojenlerde yapılan kromozomal incelemelerde ayrı DNA segmentlerinin fonksiyonel virülens özellikleri kodladığı bulunmuş ve bunlara patojenite adaları (PAI) adı verilmiştir. Daha ilginç olarak bu genler çoğunlukla başka mikroorganizmalardan kazanılmış olarak ortaya çıkmaktadır. PAI bakteriye kompleks bir virülens özellik kazandırmakta ve genetik transfer ile rekombinasyonları önlemektedir. PAI genellikle hemolizin ve fimbria gibi hücre yüzeyi proteinlerinden sorumlu genler içerir. *E. coli* O157:H7 'de 35 kb olan enterosit yıkım lokusu (LEE) olan bir PAI bulunmuştur. LEE 'nin ortaya konulması ile *E. coli* O157:H7 'nin evrim teorileri yeni bir yön kazanmış, bu evrime en azından belirli patojen *E. coli* klonlarının farklı aşamalarda dahil olduğu şeklinde teoriler geliştirilmiştir. Kommensal bakteri kromozomuna LEE 'nin yerleşmesi EPEC benzeri bir klon oluşması için temel bir aşamadır. *E. coli* O157:H7' nin EPEC benzeri bir atadan önce LEE 'yi elde etmesi, sonra transdüksiyon ile SLT 2 'yi alması, sonra hemolizini kodlayan EHEC plasmidini kazanması, daha sonra SLT 1 'i kazanması ve en son olarak sorbitol fermantasyonu ve β -glukuronidaz aktivitesini yitirmesi ile evrimini tamamladığı kabul edilmektedir (Kim ve ark 2005, Park ve ark 1999).

E. coli O157:H7 suşları insan ve hayvanlarda çeşitli infeksiyonlara neden olma kapasiteleri, intestinal epitel hücrelerine bağlanma yetenekleri ve barsakta kolonize olabilme yetenekleri gibi virülens faktörlerine göre incelenirler. O157:H7 serotipinin infeksiyöz dozu 1-100 CFU' dur ve bu değer enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) ve enteropatojenik *E. coli* (EPEC) suşlarına oranla çok düşüktür (Griffin ve ark 1994). Bu kadar düşük dozlarda infeksiyon oluşturabilmeleri mide asiditesine karşı dirençli olmalarından kaynaklanmaktadır. *E. coli* O157:H7 serotipi düşük pH' lı ortamda asit tolerans yanıtı geliştirir ve hafif asidik yiyeceklerde bu şekilde hayatta kalma şansını arttırır (Park ve ark 1999).

Midedeki zor şartlara rağmen O157:H7 serotipi intestinal hücrelere bağlanarak barsakta kolonize olabilir. Etkenin barsakta kolonize olma yeteneği farklı hücre kültürleri kullanılarak test edilmiştir. *E. coli* O157:H7 serotipinin intestinal hücrelere bağlanmasında

farklı mekanizmalar vardır. Sherman ve arkadaşları (1987) 5 adet O157:H7 serotipinin HEp-2 (insan larinks epiteliyomu) ve Henle 407 (insan kolon karsinomu) hücrelerinin her ikisinde de farklı bağlanma özellikleri gösterdiklerini belirlemişlerdir. Bazı serotipler epitel hücrelerinin yüzeyinde düzgün bir dağılım göstererek bağlanırlar (diffuz aderens-DA). Diğerleri ise sıkışık kümeler ya da mikrokoloniler halinde epitelyal yüzeyde sınırlı yerleşim şekillendirirler (lokalize aderens-LA). Serotiplerden biri ise her iki hücre kültürüne de bağlanamamıştır.

McKee ve O'Brien (1995) O157:H7 serotipinin HCT-8 (insan ileosekal hücreleri) hücrelerine farklı bir tarzda bağlandığını belirlemişler ve buna "kütük yığını" adını vermişlerdir. Kütük yığını tarzında bakteriyel bağlanma daha çok hücreler arası kavşak bölgelerinde yığılma şeklinde olmaktadır ve bu durumun bazolateral yüzeyle etkileşim sonucunda gerçekleşme olasılığı vardır.

E. coli O157:H7 serotipinin sahip olduğu 60 mDa plasmidinin (pO157) barsak epiteline bağlanmayla olan ilişkisi ilk olarak Karch ve arkadaşları (1987) tarafından açıklanmıştır. Bu araştırmacılar pO157' nin varlığının fimbria ile Henle 407 hücrelerine bağlanmayla ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan çalışmalarda bulunan uyumsuz sonuçlar üreme ve analiz koşullarındaki farklılıklara bağlı olsa da asıl ortaya çıkan durum *E. coli* O157:H7 serotiplerinin arasında bile bu büyük plasmidin heterojen yapıda olduğunun belirlenmesidir (Barrett ve ark 1992, Dorn ve Angrick 1991). pO157' nin patogenezdeki etkisi hayvan modellerindeki çalışmalarla ortaya çıkmıştır. Tzipori ve arkadaşları (Tzipori ve ark 1987) plasmidin varlığının yada yokluğunun gnotobiyotik domuzlarda O157:H7 suşlarının kolona kolonizasyonunda veya A/E lezyonlarının oluşumunda bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Wadolkowski ve arkadaşlarının (1990) yaptığı çalışmada *E. coli* O157:H7 933 serotipinin ve onun plasmid uygulanmış tipi olan 933cu' nun bireysel olarak streptomisin tedavisi gören farelerde barsağa kolonize olabildiklerini, ancak ikisi birden kullanıldığında 933cu' nun kolonize olamadığını tespit etmişlerdir. Bu araştırma sonuçlarına rağmen *E. coli* O157:H7 suşlarında pO157' nin kolon epitel hücrelerinde kolonizasyona olan etkisini doğru olarak açıklamak için daha pek çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

E. coli O157:H7' nin barsak enterositlerinde bağlanma-yıkımlama (A/E) lezyonlarına neden olduğu bildirilmiştir (Francis ve ark 1986, Sherman ve ark 1988). A/E lezyonları bakterinin hücre yüzeyine bağlanmasını ve enterositlerle mikrovilluslarda yıkım ve kaybı anlatmaktadır. Bakterinin bağlanmasının sonucunda oluşan sitoskeletal yığılmalar sağlam kaidelere dönüşür ve bu kaideler elektron mikroskopta gözlenmiştir (Knutton ve ark 1989). A/E lezyonlarının şekillenmesini sağlayan genlerin tümü LEE patojenite adasında lokalize olmuştur. LEE ayrıca Tip III sekresyon sistemini kodlayan bir gen salkımı (*sepA*' dan *sepI*' ya kadar) içerir. Bu mekanizma LEE tarafından kodlanan EspA, EspB ve EspD gibi diğer proteinlerin salınmasından sorumludur. LEE patojenite adasında bunların dışında intimin denilen enterosite bağlanmada görevli dış membran proteinini (OMP) kodlayan *eaeA* geni de bulunur (Donnenberg 1997, Sherman ve ark 1988). Kenny ve arkadaşları (1997) intimin reseptörünün de (Tir) LEE tarafından kodlandığını bulmuşlardır . İntiminden farklı 8 kDa' luk başka bir OMP tipinin daha bağlanmayla ilişkili olduğu bulunmuştur (Dytoc ve ark 1993).

Sueyoshi ve Nakazawa (1994) sığır, insan, domuz ve tavuk dışkılarından elde edilen 6 farklı A/E *E. coli* serotipini 1 günlük civcivlere mide içi yolla inokule edilmiştir. Sekal içerik üzerinde yapılan inceleme sonucunda 7 civcivin 2 tanesinde (%28.6) ATCC 43889 (O157:H7) bulunmuştur. Bu suşun etkilediği civcivlerde yapılan patolojik muayenede bulunan multifokal enterosit dejenerasyonu ve nekroz ise A/E tipi enfeksiyonun varlığını belgelemektedir. Best ve arkadaşlarının (2004) yaptığı çalışmanın aksine bu araştırmada tavuk enterositleri memeli enterositleri ile aynı tarzda davranarak *E. coli* O157:H7 'nin bağlanmasına ve "kütük yığını" oluşumunun şekillenmesine izin vermektedirler. Bu durum A/E *E. coli* serotiplerinin tetiklediği A/E lezyonlarından sorumlu olan hücresel mekanizmaların sıcak kanlı omurgalılar arasında ortak olarak korunduğunu göstermektedir.

Civcivlerden A/E *E. coli* serotiplerinden O15:H10' un çok yüksek oranlarda (%75) izole edilmesine rağmen sekal lezyon oluşturmada çok yetersiz olduğu görülmüştür. Bunun nedeni O15:H10' un O157:H7 kadar patojen olmamasıdır (Sueyoshi ve Nakazawa 1994).

Beutin ve arkadaşları (1989) yaptıkları çalışmada test ettikleri *E. coli* O157:H7 suşlarının % 89' unda alfa hemolizinden farklı bir enterohemolizin tipi bulmuşlardır. Bu enterohemolizini (EHEC-Hly) üreten suşlar bir gecelik inkubasyon sonrasında standart kanlı agarda hemoliz oluşturmazken, yıkanmış koyun eritrositli agarda küçük, bulanık hemoliz alanları şekillendirmişlerdir. Kromozomal olarak kodlanan alfa hemolizinden farklı olarak EHEC-Hly' nin O157:H7 suşu EDL933' e ait 60 mDa' luk virülens plasmidi olan pO157 tarafından kodlandığı bulunmuştur (Schmidt ve ark 1994). EHEC-Hly' nin etkenin patogenezindeki etkisi tam olarak açıklanamamakla beraber enterohemolizin aktivitesi sonucu açığa çıkan hemoglobinin bakterinin barsakta üremesinde kullanıldığı düşünülmektedir (Law ve Kelly 1995). Alfa hemolizin ve EHEC-Hly' nin ikisi de koyun ve insan eritrositleriyle sığır lenfoma hücrelerini lize ederlerken, alfa hemolizinin aksine EHEC-Hly insan lenfositlerinde hemoliz yapamamaktadır (Bauer ve Welch 1996).

E. coli O157:H7 'nin izolasyon ve identifikasyonu için başlıca iki yol izlenebilir. Bunlardan birincisi rutin laboratuvar koşullarında gerçekleştirilebilen, ucuz olmasına karşın biraz zaman ve emek harcanmasını gerektiren klasik yoldur (Boer 2000). *E. coli* O157:H7 'nin belirlenmesi için kullanılan klasik yöntemlerin büyük çoğunluğu selektif zenginleştirme ve katı besiyerine ekim aşamalarını içeren var/yok testleri şeklindedir. Bu testler ile analiz edilen belirli bir miktar örnekte bu bakterinin varlığı ya da yokluğu araştırılır. Buna göre materyalde *E. coli* O157:H7 'nin varlığının gösterilmesi sırasıyla selektif bir sıvı besiyerinde zenginleştirme, selektif ve ayırt edici bir katı besiyerine ekim, şüpheli kolonilerin biyokimyasal ve/veya lateks agglutinasyon testleri ile *E. coli* O157 olarak belirlenmesi ve en son olarak izolatanın H7 antijeni içerip içermediğinin belirlenmesidir (Cutter 2000, Özbaş ve Aytac 1995, Tunail 2000).

E. coli O157:H7 'nin izolasyonunda kullanılan kültürel yöntemlerin dışında daha az zaman alan ve daha duyarlı olan immunolojik belirleme yöntemleri kullanılabilir. Bunlar ELISA, koloni immunoblot analizi, direkt immunofloresan filtre tekniği, immunomagnetik seperasyon ve çeşitli immun yakalama teknikleridir (Boer 2000). Bu analiz yöntemlerinde O ve H antijenleri için spesifik olan poliklonal ve monoklonal antikorların her ikisinde kullanılabilir. Ayrıca serolojik analiz metotlarından immunoassay, radyo immunoassay (RIA), enzim immunoassay (EIA) ve immun peroksidaz testleri

kullanılmaktadır. Bu kadar duyarlı olmalarına karşı, bazı olgularda da yine çapraz reaksiyonlar ve şüpheli durumlar ortaya çıkmakta ve tanı gecikmektedir (E. Merck 1998, Boer 1999, Feng ve ark 1991). Son zamanlarda toksin oluşturan çeşitli *E. coli* suşlarının belirlenmesinde multipleks PZR tekniği kullanılmaktadır. Bu yöntem ile bifteklerde *E. coli* O157:H7 ve toksinlerinin araştırıldığı bir çalışmada PZR 'ı inhibe eden gıda parçacıkları 2 aşamalı basit bir filtrasyon ile giderilmiştir (Venkateswaran ve ark 1997). Benzer şekilde yürütülen bir araştırmada da multipleks PZR tekniği kullanılarak başarılı sonuçlar alınmıştır (Paton ve Paton 1999).

E. coli O157:H7 izolasyonunda numune alımından sonra yapılacak ilk işlem selektif bir sıvı besiyerinde zenginleştirmedir. Bu amaçla kullanılacak sıvı besiyerlerine *E. coli* besiyeri (EC) (Bettelheim ve ark 2002, Hornitzky ve ark 2005), modifiye *E. coli* besiyeri (Noveir ve Halkman 2000, Pao ve ark 2005) (mEC), triptik soya besiyeri (Fach ve ark 2003, Fischer ve ark 2001, Trochimchuk ve ark 2003) (TSB), modifiye triptik soya besiyeri (Johnson ve ark 1998, Kleanthous ve ark 1988) (mTSB) ve lauril sülfat besiyeri (Noveir ve Halkman 2000) (LST) örnek olarak verilebilir. mTSB ve mEC besiyerleri *E. coli* O157:H7 dışındaki türlerin üremesini inhibe etmek amacıyla novobiosin içermektedir (Okrend ve ark 1990a).

Zenginleştirme sıvı besiyerlerinin kullanımında genel olarak 1:9 oranında besiyeri ile homojenize edilen örnek 37 °C 'da 24 saat inkübasyona bırakılmakta, bu sürenin sonunda selektif bir katı besiyerine ekilmektedir (Doyle 1991, Park ve ark 1999). Ancak mTSB besiyerinde 43 °C 'de ve 100 d/d çalkalama hızı ile yapılan inkübasyon ile direkt ekimden 10 misli daha fazla duyarlıkta ve en iyi geri alma sağlandığı belirtilmektedir (Szabo ve ark 1986). Buna karşı bir başka araştırmada 42 °C 'de çalkalama yapılmadan inkübasyonun refakatçı florayı önemli ölçüde baskılayacağı gösterilmiştir (Blais ve ark 1997). Tavuk etinden alınan numunelerin %1.5' inden *E. coli* O157:H7 izole edildiği bir çalışmada ise modifiye TSB besiyerine ekim yapılmış ve 37 °C 'de 18-24 saat inkübasyon uygulanmıştır (Doyle ve Schoeni 1987). Gıda ve su örneklerinden *E. coli* izolasyonunda kullanılan 44-45.5°C' de inkübasyon yöntemi *E. coli* O157:H7 için bu sıcaklıkta üreyemediğinden kullanılamamaktadır (Raghuuber ve Matches 1990).

Noveir ve Halkman' ın gerçekleştirdiği çalışmada (2000), modifiye triptik soya besiyeri, lauril sülfat besiyeri, modifiye EC besiyeri, sorbitol MacConkey agar ve Fluorocult *E. coli* O157 agar besiyerleri *E. coli* O157:H7 serotipinin 3 şahit suşunun, çiğ et ürünlerinin tipik refakatçi florası olan *E. coli* tip 1 ve *Citrobacter freundii* 'nin ikişer suşuna karşı geri alınmasında denenmiştir. İki aşamalı denemeler modifiye EC besiyeri ve lauril sülfat besiyerinin modifiye triptik soya besiyerine ve sorbitol MacConkey agarın Fluorocult *E. coli* O157 agara göre daha iyi sonuç verdiğini göstermiştir. Selektif besiyerlerinde gelişebilen refakatçi flora sayısı *E. coli* O157 serotipi sayısından 100 misli fazla ise *E. coli* O157:H7' nin geri alınması zorlaşmaktadır. Bir diğer deyiş ile, selektif besiyerlerinde gelişebilen refakatçi flora içinde *E. coli* O157:H7 oranı en düşük olarak %1 olmalıdır. Bu oran, selektif besiyerleri ve/veya geleneksel izolasyon yöntemlerinde verilen minimum geri alınabilme sayısından muhtemelen daha önemlidir.

E. coli O157:H7 'nin belirlenmesinde doğrudan selektif önzenginleştirme yerine önce selektif olmayan bir ortamda canlandırma işlemi yapılması ile hasar görmüş hücrelerin daha iyi bir şekilde belirlenebileceği ve buna bağlı olarak klasik yöntemlerin duyarlılığının 10 misli artırılabilceğinin gösterildiği araştırmalar da bulunmaktadır (Blackburn ve ark 2000, Hara-Kudo ve ark 2000).

E. coli O157:H7 serotipinin izolasyonunda günümüzde sorbitol MacConkey (SMAC) (Bielaszewska ve ark 1998, Fujisawa ve ark 2000, Khan ve ark 2002, Kobayashi ve ark 2002, Nielsen ve Scheutz 2002) agar, hemorajik kolitis (HC) (Szabo ve ark 1986) agar, enterohemorajik *E. coli* (EHEC) (Itoh ve ark 1998) agar, CHROMagar O157 (Onoue ve ark 1999), modifiye edilmiş EMB (mEMB) (Clavero ve ark 1995, Conner ve Hall 1994) agar ve Fluorocult *E. coli* O157 (Sarımehmetoğlu ve ark 1998) agar gibi pek çok farklı selektif katı besiyeri kullanılmaktadır.

Selektif katı besiyeri olarak bugün en yaygın kullanılan SMAC agar ve bu besiyerinin çeşitli modifikasyonlarıdır. Bu besiyerinin standart MacConkey agardan farkı bileşiminde laktoz yerine sorbitol bulunmasıdır. *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol negatif olduğu için bu besiyerinde renksiz koloniler oluşturmakta, buna karşın sorbitolü kullanan bakterilerin oluşturduğu asitlik bir pH indikatörü yardımı ile kolonilerin kırmızı

görülmesine neden olmakta, böylece *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol pozitif bakterilerden ayırt edilmektedir (Halkman ve ark 2001).

SMAC agar besiyeri sorbitol reaksiyonlarına dayalı olarak yeterli düzeyde bir ayırt edici özellik sağlamakla beraber, oldukça zayıf bir selektiviteye sahiptir ve dolayısı ile hedef bakteri yanında akraba pek çok bakterinin de gelişmesine izin vermektedir. Bu nedenle SMAC agar besiyeri çeşitli selektif katkıları ile desteklenmekte ve böylece besiyerine refakatçi floranın daha yüksek düzeyde baskılanmasını sağlayacak selektivite kazandırılmaya çalışılmaktadır. Bu katkıları arasında antiserum (Kleanthous ve ark 1988), 5-bromo-4-chloro-3-indoxyle- β -D-glucuronic acid cyclohexyl ammonium salt (Hitchins ve ark 1998, Okrend ve ark 1990b) (BCIG), sefiksim ve tellürit (Akkuş 1996, Bennett ve ark 1995, Boer 1999, Chapman ve ark 2000, Heuwelink ve ark 1997, Olsvic ve ark 1991), ramnoz ve sefiksim (Chapman ve ark 1991) ve MUG (Abdul-Raouf ve ark 1993) çeşitli araştırmalarda denenmiştir. Bunlar arasında yeni bir sefalosporin olan sefiksim sorbitol negatif olan *Proteus spp.* 'nin inhibisyonu için önemlidir. Tellürit ile desteklendiğinde *E. coli* O157:H7 dışında kalan ve başta yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı olmak üzere diğer yöntemler ile baskılanamayan diğer *E. coli* 'leri de önemli ölçüde etkilemektedir (Park ve ark 1999, Weagant ve ark 1995). Sefiksim ve tellürit ilaveli sorbitol MacConkey (CT-SMAC) agar *E. coli* O157:H7 üremesine izin verip diğer *E. coli* suşlarının üremesini kısmen veya tamamen engeller (Kobayashi ve ark 2002, Zadık ve ark 1993). Sorbitolü fermente edemeyen diğer suşların aksine *E. coli* O157:H7 ramnozu da fermente edemez. Bu bilginin ışığında hazırlanan sefiksim-ramnoz ilaveli sorbitol MacConkey (CR-SMAC) agar kullanıldığında oluşan renksiz kolonilerin oranı artar ve bunlar kesinlikle O157:H7 serotipine aittirler (Chapman ve ark 1991).

E. coli O157:H7 serotipi ile diğer *E. coli* serotipleri arasında sorbitol fermentasyonunun negatif olması dışındaki ikinci önemli fark *E. coli* O157:H7 'nin β -glukuronidaz (β -GUR) enzimine sahip olmamasıdır. *E. coli* O157:H7 serotipi β -GUR negatif olduğundan diğer serotiplerin hidrolize edebildiği 4-metilyumbelliferone glukuronid (MUG) ile reaksiyon verip 366 nm uzun dalgalı UV ışığı altında floresans oluşturamaz (Scott ve ark 2003, Thompson ve ark 1990). Bu fark temel alınarak Fluorocult *E. coli* O157 agar ve Fluorocult HC agar gibi bazı katı besiyerleri geliştirilmiştir (E. Merck

1998). MUG reaksiyonu için ticari olarak geliştirilen bir başka besiyeri de Rainbow Agar O157' dir. Rainbow agar hem β -glukuronidaz hem de β -galaktozidaz için spesifik olan kromojenik substratlar içerir. Rainbow agarda üreyen koloniler siyahtan griye, kırmızıya, mavi ve yeşile kadar değişen renkler oluştururlar. Bu sayede *E. coli* O157:H7, *E. coli* O26:H11, diğer Stx-pozitif *E. coli* serotipleri ve Stx-negatif *E. coli* serotiplerinin ayrımı yapılabilir (Szabo ve ark 1986).

MUG reaksiyonu için geliştirilen bir başka metot da MUG medyumunun kullanılmasıdır (Feng ve Hartman 1982, Trepeta ve Edberg 1984). MUG medyumunu SMAC agar yada Mueller Hinton agara püskürtülür ve kültür yapıldıktan sonra UV ışığı altında inceleme yapılır. Bu yöntemin kullanılması zamandan kazanmak için oldukça elverişlidir.

Sorbitol negatif ve MUG reaksiyonu vermeyen kolonilerin O157 olup olmadığının belirlenmesi için lateks aglutinasyon testleri yapılmaktadır (Le Saux ve ark 1993, March ve Ratnam 1989, Smith ve Scotland 1993). *E. coli* O157 suşlarının serolojik esaslarla belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan lateks aglutinasyon kiti iki adet lateks solüsyonu içermektedir. Bunlardan test solüsyonu, *E. coli* O157 antijenine özel tavşan antikorları ile kaplanmış lateks partiküllerinden oluşmakta iken, kontrol solüsyonu ise pre-immun halde tavşan globulinleri içermektedir. O157 lateks belirteçleri ile elde edilen pozitif sonuçta 1-2 dk içinde lateks partikülleri ve bakterinin oluşturduğu aglutinasyon kümeleri görülür (Sowers ve ark 1996).

Sowers ve arkadaşlarının (1996) yaptığı çalışmada iki markaya ait O157 lateks aglutinasyon testleri denenmiş ve her ikisinin de %100 duyarlılık ve %100 spesifite ile çalıştıkları görülmüştür. Ancak daha önce yapılan bazı çalışmalarda (Bettelheim ve ark 1993, Lior ve Borczyk 1987, Perry ve Bundle 1990) da O157 ile serolojik ve kimyasal olarak bağlantılı antijenlerin çapraz reaksiyon verebileceğinin belirtildiği gibi her iki lateks testi de çalışma grubunda bulunan bir *Citrobacter freundii* suşu ve *Salmonella* O group N (O30) serotipinin dört suşuyla da çapraz reaksiyon vermiştir. Yine başka bir araştırmada (Rice ve ark 1992) *Escherichia hermannii* 'nin bazı suşlarının *E. coli* O157:H7 ile çapraz reaksiyon oluşturduğu rapor edilmesine rağmen bahsedilen çalışmada reaksiyon şekillenmemiştir.

E. coli O157 antibadileri kullanılarak yapılan lateks testlerde *Citrobacter freundii* (Bettelheim ve ark 1993), *E. hermannii* ve *Yersinia enterocolitica* O:9 (30) suşunun çapraz reaksiyon verdikleri belirtilmiştir.

O157 lateks aglutinasyon testi ile *E. coli* O157 serotipine ait olduğu belirlenen kolonilerin *E. coli* O157:H7 olup olmadıklarını belirlemek için ise H7 antiserum medyumuyla tüp aglutinasyon testi yapılmaktadır. Bu test *E. coli* O157:H7 'nin sahip olduğu H7 flagellar antijeninin D-sorbitolü 24 saat inkubasyon sonunda fermente edebilme yeteneğine dayanılarak geliştirilmiştir. İçerdiği H7 antiserumu antijeni immobilize ederek ortamdaki D-sorbitolün fermentasyonuna engel olur. Ancak diğer serotipleri H7 ' den farklı bir flagella antijenine sahip oldukları için sorbitolü fermente edebilirler (Faith ve ark 1996). Test sonucunda fermentasyon pozitif tüplerde şeffaf olan renk koyu pembe-kırmızı arası bir hale gelir ve sıklıkla gaz baloncuklarının olduğu gözlenir. H7 antijenine sahip kolonilerin ekildiği tüplerde ise bir değişiklik gözlenmez.

H7 antijenini belirlenmesi için antiserum medyumuyla tüp aglutinasyon testinin yanı sıra son yıllarda O157 lateks aglutinasyon testine benzer bir test olan H7 lateks testi geliştirilmiştir (Abdul-Raouf ve ark 1993, Pao ve ark 2005). Ancak bu testle alınabilecek yanlış sonuçların önüne geçebilmek için şüpheli kolonilerin önce O157 antijenine sahip oldukları lateks aglutinasyon testiyle belirlenmeli daha sonra H7 lateks testi uygulanmalıdır (Sowers ve ark 1996).

E. coli O157:H7 izolasyonunda klasik yöntemlerin kullanılmasında karşılaşılan en büyük sorun refakatçi floradır. *E. coli* 'lerin çoğu sorbitolü fermente edebilir iken %6 kadar *E. coli* sorbitol negatiftir. Bu atipik suşlar da gıdalarda bulunabilmektedir. Hitchins ve arkadaşları (1998) SMAC agarda üreme sırasında koliformlarla yüksek oranda kontaminasyonun *E. coli* O157:H7 üremesini maskeleyerek izolasyonda güçlükler neden olduklarını rapor etmişlerdir. Bu yarışmalı mikroflora elemanlarının başında *E. coli* tip 1 gelmektedir (Noveir ve Halkman 2000). Bu nedenle her sorbitol negatif *E. coli* suşu O157:H7 serotipi olarak değerlendirilmemeli, basit olarak MUG testi ile izolatın *E. coli* tip 1 olup olmadığı kontrol edilmelidir. *E. coli* O157:H7 serotipi *E. coli* tip 1 'den β -glukuronidaz enzimi içermemesi ile ayrılır (Halkman ve ark 1998, Hitchins ve ark 1998).

Ayrıca standart EC besiyerinden farklı olarak *E. coli* tip 1 üremesini baskılamak amacıyla novobiosin ilave edilip safra tuzları oranı azaltılarak hazırlanmış olan mEC besiyeri de bu etkenin fazla olduğu durumlarda *E. coli* O157:H7 izolasyonunda kullanılabilir.

E. hermannii biyokimyasal ve serolojik olarak *E. coli* O157 serotipine çok benzemektedir ve sorbitol içeren medyumlarda aynı sonucu vermektedir. Ancak sellobiyoz fermentasyonu (*E. coli* negatif, *E. hermannii* pozitif) ve potasyum siyanid varlığında büyüme (*E. coli* gelişmez, *E. hermannii* gelişebilir) testleri kullanılarak ayrımları yapılabilir. Ayrıca *E. hermannii*'nin stx pozitif suşu bulunmamaktadır (Hitchins ve ark 1998). Fekal örneklerde bulunabileceği gibi daha çok çiğ süt ve dana eti gibi gıdalardan izole edilen *E. hermannii* sorbitol negatif olup *E. coli* O157 antiserumu ile aglutine olabilmekte ve böylece *E. coli* O157 ile karıştırılabilmektedir. Buna göre özellikle gıdalarda bulunan *E. hermannii*'nin izolasyonu için kullanılan SMAC besiyerlerinin yanı sıra sellobiyoz-MacConkey agar bazı araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır. Böylece *E. hermannii* sellobiyoz fermentasyonu ile *E. coli* O157'den ayırt edilebilmektedir (March ve Ratnam 1986).

Yine refakatçi bir bakteri olan *Hafnia alvei* de sorbitol negatif bir bakteri olduğundan sorbitol içeren medyumlarda *E. coli* O157:H7 ile benzer görüntüde ürer (Willshaw ve ark 1993). *H. alvei*'nin *E. coli* O157:H7 belirlenmesindeki maskeleyen şeklindeki olumsuzluğu yanında sıvı besiyerinde doğrudan bu bakterinin gelişmesini engellemek ve dolayısı ile belirlenmesini tümenden olanaksız kılmak gibi olumsuzlukları da vardır. Yapılan bir araştırmada brain-heart infüzyon besiyerinde *H. alvei*'nin *E. coli* O157:H7'nin gelişmesini kayda değer ölçüde engellediği gösterilmiştir (Duffy ve ark 1999).

Son 20 yılda *E. coli* O157:H7 popülasyonunda antibiyotiklere karşı dirençte artış görülmüştür (Galland ve ark 2001, Kim ve ark 1994, Schroeder ve ark 2002). Etkenin hangi canlılarda hangi antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Wilkerson ve arkadaşları 1997-2000 yılları arasında ABD'de insan ve sığırlardan elde edilen *E. coli* O157:H7 izolatları üzerinde 12 çeşit antibiyotiğe karşı direnç gelişimini belirlemek amaçlı bir çalışma yapmışlardır (Wilkerson ve ark 2002). Çalışma

sonucunda sığır izolatlarının % 98 'inin, insan izolatlarının ise % 52' sinin tetrasikline dirençli oldukları belirlenmiştir. Streptomisin dirençliliği ise sığır izolatlarında % 66 ve insan izolatlarında % 45 ile ikinci sıradadır. Üçüncü sırada sığırda % 9 ve insanda % 27 ile ampisilin gelmektedir. Sığır izolatlarının % 68 'i ve insan izolatlarının ise % 52' si birden fazla antibiyotiğe özellikle de tetrasiklin ve ampisiline karşı dirençlidir.

Bu sonuçlara benzer olarak Kim ve arkadaşları (1994) 1989-1991 yılları arasında elde edilen izolatların % 7.4' ünün streptomisin, sulfioksazol ve tetrasikline dirençli olduklarını belirlemişlerdir. Schroeder ve arkadaşları (2002) da benzer sonuçlar alarak 1985-2002 yılları arasında insanlardan izole edilen *E. coli* O157:H7 izolatlarının % 5 'inin ampisiline, sığır izolatlarının ise % 11' nin tetrasikline dirençli olduklarını bulmuşlardır. Buna karşın Galland ve arkadaşları (2001) sığırlardan elde edilen *E. coli* O157:H7 izolatlarının % 38.5 'inin tetrasikline ve % 7.7 'sinin de ampisiline direnç gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Saha vakalarından veya sağlıklı tavuklardan *E. coli* O157:H7 izolasyonu nadiren gerçekleşse de bu serotipin inokule edildiği tavukların sekumunda kolonize olduğu ve dışkıyla saçılımının gerçekleştiğini rapor eden çalışmalar bildirilmiştir (Beery ve ark 1985, Best ve ark 2003, Gülhan 2003, Stavric ve ark 1993).

Beery ve arkadaşlarının (1985) yaptıkları çalışmada ise 72 adet 1 günlük civciv oral yolla nalidiksik aside dirençli *E. coli* O157:H7 bakterileriyle enfekte edilmiştir. Araştırmanın amacı bakterinin tavuk sekumuna kolonize olabilme ve enfeksiyon şekillendirebilme yeteneğinin varlığının kanıtlanmasıdır. İnokulasyondan sonraki 90. güne kadar civcivler incelenmiştir. 10-14. günlerde tüm civcivlerin sekum ve dalaklarının etkilenmeye başladığı görülmüştür. Sekumun özellikle proksimal kısmında olmak üzere 7. günden 28. güne kadar bağlanma-yıkılma (A/E lezyonları) ve penetrasyon şekillenirken gaz birikmesi, ödem ve müköz membranda hasarla beraber sekal tonsillerde büyüme görülmüş, dalakta da 21-28. günlerde büyüme belirlenmiştir. *E. coli* O157:H7' nin tavuk sekumunun özellikle proksimal kısmında kolonize olabilmesi bu dokunun bağlanmanın gelişebilmesi için spesifik reseptörlere sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan bakteriyel sayımlarda kolonda sürekli olarak *E. coli* O157:H7 serotipinin

varlığının belirlenmesine rağmen histolojik muayenede kolon dokusuna bağlanma belirlenememiştir. Bu sonuçlar göstermiştir ki; *E. coli* O157:H7 kolonda kolonize olamamakta ancak sekumda üreyen bakteri lumen içeriğiyle beraber bu bölgeye ulaşmaktadır. Sekumun proksimal kısmındaki yüzey epitelinde meydana gelen yıkımlanma ise bakterinin sentezlediği shiga toksinden kaynaklanmaktadır. Epitelde oluşan değişiklikler epitel hücre sitoplazmalarında vakuolizasyon sonucu ölüm ve lizis ile karakterizedir.

Stavric ve arkadaşları (1993) yaptıkları çalışmanın amacı broiler ve yumurtacı piliçlerinin *E. coli* O157:H7 932 suşunun kolonizasyonuna karşı hassasiyetlerini belirlemek ve kolonizasyonun büyüklüğünün inokulasyon dozu ile inokulasyon yapıldığı zamandaki civcivin yaşıyla olan ilişkisini ortaya çıkarmaktır. 1 günlük yaştaki broiler ve yumurtacı civcivlerine 10^5 , 10^7 ve 10^9 cfu (koloni şekillendirme birimi) *E. coli* O157:H7 inokulasyonu yapılmış ve inokulasyondan 3 yada 8 gün sonra civcivler öldürülerek histolojik olarak incelenmişlerdir. Çalışma sonucunda broiler civcivlerinin yumurtacılara oranla *E. coli* O157:H7 'e karşı daha duyarlı oldukları ve civcivin yaşı arttıkça hassasiyetin azaldığını belirlemişlerdir. Civcivlerin sekumlarının gaz oluşumu nedeniyle şiştikleri ve A/E lezyonlarının şekillendiği belirlenmiştir.

Schoeni ve Doyle' un (1994) sonuçlandırdıkları çalışmada 1 günlük beyaz Leghorn cinsi yumurtacı tavuklar 2.6×10^1 ila 2.6×10^5 adet *E. coli* O157:H7 ile oral yolla enfekte edilmişlerdir. Tüm civcivlerde sekal kolonizasyon ve dışkı ile etkenin atılımı gerçekleşmiştir. 2.6×10^1 adet *E. coli* O157:H7 ile enfekte edilen iki civcivden inokulasyonun 3 ay sonrasında alınan her 1 gram sekal dokuda 10^3 ile 10^4 bakteri bulunmuştur. 10^8 *E. coli* O157:H7 inokule edilen civcivlerde ise 10 ila 11. aylara kadar persiste enfeksiyon şekillendiği görülmüştür. Bakterinin sekum epiteline yapışma ve penetre olma yeteneğinin yüksek olması uzun süreli dışkıyla atılmasını sağlamaktadır. Ayrıca *E. coli* O157:H7' nin sekuma kolonize olma ve dışkıyla saçılma oranının tavuklarda horozlara oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Best ve arkadaşlarının yaptığı (2003) bir çalışma göstermiştir ki; stx negatif *E. coli* O157:H7 NCTC12900 izolatı tavuklarda kolonize olabilmekte ve enfeksiyondan sonraki

24 hafta boyunca persiste kalabilmektedir. Bu durum shiga toksinlerin *E. coli* O157:H7' nin tavuklarda persiste kolonizasyonuna ve insan sağlığı açısından tavuk etinin risk faktörü olmasına çok az veya hiç etkisinin olmadığını göstermektedir.

E. coli O157:H7' nin tavuklarda persiste kolonizasyonunu anlamak amacıyla Best ve ekibi (2004) SPF civcivlere intimin ve flagella yönünden yetersiz *E. coli* O157:H7 NCTC12900 suşunun mutantlarını inokule etmişlerdir. Bu mutantların seçilmiş olmasının sebebi intiminin memeli türlerinde *E. coli* O157:H7 kolonizasyonu için primer faktör olarak gösterilmesi ve flagellanın da kanatlılar için patojen *E. coli* türlerinin primer virülens faktörü olarak kabul edilmesidir (La Ragione ve ark 2000). Çalışma bulgularına göre intimin yetersiz mutantın persiste kolonizasyonu normal tipten farklılık göstermemekte ve hatta mutant tip *E. coli* O157:H7 (211 gün) diğerine(127 gün) oranla daha uzun süre persiste kalabilmektedir. Aynı şekilde aflagellar (99 gün) ve intimin-aflagellar mutantlarda (113 gün) inokulasyondan sonra persiste kalabilmişlerdir. Daha nceki çalışmalarda *E. coli* O78:K80 ve Salmonella enterica Enteritidis serotipi gibi önemli kanatlı patojenleri için flagellanın SPF civcivlerde kolonizasyon ve persiste enfeksiyonda rol oynadığı belirlenmiştir (Allen-Vercoe ve ark 1999, La Ragione ve ark 2000). Ancak bu durumun *E. coli* O157:H7 için geçerli olmadığı Best ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Gastrointestinal dokuların histolojik analizlerinde mutantların intestinal epitel hücrelerinde memelilerde etken kolonizasyonunun primer göstergeleri olan gerçek bir mikrokoloni formasyonu ve A/E lezyonları oluşturamadıkları belirlenmiştir. Tüm bu bilgilerin ışığında *E. coli* O157:H7 ' nin tavuklarda enterosit yıkım lokusu (locus of enterocyte effacement-LEE) ile ilişkili olmayan mekanizmalarla kolonize olabildiklerini söylemek mümkündür.

Yapılan uzun zamanlı kolonizasyon çalışmasında (Schoeni ve Doyle 1994) *E. coli* O157:H7' nin maksimum fekal saçılımın 4. ayda olduğu belirlenmiştir. Bu dönem enfeksiyonun insanlarda da pik yaptığı yaz aylarından temmuza rastlamaktadır. Temmuz ayından sonra etkenin fekal saçılımı azalmakta ve bu oran sonbahar ve kış aylarında iyice düşmektedir.

Ülkemizde kıymalarda ve bazı hayvansal kaynaklı ürünlerde *E. coli* O157:H7 'nin varlığı üzerine yapılan araştırmalar sınırlı kalmıştır. Halkman ve ark. (1998) eşitli

gıdalarda yaptıkları bir çalışmada, *E. coli* O157:H7 'yi 255 adet çiğ kıyma, 50 adet hamburger ve 101 adet sucuk örneğinin 1'inde belirlemişlerdir. Sarımehtemtoğlu ve ark. (1998), 100'er adet hamburger ve İnegöl köftesi üzerinde yaptıkları bir çalışmada, inegöl köftelerinin % 5'inin ve hamburgerlerin % 2'sinin *E. coli* O157:H7 ile kontamine ve izolatların ise tümünün verotoksijenik özellikte olduklarını bildirmişlerdir. Aslantaş ve Yıldız (2002) Kars bölgesinde hayvansal gıdalarda yaptıkları bir çalışmada, 460 gıda örneğinde ve 80 sığır karkası yüzeyinde *E. coli* O157:H7 'yi belirleyememiş, 100 kıyma örneğinin sadece birinde tespit etmişlerdir. Cebiroğlu ve Nazlı (1999) araştırmalarında, enterohemorajik *E. coli* O157:H7'yi % 2,58 (4/155) oranında ve pozitif 4 örneğin 3'ünü dondurulmuş ve 1'ini dondurulmamış hamburgerlerde bulmuşlardır. Aksu ve ark. (1999) hayvansal kökenli gıdalarda yaptıkları araştırmada, *Escherichia coli* O157:H7'yi dana kıymasında % 6 (3/50) ve kuzu kıymasında % 4 (1/25) oranında belirlemişlerdir. Alişarlı ve Akman' ın (2004) yaptığı çalışmada, Van'da perakende satılan hazır kıymalarda *Escherichia coli* O157'nin varlığı araştırılmıştır. *E. coli* O157 dana kıyma örneklerinde % 4,66 (7/150) oranında, koyun kıymalarında ise % 2 (3/150) oranında belirlenmiştir.

Tavuklardan izole edilen *E. coli* suşlarının genellikle *E. coli* O157:H7 dışındaki O serogruplarına dahil oldukları görülmüştür (Smith ve ark 1991). APEC suşları genellikle O serogruplarına dahil olan O1, O2, O35 ve O78' dir (Blanco ve ark 1998, Gross 1994). Ayrıca bulunan suşların shiga toksin sentezleyemediği de belirlenmiş ve bu yüzden insanlar için patojen olmayacakları belirtilmiştir (Kobayashi ve ark 2002). APEC suşlarının enfeksiyon oluşturmada etkili olan virülens faktörleri tip 1 (F1A) ve P (F11) fimbriaları, curli, aerobaktin demir-bağlayıcı sistem, K1 kapsüler antijeni, sıcaklığa duyarlı hemaglutinin (Tsh) ve serumun bakterisidal etkisine karşı direnç olarak belirlenmiştir (Dho ve Fairbrother 1999).

Smith ve ekibinin (1991) İngiltere' de bulunan dondurulmuş ve taze tavuk etleri ile domuz sosisleri üzerinde shiga toksin sentezleyen *E. coli* suşlarının varlığı araştırılmıştır. Sosis örneklerinin % 25' inde shiga toksin pozitif *E. coli* bulunmuş ancak tavuk etlerinden izolasyon yapılamamıştır. Ayrıca shiga toksin pozitif suşların da *E. coli* O157:H7 dışındaki O serogruplarına dahil oldukları belirlenmiştir.

Kobayashi ve arkadaşları (2002) martı, güvercin ve broiler piliçlerinde shiga toksin ve intimin sentezleyen *E. coli* suşlarının varlığını araştırmışlardır. Alınan dışkı örnekleri *stx* ve *eae* genlerinin varlığını belirlemek üzere PZR yöntemiyle analiz edilmişlerdir. Tüm örnekler yapılan PZR analizinde *stx* geni yönünden negatif sonuç vermişlerdir. *Stx* geninin aksine *eae* geni özellikle martılarda (% 40) yüksek oranda bulunmuş, güvercin (% 7) ve broiler piliçlerinde (% 15) ise daha düşük oranlarda belirlenmiştir. Broiler piliçlerinden alınan örneklerde O sero gruplandırması yapılmış ve örneklerin insanlar için patojen olmayan O39, O74, O82 ve O140 serotipleri oldukları belirlenmiştir. Bu çalışmada broiler piliçlerinin *stx* negatif ve O157 serotipi olmayan *E. coli* suşlarına konaklık ettikleri ve dolayısıyla insanlar açısından risk faktörü olarak kabul edilemeyeceği ortaya konmuştur. Ayrıca *eae* geni pozitif olan piliçlerin EHEC-*hlyA* genine sahip olmadıkları için zoonotik olarak kabul edilemeyecekleri bildirilmiştir.

Bu araştırmada insanlar için önemli bir gıda kaynaklı patojen olan *E. coli* O157:H7'nin Ege Bölgesi'nde broiler piliçlerinde varlığının ortaya çıkarılması ve identifiye edilen suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi hedeflenmektedir. *E. coli* O157:H7'nin tavuk sekumunda küçük bir populasyonla kolonize olup intestinal sistemde çoğalması ve dışkıyla aylarca yüksek oranlarda saçılması tavukların insanlar açısından oldukça patojen olan bu bakteri yönünden önemli bir kaynak olduğunu göstermektedir. Ancak bu konuda özellikle ülkemizde çok fazla araştırma yapılmamış olması etkenin varlığını ve hastalık yapabilme olasılığını yadsımak anlamına gelmektedir. İnsan sağlığı açısından bu kadar önemli bir bakterinin gittikçe gelişen kanatlı endüstrisinin son ürünlerinde üreyebilme olasılığı dolayısıyla *E. coli* O157:H7'nin broiler piliçlerinde kolonize olabildiği ve dışkıyla saçılabilmesinin tespit edilmesinin gerekliliği düşünülerek bu araştırma yapılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Gereç

2.1.1. Örnekler

Araştırma için İzmir, Manisa, Aydın, Denizli ve Uşak illerindeki broiler kümeslerinden alınan 500 adet kloakal svap transport svaplarında incelenmek üzere Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincir uygulanarak getirildi.

2.1.2. Besiyerleri

2.1.2.1. İzolasyon besiyerleri

2.1.2.1.1. Modifiye Tryptic Soy Broth (Merck 1.09205)

Pepton (kazein)	17 g
Pepton (soya unu)	3 g
Sodyum klorid	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

Alınan kloakal svapların taşınmasında ve bakterinin zenginleştirilmesinde kullanıldı (Kobayashi ve ark 2002). mTSB besiyeri 33 g/lit konsantrasyonda 1 lit distile suda eritilerek hazırlandı ve erlenlere 225 ml olacak şekilde dağıtılıp otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edildi (FDA 1995).

2.1.2.2. İdentifikasyon besiyerleri

2.1.2.2.1. Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar (Difco 279100) ve CT SMAC Agar Katkısı (Merck 1.09202)

Pepton	20 g
Sodyum klorid	5 g
Safra tuzları No. 3	1.5 g
Sorbitol	10 g
Kristal violet	0.001 g
Nötral red	0.03 g

Agar-agar	15 g
Distile su	1000 ml

Kloakal svaplardan *E. coli* O157:H7 serotipine ait olabilecek kolonilerin elde edilmesi için kullanıldı. Sefiksim Tellürit içeren CT SMAC agar katkısı ise agarın daha selektif olmasını sağlamak amacıyla kullanıldı (Kim ve ark 2005). *E. coli* O157:H7 serotipinin sorbitolü fermente edememesinden yararlanarak hazırlanan, laktoz yerine sorbitol içeren sorbitol MacConkey agara (SMAC) besiyerinin daha selektif olmasını sağlamak amacıyla sefiksim tellürit katkısı eklendi. Böylece refakatçi floranın yanlış negatif sonuçlar vermesi engellendi. Sorbitol MacConkey agardan (Difco 279100) 51,6 g/l oranında olmak üzere 25,8 g agar 500 ml distile su içinde ısıtılarak eritildi ve otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edildi. CT SMAC Agar Katkısı (Merck 1.09202) agara ilave edilmeden önce bir şişe katkı üzerine 1 ml distile su eklenip karıştırıldı. Otoklav sonrasında 45 °C’ ye soğutulan 500 ml agara CT katkısı eklenip karıştırıldı ve petri kaplarına 12,5 ml/petri olacak şekilde döküldü (FDA 1995, Weagant ve ark 1995).

2.1.2.2.2. Fluorocult *E. Coli* O157:H7 Agar (Merck 1.04036)

Pepton (kazein)	20 g
Et ekstraktı	2 g
Maya ekstraktı	1 g
Sorbitol	10 g
Amonyum demir(III) sitrat	0.5 g
4-methylumbelliferyl-b-D-glucuronide	0.1 g
Sodyum klorid	5 g
Bromothymol blue	0.025 g
Sodium thiosulfate	2 g

Sodium deoxycholate	1.12 g
Agar-agar	13 g

CT-SMAC negatif olan kolonilerin β -glukuronidaz aktivitesini belirlemede kullanıldı. Besiyeri 55 g/lt olacak şekilde gerekirse ısıtılarak distile su içinde eritildi ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilerek petri kaplarına döküldü (Szabo ve ark 1986).

2.1.2.2.3. Mueller Hinton Agar (Merck 1.05437)

Et ekstraktı	2 g
Kazein hidrolizatı	17.5 g
Nişasta	1.5 g
Agar-agar	13 g

Escherichia coli O157:H7 olarak belirlenen numunelerin antibiyotik duyarlılıklarının tespit edilmesinde kullanıldı (Kim ve ark 2005). Dehidre besiyeri 34.0 g/l olacak şekilde distile suda ısıtılarak eritildikten sonra otoklavda 115 °C'de 10 dakika sterilize edilip, steril petri kutularına 12.5 ml döküldü.

2.1.2.2.4. İndol test ortamı

Pepton	4 g
Sodyum klorid	2 g
Distile su	100 ml

Karışımın pH'sı 7.4 – 7.6'ya ayarlandıktan sonra, tüplere 3-5 ml dağıtıldı ve 15 dakika otoklavda sterilize edildi (Koneman ve ark 1997).

2.1.3. Antiserum Test Kitleri

2.1.3.1. *E. coli* O157 Lam Aglutinasyon Testi (DENKA SEIKEN- 295347)

E. coli O157 lam aglutinasyon testi O157 somatik antijenine karşı hazırlanmış spesifik somatik (O) antikorları (polivalan antiserum: domuz; monovalan antiserum: tavşan) içeren ve koruyucu olarak 0.08 w/%v sodyum azid eklenmiş sıvı ürün kullanılan, lam üzerinde antijen ve antikor aglutinasyonuna dayanan bir testtir. Test içeriğinde aynı zamanda alternatif grup O antiserumu da bulunmaktadır.

1. Grup O Antiserum (Set 1)

2 ml x 51 şişe (8 şişe polivalan antiserum, 43 şişe monovalan antiserum)

Polivalan antiserum	Monovalan antiserum						
Polivalan 1	O1	O26	O86a	O111	O119	O127a	O128
Polivalan 2	O44	O55	O125	O126	O146	O166	
Polivalan 3	O18	O114	O142	O151	O157	O158	
Polivalan 4	O6	O27	O78	O148	O159	O168	
Polivalan 5	O20	O25	O63	O153	O167		
Polivalan 6	O8	O15	O115	O169			
Polivalan 7	O28ac	O112ac	O124	O136	O144		
Polivalan 8	O29	O143	O152	O164			

2. Grup O Antiserum (alternatif)

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

Polivalan IIIalternatif)- içerdiği tipler: O86, O114, O125, O127, O128

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

Test kiti içeriğinde olmayan ve kullanılan materyaller ise şunlardır: küçük test tüpleri, fizyolojik tuzlu su, pipetler, mikropipetler, florasan lamba, agar medyum (nutrient agar medyum, heart infuzyon (HI) agar medyum), otoklav (121°C) veya kaynayan su banyosu, santrifuj, lam ve asetat kalemidir.

2.1.3.2. *E. coli* O157 Lateks Aglutinasyon Testi (Oxoid DR-620M)

E. coli O157 lateks aglutinasyon testi O157 somatik antijenine spesifik antiadilerin *E. coli* O157 şüpheli kolonilerle temas ettiğinde aglutinasyon şekillenmesi esasına dayanan hızlı bir testtir.

Test kitinin içeriğinde test lateksi, kontrol lateksi, pozitif ve negatif kontrol süspansiyonları ile reaksiyon kartları bulunmaktadır.

DR 621 M Test Lateksi : O157 somatik antijeni ile reaktif edilmiş spesifik tavşan antikorlarıyla duyarlılaştırılmış mavi lateks partikülleri içerir.

DR 622 M Kontrol Lateksi : Preimmun tavşan globulinleri ile duyarlı hale getirilmiş mavi lateks partikülleri içerir.

DR 623 M Pozitif Kontrol Süspansiyonu : İnaktive edilmiş *E. coli* O157 hücreleri içeren tampon solüsyondur.

DR 624 M Negatif Kontrol Süspansiyonu : *E. coli* O116 hücreleri içeren tampon solüsyondur.

DR 500G Reaksiyon Kartları : Kit içinde 35 adet tek kullanımlık kart bulunmaktadır.

Test kitinin içinde bulunmayan ancak gerekli olan materyaller şunlardır: öze, % 0.85' lik fizyolojik tuzlu su.

2.1.3.3. H7 Antiserum Tüp Aglutinasyon Testi (DENKA SEIKEN-295354)

H7 tüp aglutinasyon testi H7 flagellar antijenine karşı hazırlanmış spesifik flagella (H) antikorları (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.

5 ml x 22 şişe (22 şişe monivalan serum)

H antiserum

H2	H4	H5	H6	H7	H9	H10	H11
H12	H16	H18	H19	H20	H21	H27	H28
H34	H40	H41	H42	H45	H51		

Test kiti içeriğinde bulunmayan ancak kullanılması gereken materyaller şunlardır: Yarı sıvı medyum (% 0.3 yarı sıvı medyum (LIM): steril Craigy tüpünün içine konulduğu aerofilik kapaklı bir test tüpüne yerleştirilir), sıvı medyum (brain heart infuzyon (BHI) sıvı medyumunu, HI sıvı medyumunu: medyumun miktarı en az 10 ml olmalıdır), %1 formalin içeren fizyolojik tuzlu su ve su banyosu (50 °C).

2.1.4. Ayıraçlar

İndol ayırıcı

P-Dimethylaminobenzaldehyde	10 g
Isoamyl alcohol	150 ml
HCl (konsantre)	50 ml

2.1.5. Boyalar

Gram boyama (Merck-111885) yapıldı.

2.1.6. Antibiyotik Diskleri

Antibiyogram testlerinde Oxoid firmasına ait aşağıda sıralanan tanı diskleri kullanıldı:

Ampisilin (AMP- 25 µg), Amoksisilin +Klavulonik asit (AMC- 30 µg), Sefotaksim (CTX- 5 µg), Sefalatin (KF- 30 µg), Kloramfenikol (C- 30 µg), Eritromisin (E- 15 µg), Gentamisin (CN- 10 µg), Kanamisin (K- 30 µg), Norfloksasin (NOR- 10 µg), Polimiksin B (PB- 300 IU) ve Trimetoprim + Sulfametoksazol (SXT- 25 µg).

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin alınması ve kültürü

Araştırma için İzmir, Aydın, Manisa, Denizli ve Uşak illerinde bulunan broiler kümeslerindeki piliçlerden 500 adet kloakal svap alınmıştır. Soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarı'na getirilen kloakal svaplar mTSB' de zenginleştirilerek 42 °C'de 24 saat çalkalanarak inkube edildi (Halkman ve ark 2001). 24 saat sonunda üreme şekillenen besiyerlerinden preparatlar hazırlanarak Gram boyama yapıldı. Boyama sonucunda belirlenen Gram negatif basillerin ait olduğu kolonilere indol testi uygulandı. İndol pozitif sonuç veren koloniler *E. coli* şüpheli olarak belirlendi.

2.2.2. İzole edilen suşların identifikasyonu

İzole edilen suşların koloni morfolojileri, indol testi sonuçları ve identifikasyon besiyerleri ile test sonuçları değerlendirilerek *E. coli* O157:H7 identifikasyonuna gidildi.

2.2.2.1. Cefixim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey Agarda Üreme

mTSB besiyerinde üreyen Gram negatif ve İndol pozitif *E. coli* şüpheli kolonilerden CT-SMAC agarlara öze ile ekim yapıldıktan sonra petriyerler 37 °C' de 24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda renksiz olan koloniler sorbitol negatif, pembe-kırmızı koloniler ise sorbitol pozitif olarak değerlendirildi (E. Merck 1998, Doyle ve Schoeni 1987).

2.2.2.2. Fluorocult *E. Coli* O157:H7 Agarda Üreme

CT-SMAC agarda üreyip sorbitol negatif sonuç veren kolonilerden Fluorocult *E. coli* O157:H7 agara öze ile ekim yapıldıktan sonra petriyerler 37 °C' de 24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda sorbitolü kullanamayan bakteriler renksiz, sorbitol pozitif koloniler ise sarı renkte koloniler oluşturdular. Sorbitol negatif olan koloniler UV ışını (366 nm) altında incelenerek ışımaya vermeyen koloniler *E. coli* O157:H7 şüpheli olarak belirlendiler.

2.2.2.3. *E. coli* O157 Lam Aglutinasyon Testi

E. coli O157:H7 şüpheli olarak belirlenen kolonilere O157 antijeninin varlığının araştırılması amacıyla O157 lam aglutinasyon testi yapıldı (Sakazaki 1992).

E. coli O157:H7 şüpheli kolonilerden üç öze dolusu alınarak 3 ml fizyolojik tuzlu su içinde süspansiyon edildi. Süspansiyon 121 °C 'de 15 dk ve 100 °C 'de 1 saat bekletildikten sonra 900 devirde 20 dk santrifüje edildi. 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 kalemi 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 dk boyunca eğilerek süspansiyonların karışması sağlandıktan sonra O157 pozitif olan karışımlarda aglutinasyon deseni şekillendi. Aglutinasyon florasan ışığı altında lamlara bakıldığında çok net olarak gözlemlendi. 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 örnekler polivalan serumun içerdiği monovalan serumlar belirlenerek yukarıdaki işlemler monovalan serum kullanılarak tekrarlandı ve aglutinasyon pozitif O antiserumları belirlendi.

2.2.2.4. *E. coli* O157 Lateks Aglutinasyon Testi

E. coli O157 lam aglutinasyon testi ile O157 antijenine sahip olduğu belirlenen kolonileri desteklemek amacıyla *E. coli* O157 lateks aglutinasyon testi yapılmıştır (March ve Ratnam 1986).

Buzdolabında 2-8 °C' de bekletilen lateks belirteçleri oda sıcaklığına getirildi. Lateks süspansiyonları iyice çalkalanıp karıştırıldı, bu esnada süspansiyonların dökülmemesine özellikle dikkat edildi. Reaksiyon kartının üzerindeki dairelerden birine dairenin iç kenarına yakın gelecek şekilde 1 damla test lateksi damlatıldı. Dairenin başka bir kenarına da lateks süspansiyonu ile kesinlikle karışmayacak şekilde 1 öze dolusu fizyolojik tuzlu su damlatıldı.

Sonraki aşamada test edilecek koloniden 1 öze dolusu alınıp fizyolojik tuzlu su damlası ile dikkatlice pütür kalmayınca kadar karıştırıldı. Numune-fizyolojik tuzlu su süspansiyonu test lateksi damlası ile karıştırılıp dairenin içine öze kullanılarak yayıldıktan sonra öze alevden geçirilerek sterilize edildi. Reaksiyon kartı 1 dk kadar dairesel hareketlerle sallanarak aglutinasyonun şekillenmesi beklendi. Bu aşamada kartın 1 dakikadan fazla sallanmamasına özellikle dikkat edildi.

Aglutinasyon deseni veren numunelerin O157 serotipine ait olduğu doğrulandı. Bir dakika içinde aglutinasyon şekillenmeyen izolatların O157 negatif olarak değerlendirilmesi gerekiyordu, ancak yaptığımız O157 lam aglutinasyon testini doğrular şekilde lateks testte kullanılan tüm izolatlar pozitif sonuç verdi.

2.2.2.5. H7 Antiserum Tüp Aglutinasyon Testi

E. coli O157 olarak belirlenen kolonilerle *E. coli* O157:H7 varlığının incelenmesi amacıyla H7 antiserumuyla tüp aglutinasyon testi yapıldı (Sakazaki 1992).

Koloniler Brain Heart infuzyon sıvı besiyerine inokulasyona hazırlanmaları amacıyla Craigy's tüpü içinde bulunan yarı sıvı medyumdan 3-5 defa geçirildi. Daha sonra BHI sıvı medyumuyla hücre kültürü hazırlandı ve 37 °C' de bir gece inkübe edilip eşit miktarda %1 w/v formalin içeren fizyolojik tuzlu su ile karıştırıldı.

Test tüplerine üçer damla H antiserumlarından damlattıktan sonra her bir tüpe 0.5 ml hücre süspansiyonundan damlatıldı. H antiserumu içermeyen bir tüp ise kontrol olarak kullanıldı. Tüplerdeki antiserum ve hücre süspansiyonları iyice karıştırıldıktan sonra 50 °C' lik su banyosunda 1 saat bekletildi. 1 saat sonunda tüpler aglutinasyonun oluşup oluşmadığını anlamak için çıplak gözle izlendi. Aglutinant kolayca dağılabileceği için gözlem yapılırken tüplerin sarsılmamasına özellikle dikkat edildi. H7 antiserumuyla aglutinasyon deseni şekillenen tüplerdeki koloniler *E. coli* O157:H7 pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Antibiyotik duyarlılık testlerinde Müeller-Hinton Agar (Difco) kullanılarak Kirby-Bauer Disk Diffüzyon yöntemi uygulandı (Bauer ve ark 1966).

Hazırlanan Müeller-Hinton besiyeri 10 cm çapındaki petrilere 4 mm kalınlığında olacak şekilde döküldükten sonra donmaya bırakıldı. *E. coli* O157:H7 suşlarının 0.5 McFarland değerindeki buyyon kültürlerinden plak besiyerinin yüzeyine her tarafa yaydırılarak ekimleri yapıldı. Ekim yüzeyinin kuruması için birkaç dakika beklenildikten sonra diskler ucu alevden geçirilerek steril edilmiş pensetle kenardan 1.5 cm, birbirlerinden 1.5 cm olacak şekilde yerleştirildi.

Antibiyoqram testlerinde kullanılan antibiyotik diskleri Oxoid firmasına ait olup diskler ve disk içerikleri şunlardır Ampisilin (AMP- 25 µg), Amoksisilin + Klavulonik asit (AMC- 30 µg), Sefotaksim (CTX- 5 µg), Sefalatin (KF- 30 µg), Kloramfenikol (C- 30 µg), Eritromisin (E- 15 µg), Gentamisin (CN- 10 µg), Kanamisin (K- 30 µg), Norfloksasin (NOR- 10 µg), Polimiksin B (PB- 300 IU) ve Trimetoprim + Sulfametoksazol (SXT- 25 µg)' dur.

Plaklar 15 dk oda ısısında bekletildikten sonra, 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek, disk çevresindeki inhibisyon zon sınırları ölçülerek Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2007) standartlarına göre yorumlandı.

3. Bulgular

Bu araştırmada, 500 adet kloakal svap örneğinin 32 (% 6.40)'sinden *Escherichia coli* O157:H7 serotipi identifiye edilmiştir. Ayrıca örneklerin 128 (% 25.60)' inden diğeri *E. coli* türleri, 75 (% 15)' inden *Klebsiella sp.*, 193 (% 38.60)' ünden *Proteus sp.*, 38 (% 7.60)' inden *Pseudomonas sp.* identifiye edilmiş, 34 (% 6.80)' ünde ise bakteriyel üreme şekillenmemiştir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Broiler piliçlerinden alınan kloakal svaplardan izole ve identifiye edilen mikroorganizmalar.

<i>İzole ve İdentifiye Edilen Mikroorganizmalar</i>	<i>İzolat Sayısı</i>	<i>Yüzde oranı (%)</i>
<i>E. coli sp.</i>	128	25.60
<i>E. coli</i> O157:H7	32	6.40
<i>Klebsiella sp.</i>	75	15.00
<i>Proteus sp.</i>	193	38.60
<i>Pseudomonas sp.</i>	38	7.60
Bakteriyel Üreme Olmayan	34	6.80
TOPLAM	500	100.00

Araştırmada identifikasyon besiyerlerinde üremeden sonra yapılan O157 lateks aglutinasyon ve lam aglutinasyon testleri sonucunda 32 (% 6.40) adet izolatın *E. coli* O157 serotipine ait oldukları görülmüştür. Bu izolatlar ile yapılan H7 antiserum tüp aglutinasyon testi sonucunda ise O157 serotiplerinin tümünün H7 flagellar antijenine sahip oldukları belirlenmiş ve bu izolatlar *E. coli* O157:H7 serotipi olarak identifiye edilmişlerdir.

Araştırmada kullanılan kloakal svap örnekleri Manisa' da bulunan broiler kümeslerinden 180 adet, İzmir'den 140, Aydın' dan 108, Denizli'den 36 ve Uşak'tan 36 adet olacak şekilde toplanmıştır. Örneklerden izole edilen *E. coli* O157:H7 suşlarının illere göre sayıları oranlandığında en yüksek yüzdenin 108/13 (% 12.04) ile Aydın ilinde olduğu belirlenmiştir. Bu oranı 140/9 (% 6.43) ile İzmir, 36/2 (% 5.55) ile Uşak, 180/7 (% 3.88) ile Manisa ve 36/1 (% 2.77) oranı ile Denizli takip etmektedir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. İllere göre elde edilen *E. coli* O157:H7 serotipi miktarları ve yüzdeleri.

Şehirler	Örnek Sayısı	<i>E. coli</i> O157:H7 sayısı	Yüzde Oranı (%)
Manisa	180	7	3.88
İzmir	140	9	6.43
Aydın	108	13	12.04
Denizli	36	1	2.77
Uşak	36	2	5.55
TOPLAM	500	32	

E. coli O157:H7 izolatlarıyla yapılan antibiyogram testleri sonucunda izolatların Polimiksin B' ye % 100.00, Cefotaxime % 75.00, Norfloksasine % 59.38 oranlarında duyarlı; Kanamisine % 37.50 oranında orta derecede duyarlı; Ampisiline %100.00, Cephalotine % 100.00, Kloramfenikole % 87.50, Sulfametoksazol-Trimetoprim %81.25, Eritromisine %81.25 ve Amoksisilin-Klavulonik aside % 62.50 oranlarında dirençli oldukları bulunmuştur.

Araştırmada kullanılan antibakteriyellerin etki derecelerine göre inhibisyon zon sınırları Çizelge 3.3'de ve antibiyotik duyarlılıklarının *E. coli* O157:H7 izolatlarına göre dağılımı Çizelge 3.4'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.3. Kullanılan antibiyotiklerin etkilerine göre inhibisyon zon sınırları (CLSI, 2007).

<i>Antibiyotikler</i>	<i>Dirençli (R)</i>	<i>Az Duyarlı (I)</i>	<i>Duyarlı (S)</i>
CTX	≤15	15-18	18-21
AMC	≤ 19	-	≥ 20
NOR	≤ 12	13-16	≥ 17
C	≤ 20	-	≥ 21
CN	≤ 12	13 – 14	≥ 15
KF	≤ 19	-	20-25
K	≤ 13	14 – 17	≥ 18
AMP	≤ 21	22-29	≥ 30
PB	≤ 8	9 – 11	≥ 12
E	≤ 8	9 – 11	≥ 12
SXT	≤ 15	16 – 18	≥ 19

AMC: Amoksisilin-klavulonik asit, NOR: Norfloksasin, C: Kloramfenikol, CN: Gentamisin, K: Kanamisin, AMP: Ampisilin, PB: Polimiksin B, E: Eritromisin, SXT: Sulfametaksazol-Trimetoprim, KF: Cephalotin, CTX: Cefotaxim

Çizelge 3.4. Antibiyotik duyarlılıklarının *E. coli* O157:H7 izolatlarına göre dağılımı.

İzolatlar	NOR	AMP	C	KF	PB	K	SXT	AMC	CTX	CN	E
G 48	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R
G 50	S	R	R	R	S	R	R	R	I	S	R
G 63	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R
G 67	I	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S
G 74	S	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R
G 76	I	R	R	R	S	I	R	S	S	S	R
G 77	S	R	R	R	S	I	S	R	S	S	R
G 107	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
G 115	S	R	R	R	S	I	S	R	S	S	R
G 116	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R
G 118	S	R	R	R	S	I	R	S	S	R	R
G 120	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R
G 132	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S
G 206	I	R	R	R	S	I	R	R	S	S	S
G 207	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	R
G 208	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	R
G 209	S	R	R	R	S	I	S	R	S	S	R
G 224	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S
G 225	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S
G 333	S	R	R	R	S	I	R	R	S	R	R
G 334	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	R
G 335	S	R	R	R	S	I	S	R	S	S	R
G 336	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S
G 338	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
G 340	S	R	R	R	S	I	R	S	S	R	R
G 341	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R
G 342	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R
G 343	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R
G 344	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R
G 345	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
G 346	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R
G 347	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R

AMC: Amoksisilin-klavulonik asit, NOR: Norfloksasin, C: Kloramfenikol, CN: Gentamisin, K: Kanamisin, AMP: Ampisilin, PB: Polimiksin B, E: Eritromisin, SXT: Sulfametaksazol-Trimetoprim, KF: Cephalotin, CTX: Cefotaxim.

4. Tartışma

E. coli O157:H7 serotipi son yıllarda insanlarda görülen zoonoz ve gıda kaynaklı enfeksiyon ve salgınların en önemli nedenlerinden biridir. Etken diare, hemorajik kolitis (HC) hemolitik üremik sendroma (HUS) neden olur. Hastalık insanlarda karın ağrısı, sulu ya da kanlı ishal gibi gastrointestinal semptomlar ve daha az sıklıkta da sistemik komplikasyonlarla seyreder.

E. coli O157:H7 serotipi köpek, kuş, koyun, geyik ve insanda görülmekle beraber, sığır temel kaynak olarak ele alınmaktadır. Bunun nedeni, insanlarda bu serotipin neden olduğu kanıtlanmış pek çok vakada yeterince pişirilmemiş sığır etlerinin (Burnens ve ark 1995, Clarke ve ark 1994, Faith ve ark 1996) ve daha az sıklıkta olmak üzere çiğ sütlerin hastalıktan sorumlu olduğunun kanıtlanmasıdır (Garrity ve ark 2005, Hancock ve ark 1994, Samadpour ve ark 1994). Bununla beraber, hayvan dışkısı ile bulaşmış toprak ve suyun dolaylı olarak hastalığın taşınmasında ve yayılmasında önemli bir rol oynadığı da bilinmektedir. Etkenin klorla kolayca giderilebilmesine rağmen Kanada' da şehir suyu klorlama sistemindeki bir bozukluktan dolayı içme suyu yoluyla başlayan büyük bir salgın olduğu belirtilmiştir (Johnson ve ark 1983, Le Saux ve ark 1993).

E. coli O157:H7 epidemiyolojisinin en önemli özellikleri sığır yada başka bir hayvanın intestinal sisteminde bulunması; rezervuar hayvandan çok çeşitli gıdalara ve özellikle de sığır etine bulaşması; çok düşük bir enfeksiyöz dozla bulaşıp konak insanda yüksek oranlara ulaşması ve insandan insana bulaşarak salgınlara neden olmasıdır. ABD ve Avrupa ülkelerinde yüksek oranda tüketilen az pişmiş biftek ve hamburger köfteleri

hastalığın bulaşmasında en önemli kaynaktır. Ancak az gelişmiş ülkelerdeki vakaların daha çok yetersiz hijyen koşullarından şekillendiği düşünülmektedir (Nataro ve Kaper 1998).

Dünya çapında sığır etine yönelimin yüksek fiyatlar ve zoonoz hastalıklar yüzünden azaldığı ve üretimi endüstriyel bir sektör haline dönüşen tavuk etinin düşük fiyatı ve sığıra oranla sağlıklı beyaz eti sayesinde tüketiminin gün geçtikçe arttığı son yıllarda kanatlı sektörden elde edilen son ürünün hijyen şartları sağlanarak tüketiciye ulaştırılması çok büyük bir önem kazanmıştır. Bu açıdan bakıldığında *E. coli* O157:H7 serotipinin tavuk etlerinde ve yumurtalarında bulunup bulunmadığı eğer var ise ne ölçüde bulaşma olduğunun bilinmesi gerekmektedir. Ancak bu konuda Türkiye ve Dünya 'da çok fazla araştırma yapılmamış, çalışmalar daha çok sığır ve koyun gibi ruminantlar ile insan üzerinde yoğunlaşmıştır.

Tavuklar üzerine çok fazla araştırma yapılmamasına rağmen Doyle ve Schoeni' nin (1987) yaptığı bir çalışmada sığır, koyun, domuz ve tavuk etlerinden alınan örneklerden *E. coli* O157:H7 izole edilmeye çalışılmıştır. Çalışma sonunda sığır örneklerinden % 3.7, koyun % 2, domuz % 1.5 ve tavuk % 1.5 olmak üzere *E. coli* O157:H7 identifiye edilmiştir. Etken tavuk butu örneklerinde belirlenmiş ve yine başka bir çalışmada piliç nugget numunelerinde de *E. coli* O157:H7 serotipine rastlanmıştır (Martin ve ark 1986). Abdul-Raouf ve arkadaşları (1993) tavuk eti örneklerinin % 4 'ünden *E. coli* O157:H7 izole edebilmişlerdir.

Fransa'da yapılan bir başka çalışmada (Wadolowski ve ark 1990) ise, tavuk, sosis ve sığır kıymasından oluşan 250 örnekte 4 tavuk, 1 sosis ve 1 kıyma örneğinde shiga toksin oluşturmayan *E. coli* O157 tespit edildiği bildirilmiştir. Yine aynı ülkede yapılan başka bir çalışmada (Vernozy-Rozand ve ark 1997) tavuk eti örneklerinin %4' ünden *E. coli* O157 serotipinin shiga toksin oluşturmayan suşları izole edilmiştir.

Tavuk eti tüketimi ile *E. coli* O157:H7 serotipinin insanlarda neden olduğu salgınlar arasında doğrudan bir bağlantı belirtilmemiş olsa da gıda kaynaklı bir *E. coli*

O157:H7 salgınında tavuk etinin de kontaminasyon kaynakları arasında olduğu rapor edilmiştir (Carter ve ark 1987).

E. coli O157:H7 tavuk etinden veya dışkı örneklerinden izole edilemediği çalışmalar ne yazık ki çoğunluktadır (Blanco ve ark 1997, Chahed ve ark 2005, Chaman ve ark 2000, Khan ve ark 2002). *E. coli* suşlarında belirlenen O157:H7 serotipi oranları, hayvan türlerine göre değerlendirildiğinde çalışma bulgularının birbirinden farklı olması *E. coli* suşlarındaki serotipik yapının bölgesel ve ülkesel olarak değişebileceği (Sihvonen ve Miettinen 1985, Wallace ve ark 1997) ve kullanılan metotların (Dell’Omo 1998, Masalmeh ve ark 1990, Solmaz ve ark 2000) farklı olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Chapman ve ekibinin (2000) yaptığı bir araştırmada sığır, koyun, domuz ve tavuklardan dışkı örnekleri alınmıştır. Numuneler *E. coli* O157 yönünden incelenmiş ve sığır örneklerinin % 15.7, koyunların % 2.2, domuzların % 0.4’ünde bakteri bulunmuş ancak tavuk dışkı örneklerinde belirlenememiştir.

Japonya’ da Kijima-Tanaka ve arkadaşlarının (2005) yaptığı çalışmada sağlıklı sığır, domuz ve tavuklardan toplanan dışkı örnekleri *E. coli* O157:H7 yönünden incelenmişlerdir. Ancak sonuçlara göre hiçbir tavuk dışkısından *E. coli* O157:H7 izole edilememesine rağmen sığır örneklerinin % 23, domuz örneklerinin ise % 14’ ünde izolasyon başarıyla gerçekleştirilmiştir. Blanco ve arkadaşları (1997) tavuklardan izole ettikleri 625 *E. coli* suşunun O157 negatif olduklarını bulmuşlardır. Chahed ve arkadaşları (2005) 1999-2003 yılları arasında biftek, dana eti, domuz, tavuk ve balıklar üzerinde yaptıkları araştırmada tavuk eti ve deri örneklerinin *E. coli* O157:H7 yönünden negatif olduklarını belirlemişlerdir.

E. coli O157:H7 üzerinde tüm dünyada ve buna paralel olarak Türkiye 'de de bu bakteri ile çalışmalar başta üniversiteler olmak üzere çeşitli kurum ve kuruluşlarda sürdürülmektedir. Araştırmaların büyük bir çoğunluğu bu bakterinin gıdalarda belirlenmesine ve inhibisyonuna yöneliktir (Halkman ve ark 2001). Ancak bilindiği kadarıyla Türkiye’ de tavuklardan *E. coli* O157:H7 serotipinin izole edildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla beraber Gülhan’ ın yaptığı (2003) çalışmada, sığırlardan izole

edilen 6 (% 12), buzağılardan 9 (% 18), koyunlardan 13 (% 26), kedilerden 1 (% 2), köpeklerden 8 (% 16), tavuklardan 3 (% 6), güvercin ve martılardan da 2 (% 4) suş O157 serotipi olarak saptanırken, devekuşu orijinli suşların tamamı O157 serotipi bakımından negatif bulundu. Yine aynı çalışmada tavuklarda % 4 oranında K99 serotipi, % 10 O1:K1 ve % 8 oranında da O78:K80 serotipleri bulunmuştur. Baran ve Gülmez (2002) ise dana bifteklerinden % 6 oranında *E. coli* O157:H7 izole ederken, tavuk bagetlerinde yapılan incelemeler negatif sonuç vermiştir. Erganiş ve ark. (1992) ise tavuk orijinli 113 *E. coli* izolatından 13 (% 11.5)'ünü O1, 29 (% 25.6)'unu da O78 serotipi olarak tespit etmişlerdir.

Daha önce yapılan araştırmalar göstermektedir ki *E. coli* O157:H7 serotipi tavuklardan alınan kloakal svap veya dışkı örneklerinden izole edilememiştir (Chapman ve ark 2000, Khan ve ark 2002). Ancak yaptığımız çalışmada İzmir, Aydın, Manisa, Denizli ve Uşak illerindeki fason broiler kümeslerinden alınan 500 adet kloakal svabın 32'sinden (% 6.40) *E. coli* O157:H7 serotipi identifiye edilmiştir. Bu veri bir günlük broiler veya yumurtacı civcivlere deneysel olarak *E. coli* O157:H7 inokule edilen çalışmaların sonuçlarını doğrulamaktadır (Beery ve ark 1985, Best ve ark 2003, Gülhan 2003, Schoeni ve Doyle 1994). Bu çalışmaların ortak sonucu etkenin sekumda kolonize olup uzun süreler boyunca dışkıyla saçıldığını göstermektedir. Diğer bir önemli nokta ise çalışmamızda alınan numunelerin tümünün sahadan toplanmış olması ve deneysel bir enfeksiyon ya da etken inokulasyonunun söz konusu olmamasıdır.

Yapılan araştırmanın diğer bir önemli sonucu ise illere göre alınan örneklerden izole edilen *E. coli* O157:H7 serotipinin Aydın ilinde 108/13 (% 12.04) gibi yüksek bir oranda bulunmasıdır. Bu oranı 140/9 (% 6.43) ile İzmir, 36/2 (% 5.55) ile Uşak, 180/7 (% 3.88) ile Manisa ve 36/1 (% 2.77) oranı ile Denizli takip etmektedir.

E. coli O157:H7 'nin tavuk eti ve tavuk eti ürünlerinden izole edildiği çalışmalar (Abdul-Raouf ve ark 1993, Carter ve ark 1987, Martin ve ark 1986, Wadolowski ve ark 1990) ise kesim aşamasından tüketiciye kadar herhangi bir aşamada et veya şarküteri ürününün etkenle kontamine olduğunu göstermektedir. Çalışmamız sonucunda elde

ettiğimiz veriler kontaminasyonun enfekte tavuk dışkısı yoluyla olabileceğini kanıtlamaktadır.

E. coli O157:H7 tavukların intestinal sistemine sürekli olarak yerleşim göstermektedir. İncelenen 101 yumurtanın 14' ünde (% 13.9) kabuk üzerinde etkene rastlanırken, yumurta sarısında veya akında *E. coli* O157:H7 yönünden yapılan testler negatif olarak sonuçlanmıştır. Bu durum yumurtanın kloakadan geçişi sırasında kabuğun dışkıyla teması sonucu kontamine olmasıyla açıklanabilir (Schoeni ve Doyle 1994). Kloakal svaplardan *E. coli* O157:H7 serotipini izole ettiğimiz çalışmamız damızlık broiler piliçlerinde persiste enfeksiyon şekillenebileceğini ve enfeksiyonun yumurta kabuğu yoluyla broiler civcivlerine yaşamlarının ilk anlarında bulaşarak tavuk etinin tüketiciye ulaşana kadar kontaminasyon kaynağı olarak değerlendirilebileceğini açıkça göstermektedir.

Beery ve arkadaşlarının (1985) yaptığı çalışmanın en önemli sonucu enfekte civcivlerin oral yolla kontaminasyondan 5 ay sonrasına kadar dışkılarında 10^8 civarında *E. coli* O157:H7 bakterisinin bulunmasıdır. Bu durum tavukların bu etken yönünden rezervuar olarak dikkate alınmaları gerektiğinin en büyük kanıtıdır.

E. coli O157:H7 serotipinin birçok antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu rapor edilmesine (Swerdlow ve ark 1992) karşın Kore 'de Kim ve arkadaşlarının (2005) gerçekleştirdiği çalışmada kullanılan *E. coli* O157:H7 suşlarının % 45.5' inin iki veya daha fazla antibiyotiğe karşı direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. Suşların eritromisine karşı dirençlilikleri % 100 olarak bulunmuştur. Bu oranı % 27.2 ile ampisilin, % 18.2 ile sefalotin ve yine % 18.2 'lik oranla tetrasiklin izlemektedir.

Hindistan 'da yapılan başka bir çalışmaya göre ise antimikrobiyal direnç zonları en çok ampisilin (% 25.4), tetrasiklin (% 23.8) ve streptomisinle (% 14.3) şekillenirken; sefalotin (% 11.1) ve nalidiksik aside (% 6.4) karşı geliştirilen direnç daha düşüktür (Kenny ve ark 1997). Galland ve arkadaşlarının (2001) ABD 'de yaptıkları araştırmada

bütün izolatlar tilmikosine dirençlilik gösterirken, izolatların çoğunun trimetoprim/sulfametoksazol ve siprofloksasine duyarlı oldukları bulunmuştur. Malezya 'da yapılan araştırmada antibiyotik dirençliliği basitrasın (% 100), sulfafurazol (% 77), ampisilin (% 57), sefalotin (% 53) ve karbenisilin (% 30) gibi yüksek oranlarda gözlenmiştir (Radu ve ark 2001). Japonya 'da ise ampisilin, fosfomisin, kanamisin ve vankomisine karşı direnç zonlarının şekillendiği görülmüştür (Tsuboi ve ark 1996). Bu bilgilerin ışığında *E. coli* O157:H7 serotipinin ampisilin ve eritromisine dirençli olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda *E. coli* O157:H7 izolatlarıyla yapılan antibiyogram testleri sonucunda izolatların Polimiksin B' ye % 100.00, Cefotaxime % 75.00, Norfloksasine % 59.38 oranlarında duyarlı; Kanamisine % 37.50 oranında orta derecede duyarlı; Ampisiline % 100.00, Cephalotine % 100.00, Kloramfenikole % 87.50, Sulfametoksazol-Trimetoprim % 81.25, Eritromisine % 81.25 ve Amoksisilin-Klavulonik aside % 62.50 oranlarında dirençli oldukları bulunmuştur. Araştırmamızda belirlenen Ampisilin ve Eritromisine karşı oluşan yüksek oranda dirençlilik diğer çalışmalarla (Kenny ve ark 1997, Kim ve ark 2005, Radu ve ark 2001) örtüşürken Kloramfenikol ve Trimetoprim-Sulfametoksazole karşı oluştuğunu belirlediğimiz dirençlilik hakkında geçmiş çalışmalarla pek uyuşmayan sonuçlar elde edilmiştir (Feng ve ark 1991).

5. Sonuç

Sonuç olarak Aydın, İzmir, Manisa, Denizli ve Uşak illerindeki fason broiler kümeslerinden toplanan 500 adet kloakal svap örneğinin 32 (% 6.40)'sinden *Escherichia coli* O157:H7 serotipi identifiye edilmiştir. Ayrıca örneklerin 128 (% 25.60)' inden diğer *E. coli* türleri, 75 (% 15)' inden *Klebsiella sp.*, 193 (% 38.60)' ünden *Proteus sp.*, 38 (% 7.60)' inden *Pseudomonas sp.* identifiye edilmiş, 34 (% 6.80)' ünde ise bakteriyel üreme şekillenmemiştir. Örneklerden izole edilen *E. coli* O157:H7 suşlarının illere göre sayıları oranlandığında en yüksek yüzdenin 108/13 (% 12.04) ile Aydın ilinde olduğu belirlenmiştir. Bu oranı 140/9 (% 6.43) ile İzmir, 36/2 (% 5.55) ile Uşak, 180/7 (% 3.88) ile Manisa ve 36/1 (% 2.77) oranı ile Denizli takip etmektedir.

E. coli O157:H7 izolatlarıyla yapılan antibiyogram testleri sonucunda izolatların Polimiksin B' ye % 100.00, Sefotaksime % 75.00, Norfloksasine % 59.38 oranlarında duyarlı; Kanamisine % 37.50 oranında orta derecede duyarlı; Ampisiline % 100.00, Sefalotine % 100.00, Kloramfenikole % 87.50, Sulfametoksazol-Trimetoprime % 81.25 ve Amoksisilin-Klavulonik aside % 62.50 oranlarında dirençli oldukları bulunmuştur. *E. coli* O157:H7 izolatları ile yapılan antibiyogram testlerinin sonuçları ise yanlış antibiyotik kullanımının ne kadar kötü sonuçlar doğurabileceğini düşündürmektedir. İzole edilen suşların Ampisilin ve Sefalotin gibi çok kullanılan antibiyotiklere % 100 oranında dirençli olması antibiyotik kullanımında daha dikkatli olunmasını gerektirmektedir. Polimiksin B ve Sefotaksim ise çalışma sonucunda kullanılmasını önerebileceğimiz antibiyotiklerdir.

Araştırmanın Ege Bölgesi' nde broiler piliçlerinden *E. coli* O157:H7 izole ve identifiye edildiği ilk çalışma olması bakımından önem taşıdığı düşünülmektedir. Dünya çapında tavuklarda yapılan araştırmaların da az sayıda olması bu etken yönünden tavukların kontaminasyon kaynağı olarak tanımlanmadığını anlatmaktadır. İnsan ve hayvan sağlığı açısından önemli bir zoonotik etken olan *E. coli* O157:H7 serotipinin

broiler piliçlerinde bulunması, gittikçe gelişen kanatlı sektörünün hijyen koşullarına ve kümeden sofraya kadar sağlıklı ürün üretme prensibine uygun olarak çalışması gerektiğini göstermektedir.

ÖZET

Broiler Piliçlerinden *Escherichia coli* O157:H7 Serotipinin İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Bu çalışmada, İzmir, Aydın, Manisa, Denizli ve Uşak illerinde bulunan fason broiler kümeslerindeki piliçlerden *E. coli* O157:H7 identifikasyonu amacıyla 500 adet kloakal svap örneği alındı.

Bu araştırmada, 500 adet kloakal svap örneğinin 32 (% 6.40)'sinden *Escherichia coli* O157:H7 serotipi identifiye edilmiştir. Ayrıca örneklerin 128 (% 25.60)' inden diğer *E. coli* türleri, 75 (% 15)' inden *Klebsiella sp.*, 193 (% 38.60)' ünden *Proteus sp.*, 38 (% 7.60)' inden *Pseudomonas sp.* identifiye edilmiş, 34 (% 6.80)' ünde ise bakteriyel üreme şekillenmemiştir.

Araştırmada, örneklerden izole edilen *E. coli* O157:H7 suşlarının illere göre toplam örnek sayısına oranları Aydın 108/13 (% 12.04), İzmir 140/9 (% 6.43), Uşak 36/2 (% 5.55), Manisa 180/7 (% 3.88) ve Denizli 36/1 (% 2.77) olarak belirlenmiştir.

E. coli O157:H7 izolatlarıyla yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda izolatların Polimiksin B' ye % 100.00, Sefotaksime % 75.00, Norfloksasine % 59.38 oranlarında duyarlı; Kanamisine % 37.50 oranında orta derecede duyarlı; Ampisiline % 100.00, Sefalotine % 100.00, Kloramfenikole % 87.50, Sulfametoksazol-Trimetoprim % 81.25, Eritromisine % 81.25 ve Amoksisilin-Klavulonik aside % 62.50 oranlarında dirençli oldukları bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *E. coli* O157:H7, broiler, izolasyon, identifikasyon, antibiyotik

SUMMARY

The Identification and Antibiotic Sensibility of *E. coli* O157:H7 in Broiler Chickens

In this study, 500 cloacal swaps have been picked up from broiler chickens at subconstructor houses of “Abalıoğlu Feed, Soybean and Textile” company at İzmir, Aydın, Manisa, Denizli and Usak in order to identification of *E. coli* O157:H7.

Escherichia coli O157:H7 serotype were identified from 32 pieces (6.40%) of the total 500 cloacal swaps. In addition, 128 (25.60%) other *E. coli* strains, 75 (15.00%) *Klebsiella sp.*, 193 (38.60%) *Proteus sp.*, 38 (7.60%) *Pseudomonas sp.* are also identified, but, 34 (6.80%) of the samples were not have any bacterial growth.

Percentage of the isolated *E. coli* O157:H7 from the total samples taken from the cities are as : Aydın 108/13 (12.04%), İzmir 140/9 (6.43%), Usak 36/2 (5.55%), Manisa 180/7 (3.88%) and Denizli 36/1 (2.77%) .

Antimicrobial sensitivity test results with *E. coli* O157:H7 isolates resulted that the isolates are sensitive 100.00% to Polymyxin B, 75.00% to Cefotaxime, 59.38% to Norfloxacin; semi sensitive 37.50% to Kanamycin; resistant 100.00% to Ampicillin, 100.00% to Cephalothin, 87.50% to Chloramphenicol, 81.25% to Sulphamethoxazole-Trimethoprim, 81.25% to Erythromycine and 62.50% to Amoxycillin-Clavulanic acid.

Key Words: *E. coli* O157:H7, broiler, isolation, identification, antibiotics

KAYNAKLAR

Abdul-Raouf UM, Beuchat LR, Ammar MS (1993) *Survival and growth of Escherichia coli O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants and temperature*, Applied and Environmental Microbiology, 59(8): 2364-2368.

Akkuş F (1996) *Hazır siğir kıymalarında verotoksin oluşturan Escherichia coli O157:H7 izolasyonu*. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.

Aksu H, Arun Ö, Aydın A, Uğur M (1999) *E. coli O157:H7'nin hayvansal kökenli gıda maddelerinde varlığı*, Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 30(2): 77-81.

Alişarlı M, Akman HN (2004) *Perakende satılan kıymaların Escherichia coli O157 yönünden incelenmesi*, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 15 (1-2): 65-69.

Allen-Vercoe E, Woodward MJ (1999) *Colonisation of the chicken caecum by afimbriate and aflagellate derivatives of Salmonella enterica serotype Enteritidis*, Veterinary Microbiology, 69: 265-275.

Anonymous (1998) *Singlepath E. coli O157:H7*, Leaflet Merck Microbiology W120 133 081 198 E. Merck Company Darmstad.

Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Akay Ö (1992) *Özel mikrobiyoloji epidemiyoloji, bakteriyel ve mikotik infeksiyonlar*, Atatürk Üniversitesi Yayın No: 741, Ders kitapları serisi No: 1, Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum.

Aslantaş Ö, Yıldız P (2002) *Kars yöresinde hayvansal gıda kaynaklı E. coli O157:H7 izolasyonu*, Veteriner Bilim Dergisi, 18: 107-111.

Baran F, Gülmez M (2002) *The occurrence of Escherichia coli O157:H7 in the ground beef and chicken drumsticks*, Internet Journal of Food Safety, 2 : 13-15.

Barret TJ, Kaper JB, Jerse AE, Wachsmuth IK (1992) *Virulence factors in Shiga-like toxin-producing Escherichia coli isolated from humans and cattle*, Journal of Infection Disease, 165: 979–980.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966) *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*, American Journal of Clinical Pathology, 45: 493-496.,

Bauer ME, Welch RA (1996) *Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7*, Infection and Immunity, 64:167–175.

Berry JT, Doyle MP, Schoeni JL (1985) *Colonization of chicken cecae by Escherichia coli associated with hemorrhagic colitis*, Applied Environmental Microbiology, 49: 310-315.

Bennett AR, Macphee S, Betts RP (1995) *Evaluations of methods for the isolation and detection of Escherichia coli O157 in minced beef*, Letters in Applied Microbiology, 20: 375-379.

Best A, La Ragione RM, Cooley WA, O'Connor CD, Velge P, Woodward MJ (2003) *Interaction with avian cells and colonisation of specific pathogen free chicks by Shiga-toxin negative Escherichia coli O157:H7 (NCTC 12900)*, Veterinar Microbiology, 93: 207–222.

Best A, La Ragione RM, Sayers AR, Woodward MJ (2004) *Role for flagella but not intimin in the persistent infection of the gastrointestinal tissues of specific-pathogen-free chicks by shiga toxin-negative Escherichia coli O157:H7*, Infection and Immunity, p. 1836–1846.

Bettelheim KA, Evangelidis H, Pearce JL, Sowers E, Strockbine NA (1993) *Isolation of a Citrobacter freundii strain which carries the Escherichia coli O157 antigen*, Journal of Clinical Microbiology, 31: 760–761.

Bettelheim KA, Whipp M, Djordjevic SP, Ramachadran V (2002) *First isolation outside Europe of sorbitol-fermenting verocytotoxigenic Escherichia coli (VTEC) belonging to O group O157*, Journal of Medical Microbiology, 51: 713–714.

Beutin L, Montenegro MA, Orskov I, Orskov F, Prada J, Zimmermann S, Stephan R (1989) *Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of Escherichia coli*, Journal of Clinical Microbiology, 27: 2559–2564.

Bielaszewska M, Schmidt H, Karmanlı MA, Khakhria R, Janda J, Blahova K, Karch H (1998) *Isolation and characterization of sorbitol-fermenting shiga toxin (verocytotoxin)-*

producing Escherichia coli O157:H2 strains in the Czech Republic, Journal of Clinical Microbiology, 36: 2135–2137.

Bilge SS, Apostol JM, Aldape ME, Moseley SL (1993) *Mrna processing independent of RNase III and RNase E in the expression of the F1845 fimbrial adhesin of Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 90: 1455–1459.

Bilge SS, Clause CR, Lau W, Moseley SL (1989) *Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated Escherichia coli to HEP-2 cells*, Journal of Bacteriology, 171: 4281–4289.

Blackburn CW, Maccharty JD (2000) *Modifications to methods for the enumeration and detection of injured Escherichia coli O157:H7 in foods*, International Journal of Food Microbiology, 55(1-3): 285-290.

Blais BW, Booth RA, Phillippe LM, Yamazaki H (1997) *Effect of temperature and agitation on enrichment of Escherichia coli O157:H7 in ground beef using modified EC broth with novobiocin*, International Journal of Food Microbiology, 36(2-3): 221-225.

Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J (1997) *Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by Escherichia coli strains isolated from septicemic and healthy chickens: Relationship with in vivo pathogenicity*, Journal of Clinical Microbiology, 35/11: 2953-2957.

Blanco JE, Blanco M, Mora A, Jansen WH, Garcia V, Vazquez ML, Blanco J (1998) *Serotypes of Escherichia coli isolated from septicaemic chickens in Galicia (northwest Spain)*, Veterinar Microbiology, 61: 229–235.

Boer ED, (1999) *Methods for shiga toxin-producing Escherichia coli*, Journal of Applied Microbiology, 87/1: 19.

Boer ED, Heuvelink AE (2000) *Methods for the detection and isolation of shiga toxin-producing Escherichia coli*, Society for Applied Microbiology Symposium Series, 29: 133-143.

Burnens AP, Frey A, Lior H, Nicolet J (1995) *Prevalence and clinical significance of Vero-toxin-producing Escherichia coli (VTEC) isolated from cattle in herds with and without calf diarrhoea*, Journal of Veterinary Medicine, 42: 311–318.

Chart H, Cheasty T, Cope D, Gross RJ, Rowe B (1991) *The serological relationship between Yersinia enterocolitica O9 and Escherichia coli O157 using sera from patients with yersiniosis and haemolytic uraemic syndrome*, Epidemiology and Infection, 107: 349-56.

Carter AO, Borczyk AA, Carlson JA, Harvey B, Hockin JC, Karmali MA, Krishnan C, Korn DA, Lior H (1987) *A severe outbreak of Escherichia coli O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home*, The New England Journal of Medicine, 317: 1496–1500.

Cebiroğlu H, Uğur M (1999) *Dondurulmuş hamburger köfte ve diğer köfte çeşitlerinde enterohemorajik E. coli O157:H7 suşunun varlığı üzerine araştırmalar*, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Dergisi, 25(1): 107-121.

Centers For Disease Control and Prevention (1993) *Update: Multistate outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections from hamburgers-Western United State, 1992-1993*. Morbidity and Mortality, Weekly Report 42: 258-263.

Centers For Disease Control and Prevention (1996) *Outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice*, Morbidity and Mortality, Weekly Report 45: 44.

Chahed A, Ghafir Y, China B, Dierick K, De Zutter L, Piepard D, Daube G (2005) *Survey of the contamination of foodstuffs of animal origin by shigatoxin producing Escherichia coli serotype O157:H7 in Belgium from 1999 to 2003*, Euro Surveill, 10(3): 33-36.

Chapman PA, Cerdan Malo AT, Ellin M, Ashton R, Harkin MA (2001) *E.coli O157 in cattle, and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK*, International Journal of Food Microbiology, 64: 139-150.

Chapman PA, Siddons CA, Cerdan Malo AT, Harkin MA (2000) *A one year study of Escherichia coli O157:H7 in raw beef and lamb products*, Epidemiology and Infection, 124(2): 207-213.

Chapman PA, Siddons CA, Zadik P M, Jewes L (1991) *An improved selective medium for the isolation of Escherichia coli O157*, Journal of Medical Microbiology, 35(7): 110.

Clarke RC, Wilson JB, Read SC, Renwick S, Rahn K, Johnson RP, Alves D, Karmali MA, Lior H, McEven SA, Spika J, Gyles CL (1994). *Verocytotoxin-producing Escherichia coli (VTEC) in the food chain: preharvest and processing perspectives*, p. 17–24. In M. A. Karmali and A. G. Goglio (ed.), Recent advances in verocytotoxin-producing Escherichia coli infections. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.

Clavero MRS, Beuchat LR (1995). *Suitability of selective plating media for recovering heat or freeze stressed Escherichia coli O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef*, Applied Environmental Microbiology, 61: 3268-3273.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2007) *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, Seventeenth Informational Supplement M100-S17. CLSI, Pennsylvania, pp. 64-69.

Como-Sebetti K, Reagan KS, Alaire S, Parrot K, Simonds CM, Hrabow S (1997). *Outbreaks of Escherichia coli O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts-Michigan and Virginia, June-July 1997*, Morbidity and Mortality. Weekly Rep. 46: 741-744.

Conner DE, Hall GS (1994). *Efficacy of selected media for recovery of E. coli O157:H7 from frozen chicken meat containing sodium chloride, sodium lactate or polyphosphate*, Food Microbiology, 11: 337-344.

Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B (1979). *An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes*, Current Microbiology, 3: 95-99.

Cutter CN (2000). *Antimicrobial effect of herb extracts against Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium associated with beef*, Journal of Food Protection, 63(5): 601-607.

Dell'Omo G, Morabito S, Quondam R, Agrimi U, Ciuchini F, Macri A, Caprioli A (1998). *Feral pigeons as a source of verocytotoxin-producing Escherichia coli*, Veterinary Record, 142: 309-310.

Dho M, Fairbrother JM (1999). *Avian pathogenic E. coli*, Veterinary Research, 30: 299-316.

Donnenberg MS, Kaper JB, Finlay BB (1997). *Interactions between enteropathogenic Escherichia coli and host epithelial cells*, Trends in Microbiology, 5: 109-114.

Dorn CR, Angrick EJ (1991). *Serotype O157:H7 Escherichia coli from bovine and meat sources*, Journal of Clinical Microbiology, 29: 1225-1231.

Doyle MP (1991). *Escherichia coli O157:H7 and its significance in foods*, International Journal of Food Microbiology, 12: 289-302.

Doyle MP, Schoeni JL (1984). *Survival and growth characteristics of Escherichia coli associated with hemorrhagic colitis*, Applied Environmental Microbiology, 48(4) : 855-856.

Doyle MP, Schoeni JL (1987). *Isolation of Escherichia coli O157:H7 from retail fresh meats and poultry*, Applied Environmental Microbiology, 53: 2394-2396.

Doyle MP, Zhao T, Meng J, Zhao S (1997). *Escherichia coli O157:H7*. In "Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, Eds M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville. ASM Press Washington D.C. 768 p". pp 171-191.

Duffy G, Whiting RC, Sheridan JJ (1999). *The effect of competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of Escherichia coli O157:H7*, Food Microbiology, 16: 299-307.

Dupont HL, Formal SB, Hornick RB, Snyder MB, Liboati JB, Sheahan DG, Labrec EH, Kalas JP (1971). *Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea*, The New England Journal of Medicine, 285:1-9.

Dytoc M, Soni R, Cockerill III F, De-Azavedo J, Louie M, Brunton J, Sherman P (1993). *Multiple determinants of verotoxin-producing Escherichia coli O157:H7 attachment-effacement*, Infection and Immunity, 61:3382–3391.

Erganiş O, Orhan G, Kaya O, Uçan S, Kuyucuoğlu Y (1992). *Kolibasillosisli tavuklardan izole edilen Escherichia coli'lerde Tip 1 pilus tiplendirmesi*, Veterinarium, 3: 7-12.

Escherich T (1989). *The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant*, 1885. Reviews in Infectious Diseases, 11(2): 352-6.

Fach P, Perelle S, Grout J, Dilasser F (2003). *Comparison of different tests for detecting Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 and development of an ELISA- assay for specific identification of the bacteria*, Journal of Microbiological Methods, 55: 383– 392.

Fairbrother JM, Nadeau E (2006) *Escherichia coli: on-farm contamination of animals*, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 25(2): 555-569.

Faith NG, Shere JA, Brosch R, Arnold KW, Ansay SE, Lee MS, Luchansky JB, Kaspar CW (1996). *Prevalence and clonal nature of Escherichia coli O157:H7 on dairy farms in Wisconsin*, Applied Environmental Microbiology, 62: 1519–1525.

Farmer III JJ, Davis BR (1985). *H7 Antiserum-Sorbitol Fermentation Medium: A single tube screening medium for detecting Escherichia coli O157:H7 associated with haemorrhagic colitis*, Journal of Clinical Microbiology, 22: 620-625.

FDA Bacteriological Analytical Manual 8th Edition/1995, Chapter 4. *Escherichia coli and the Coliform Bacteria*, page 4.20: Isolation Methods for Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC).

Feng PCS, Hartman PA (1982). *Fluorogenic assays for immediate confirmation of Escherichia coli*, Applied Environmental Microbiology, 43:1320-1329.

Feng PCS, Lum R, Chang G (1991). *Identification of uidA gene sequence in beta-D-glucuronidase negative Escherichia coli*, Applied Environmental Microbiology, 57: 320-323.

Feng PCS, Monday SR (2000). *Multiplex for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic Escherichia coli serotypes*. Molecular and Cellular Probes, 14:333-337.

Fischer JR, Zhao T, Doyle MP, Goldberg MR, Brown CA, Sewell CT, Kavanaugh DM, Bauman CD (2001). *Experimental and field studies of Escherichia coli O157:H7 in white-tailed deer*, Applied Environmental Microbiology, 67: 1218–1224.

Francis DH, Collins JE, Duimstra JR (1986). *Infection of gnotobiotic pigs with an Escherichia coli O157:H7 strain associated with an outbreak of hemorrhagic colitis*, Infection and Immunity, 51: 953–956.

Fujisawa T, Sata S, Aikawa K, Takahashi T, Yamai S, Shimada T (2000). *Modification of sorbitol MacConkey medium containing cefixime and tellurite for isolation of Escherichia coli O157:H7 from radish sprouts*, Applied Environmental Microbiology, 66(7): 3117–3118.

Galland JC, Hyatt DR, Crupper SS, Acheson DW (2001). *Prevalence, antibiotic susceptibility, and diversity of Escherichia coli O157:H7 isolates from longitudinal study of beef cattle feedlots*, Applied Environmental Microbiology, 67: 1619-1627.

Garrity GM, Brnner DJ, Krieg NR, Staley JT (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition*. The Proteobacteria Published Springer, New York, USA.

Griffin PM, Bell PB, Cieslak PR, Tuttle J, Barrett TJ, Doyle MP, McNamara AM, Shefer AM, Wells JG (1994). *Large outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections in the Western United States: the big picture*, p. 7–12. In M. A. Karmali and A. G. Goglio

(ed.), Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.

Griffin PM, Tauxe RW (1991). *The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157:H7, other enterohemorrhagic E. coli and the associated hemolytic uremic syndrome*, Epidemiology Reviews, 13:60-98.

Gross WB (1994). In: Gyles, C. L. (Ed.), *Escherichia coli in domestic animals and humans*, CAB International, Wallingford, pp. 237-259.

Gülhan T (2003). *Sağlıklı görünen hayvanların dışkılarından izole edilen Escherichia coli suşlarının biyokimyasal, enterotoksijenik ve verotoksijenik özelliklerinin belirlenmesi*, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 14 (1): 102-109.

Halkman AK, Noveir MR, Doğan HB (1998). *Çeşitli hayvansal gıda ürünlerinde E. coli O157:H7 aranması*, TÜBİTAK-VHAG-1192 Nolu Proje. Ankara .

Halkman AK, Noveir MR, Doğan HB (2001). *Escherichia coli O157:H7 serotipi*, A. Ü. Ziraat Fak., Gıda Mühendisliği Bölümü Ankara. Sim Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara.

Hancock DD, Besser TT, Kinsel ML, Tarr PI, Rice DH, Paros MG (1994). *The prevalence of Escherichia coli O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State*, Epidemiology and Infection, 113:199–207.

Hara-Kudo Y, Ikedo M, Kodaha H, Nakagawa H, Goto K, Masuda T, Konuma H, Kojima T, Kumagai S (2000). *Selective enrichment with a resuscitation step for isolation of freeze-injured Escherichia coli O157:H7 from foods*. Applied Environmental Microbiology, 66(7) : 2866-2877.

Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis TM, Boer ED (1997). *Evaluation of media and test kits for the detection and isolation of Escherichia coli O157 from minced beef*, Journal of Food Protection, 60(7): 817-824.

Hicks S, Frankel G, Kaper JP, Dougan G, Phillips AD (1998). *Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic Escherichia coli adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro*, Infection and Immunity, 66: 1570-1578.

Hill WE, Datta AR, Feng P, Lampel KA, Payne WL (1998). *Identification of foodborne bacterial pathogens by gene probes*, In, Bacteriological Analytical Manual (BAM) 6th Ed. US Food and Drug Administration. Published and Distributed by AOAC, Virginia. 31 Bölüm + 3 Ek.

Hill WE, Jinneman KC, Trost PA, Bryant JL, Bond J, Wekell MM (1993). *Multiplex polymerase chain reaction detection of Shiga-like toxin genes in Escherichia coli*, FDA LIB 3811.

Hitchins AD, Feng P, Watkins WD, Rippey SR, Chandler LA (1998). *Escherichia coli and the coliform bacteria*, In, Bacteriological Analytical Manual (BAM) 6th Ed. US Food and Drug Administration. Published and Distributed by AOAC, Virginia. 31 Bölüm + 3 Ek, bölüm 4.

Hornitzky MA, Mercieca K, Bettelheim KA, Djordjevic SP (2005). *Bovine feces from animals with gastrointestinal infections area source of serologically diverse atypical enteropathogenic Escherichia coli and Shiga toxin-producing E. coli strains that commonly possess intimin*, Applied Environmental Microbiology, July 2005, p. 3405–3412.

Hudson JA, Nicol C, Capill J, Bennett J (2000). *Isolation of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) from foods using EHEC agar*, Letters in Applied Microbiology, 30(2): 109-113.

Itoh Y, Sugita-Konishi Y, Kasuga F, Iwaki M, Hara-Kuda Y, Saito N, Noguchi Y, Konuma H, Kumagai S (1998). *Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 present in radish sprouts*, Applied Environmental Microbiology, 64:1532-1535.

Johnson JL, Brooke CL, Fritschel SJ (1998). *Comparison of the BAX for screening/E. coli O157:H7 method with conventional methods for detection of extremely low levels of Escherichia coli O157:H7 in ground beef*, Applied and Environmental Microbiology, 64(11): 4390–4395.

Johnson WM, Lior H, Bezanson GS (1983). *Cytotoxic Escherichia coli O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada*, Lancet i:76.(Letter.)

Karch H, Heesemann J, Laufs R, O'Brien AD, Tacket CO, Levine MM, (1987). *A plasmid of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells*, Infection and Immunity, 55: 455–461.

Karmali MA (1989). *Infection by verotoxin-producing Escherichia coli*, Clinical Microbiology Reviews, 2:15-38.

Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Steele BT (1983). *Escherichia coli cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis*, Lancet ii:1299–1300.

Kauffmann F (1947). *The serology of the Coli group*, Journal of Immunology, 57: 71-100.

Kenny B, Devinney R, Stein M, Rheinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB (1997). *Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells*, Cellular Microbiology, 91: 511–520.

Khan A, Das SC, Ramamurthy T, Sikdar A, Khanam Y, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB (2002). *Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular profiles of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates from diverse sources in Calcutta, India*, Journal of Clinical Microbiology, 40: 2009-2015.

Kijima-Tanaka M, Ishihara K, Kojima A, Morioka A, Nagata R, Kawanishi M, Nakazawa M, Tamura Y, Takahashi T (2005). *A national surveillance of Shiga toxin-producing Escherichia coli in food-producing animals in Japan*, Journal of Veterinary Medicine, 52: 230–237 .

Kim H, Samadpour M, Grimm L, Clausen J, Besser T, Baylor M, Kobayashi J, Neill ML, Schoenknecht F, Tarr P (1994). *Characteristics of antibiotic-resistant Escherichia coli O157:H7 in Washington State, 1984–1991*, Journal of Infectious Diseases, 170:1606–1609.

Kim JY, Kim SH, Kwon NH, Bae WK, Lim JY, Koo HC, Kim JM, Noh KM, Jung WK, Park KT, Park YH (2005). *Isolation and identification of Escherichia coli O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex and RAPD*, Journal of Veterinary Sciences, 6(1): 7-19.

Kleanthous H, Fry NK, Smith HR, Gross RJ (1988). *The use of sorbitol MacConkey agar in conjunction with a specific antiserum for the detection of cytotoxin producing strains of Escherichia coli O157*, *Epidemiology and Infection*, 101:327-335.

Kobayashi H, Pojhanvirta T, Pelkonen S (2002). *Prevalence and characteristics of intimin- and shiga toxin-producing Escherichia coli from gulls, pigeons and broilers in Finland*, *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(11):1071-1073.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr (1997) *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology (fifth edition)*, Ed. by Andrew Allen. 1307,1371. Lippincott-Raven Publishers Philadelphia.

Knutton S, Baldwin K, Williams BH, McNeisch AS (1989). *Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli*, *Infection and Immunity*, 57: 1290–1298.

La Ragione RM, Sayers AR, Woodward MJ (2000). *The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of Escherichia coli O78:K80 in the day-old-chick model*, *Epidemiology and Infection*, 124:351– 363.

Lai LC, Wainwright LA, Stone KD, Donnenberg MS (1997). *A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic Escherichia coli pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells*, *Infection and Immunity*, 65: 2211–2217.

Law D, Kelly J (1995). *Use of heme and hemoglobin by Escherichia coli O157 and other Shiga-like-toxin-producing E. coli serogroups*, *Infection and Immunity*, 63: 700–702.

Le Saux N, Spika JS, Friesen B, Johnson I, Melnychuk D, Anderson C, Dion R, Rahman M, Tostowarky W (1993). *Ground beef consumption in non-commercial settings is a risk factor for sporadic Escherichia coli O157:H7 infection in Canada*, *Journal of Infectious Diseases*, 167:500–502.

Lewine MM, McEwen J, Losonsky G, Reymann M, Harari I, Brown JE, Taylor DN, Donohue-Rolf A, Cohen D, Bennish M, Lim YL, Arnon R (1992). *Antibodies to Shiga holotoxin and to two synthetic peptides of the B. subunit in sera of patients with Shigella dysenteriae 1 dysentery*, Journal of Clinical Microbiology, 30:1636–1641.

Lior H, Borczyk AA (1987). *False positive identifications of Escherichia coli O157*, Lancet i:333. (Letter).

Ludwig K, Sarkim V, Bitzan M, Karmali MA, Bobrowski C, Ruder H, Laufs R, Sobottka I, Petric M, Karch H, Muller-Wiefel DE (2002). *Shiga toxin-producing Escherichia coli infection and antibodies against Stx2 and Stx1 in household contacts of children with enteropathic hemolytic-uremic syndrome*, Journal of Clinical Microbiology, 40(5): 1773–1782.

March SB, Ratnam SJ (1986). *Sorbitol MacConkey medium for detection of Escherichia coli O157:H7 associated with hemorrhagic colitis*, Journal of Clinical Microbiology, 23: 869-872.

March SB, Ratnam SJ (1989). *Latex agglutination test for detection of Escherichia coli serotype O157*, Journal of Clinical Microbiology, 27:1675–1677.

Martin ML, Shipman LD, Potter ME, Wachsmuth IK, Wells JG, Hedberg K, Tauxe RV, Davis JP, Arnoldi J, Tilleli J (1986). *Isolation of Escherichia coli O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome*, Lancet ii:1043.

Masalmeh MA, Youssef U, Silber R (1990). *Characterization of hemolytic Escherichia coli isolated from diarrhoeic dogs and cats*, Wiener Tierärztliche Monatsschrift, 77: 254-258.

McDaniel TK, Kaper JB (1997). *A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacing phenotype on E. coli K-12*, Molecular Microbiology, 23:399–407.

McKee ML, O'Brien AD (1995). *Investigation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern shared by intestinal E. coli*, Infection and Immunity, 63: 2070–2074.

Mehlman IJ, Romero A, Atkinson JC, Aulisio C, Sanders AC, Campbell W, Cholenski J, Ferreira J, Forney E, O'Brian K, Palmieri M, Weagant S (1982). *Detection of invasiveness of mammalian cells by Escherichia coli: collaborative study*, J Association of Official Analytical Chemists, 65:602-7.

Nataro JP, Kaper JB (1998). *Diarrheagenic Escherichia coli*, Clinical Microbiology Reviews, 11: 142–201.

Nielsen EM, Scheutz F (2002). *Characterisation of Escherichia coli O157 isolates from Danish cattle and human patients by genotyping and presence and variants of virulence genes*, Veterinary Microbiology, 88: 259–273.

Noveir MR, Halkman AK (2000). *A study on selective broths and agar media for the isolation of Escherichia coli O157:H7 serotype*, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 24: 459-464.

Okrend AJG, Rose BE, Bennett BA (1990). *A screening method for the isolation of Escherichia coli O157:H7 from ground beef*, Journal of Food Protection, 53: 249-252.

Okrend AJG, Rose BE, Lattuda CP (1990). *Use of 5-bromo-4 chloro-3-indoxy- β -D-glucuronide in sorbitol MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of Escherichia coli O157:H7 from ground beef*, Journal of Food Protection, 53(11): 941-943.

Olsvic O, Wasteson Y, Lund A, Hornes E (1991). *Pathogenic Escherichia coli found in food*, International Journal of Food Microbiology, 12:103-114.

Onoue Y, Konuma H, Nakagawa H, Hara-Kudo Y, Fujita T, Kamagai S (1999). *Collaborative evaluation of detection methods for Escherichia coli O157:H7 from radish sprout and ground beef*. International Journal of Food Microbiology, 46:27-36.

Özbaş Y, Aytaç A (1995). *Escherichia coli O157:H7 epidemiyolojisi, gıdalarla ilişkisi, patojenitesi ve izolasyon yöntemleri*, Türk Hıjyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 52(1): 47-53.

Pao S, Patel D, Kalantari A, Tritschler JP, Wildeus S, Sayre BL (2005). *Detection of Salmonella strains and Escherichia coli O157:H7 in feces of small ruminants and their isolation with various media*, Applied and Environmental Microbiology, 71(4): 2158–2161.

Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Vinas MR, Blanco M, Padola NL, Etcheverria TL (2000). *Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic Escherichia coli isolated from cattle and foods in Argentina*, European Journal of Epidemiology, 16: 757-762.

Park S, Worobo R, Durst R (1999). *Escherichia coli O157:H7 As an emerging foodborne pathogen : A literature review*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 39(6): 481-502.

Paton JC, Paton AW (1998). *Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing Escherichia coli infections*, Clinical Microbiology Reviews, 11: 450–479.

Paton AW, Paton JC (1999). *Direct detection of shiga toxigenic Escherichia coli strains belonging to serogroups O111, O157 and O113 by multiplex*, Journal of Clinical Microbiology, 37(10) : 3362-3365.

Perry MB, Bundle DR (1990). *Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of Escherichia hermannii strains with those of Escherichia coli O157:H7, Brucella melitensis, and Brucella abortus*, Infection and Immunity, 58: 1391–1395.

Radu S, Ling OW, Rusul G, Karim MIA , Nishibuchi M (2001). *Detection of Escherichia coli O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses*, Journal of Microbiological Methods, 46: 131-139.

Raghuuber EV, Matches JR (1990). *Temperature range for growth of Escherichia coli serotype O157:H7 and selected coliforms in E. coli medium*, Journal of Clinical Microbiology, 28: 803–805.

Rice EW, Sowers EG, Johnson CG, Dunnigan ME, Strockbine NA, Edberg SC (1992). *Serological cross-reactions between Escherichia coli O157 and other species of the genus Escherichia*, Journal of Clinical Microbiology, 30:1315–1316.

Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JB, Davis BR, Herbert RJ, Olcott GS, Johnson LM, Hargett NT, Blake PA, Cohen ML (1983). *Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype O157:H7*, The New England Journal of Medicine, 308:681-685.

Sakazaki R (1992). *Serotyping of diarrheagenic E. coli*, Media Circle, 34: 117.

Samadpour M, Ongerth JE, Liston J, Tran N, Nguyen D, Whittam TS, Wilson RA, Tarr PI (1994). *Occurrence of Shiga-like toxin-producing Escherichia coli in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington*, Applied Environmental Microbiology, 60: 1038–1040.

Sarımehtetoğlu B, Küplülü Ö, Kaymaz Ş (1998). *Hamburger ve inegöl köftelerinden Escherichia coli O157:H7 izolasyonu*, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 45:221-227.

Schmidt H, Karch H, Beutin L (1994). *The large-sized plasmids of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the E. coli alpha-hemolysin family*, FEMS Microbiological Letters, 117:189–196.

Schoeni JL, Doyle MP (1994). *Variable colonization of chickens perorally inoculated with Escherichia coli O157:H7 and subsequent contamination of eggs*, Applied Environmental Microbiology, 60: 2958–2962.

Schroeder C, Zhao C, Debroy C, Torcolini J, Zhao S, White D, Wagner D, McDermott P, Walker R, Meng J (2002). *Antimicrobial resistance of Escherichia coli O157 isolated from humans, cattle, swine, and food*, Applied Environmental Microbiology, 68: 576–581.

Scott TM, Parveen S, Portier KM, Rose JB, Tamplin ML, Farrah SF, Koo A, Lukasik J (2003). *Geographical variation in ribotype profiles of Escherichia coli isolates from humans, swine, poultry, beef, and dairy cattle in Florida*, Applied Environmental Microbiology, 60(2): 1089–1092.

Sherman P, Soni R, Karmali M (1988). *Attaching and effacing adherence of verotoxin-producing Escherichia coli to rabbit intestinal epithelium in vivo*, Infection and Immunity, 56: 756–761.

Sherman P, Soni R, Petric M, Karmali M (1987). *Surface properties of the Vero cytotoxin-producing Escherichia coli O157:H7*, Infection and Immunity, 55: 1824–1829.

Sihvonen L, Miettinen P (1985). *Rotavirus and enterotoxigenic Escherichia coli infections of calves on a closed Finnish dairy farm*, Acta Veterinaria Scandinavica, 26: 205-217.

Smith HR, Cheasty T, Roberts D, Thomas A, Rowe B (1991). *Examination of retail chickens and sausages in Britain for Vero Cytotoxin-Producing Escherichia coli*, Applied Environmental Microbiology, 57(7): 2091-2093.

Smith HR, Scotland SM (1993). *Isolation and identification methods for Escherichia coli O157 and other Vero cytotoxin producing strains*, Journal of Clinical Pathology, 46:10-17.

Sojka WJ, Carnaghan RBA (1961). *Escherichia coli infection in poultry*, Research in Veterinary Science, 2: 340-352.

Solmaz H, Aksakal A, Kaya A (2000). *Neonatal buzağılardan izole edilen Escherichia coli'lerin bazı özellikleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları*, Hayvancılık Araştırma Dergisi, 10, 1-2: 47-50.

Sowers EG, Wells JG, Strockbine NA (1996). *Evaluation of commercial latex reagents for identification of O157 and H7 antigens of Escherichia coli*, Journal of Clinical Microbiology, 34: 1286–1289.

Stavric S, Buchanan B, Gleeson TM (1993). *Intestinal colonization of young chicks with Escherichia coli O157:H7 and other verotoxin-producing serotypes*, Journal of Applied Bacteriology, 74: 557–563.

Sueyoshi M, Nakazawa M (1994). *Experimental infection of young chicks with attaching and effacing Escherichia coli*, Infection and Immunity, 62: 4066–4071.

Swerdlow DL, Woodruff BA, Brady RC, Griffin PM, Tippen S, Donnell HD, Geldreich E, Payne BJ, Neyer A, Wells JG, Greene KD, Bright M, Bean N, Blake PA (1992). *A waterborne outbreak in Missouri of Escherichia coli O157:H7 associated with bloody diarrhea and death*, *Annals of Internal Medicine*, 117: 812-819.

Szabo RA, Todd ECD, Jean A (1986). *A method to isolate Escherichia coli O157:H7 from food*, *Journal of Food Protection*, 49: 768-772.

Szabo RA, Todd ECD, Mackenzie J, Parrington L (1990). *Increased sensitivity of the rapid hydrophobic grid membrane filter enzyme-labeled antibody procedure for Escherichia coli O157 detection in food and bovine faeces*, *Applied Environmental Microbiology*, 56(11) : 3546-3549.

Thompson MR, Brandwein H, Labine-Racke M, Gianella RA (1984). *Simple and reliable enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies for detection of Escherichia coli heat-stable enterotoxins*, *Journal of Clinical Microbiology*, 20:59-64.

Thompson JS, Hodge DS, Borczyk AA (1990). *Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of Escherichia coli serotype O157*, *Journal of Clinical Microbiology*, 28:2165–2168.

Tobe T, Hayashi T, Han CG, Schoolnik GK, Ohtsubo E, Sasakawa C (1999). *Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic Escherichia coli adherence factor*, *Infection and Immunity*, 67: 5455-5462.

Trepeta RW, Edberg SC (1984). *Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide based medium for rapid isolation and identification of Escherichia coli*, *Journal of Clinical Microbiology*, 19:172-174.

Trochimchuk T, Fotgheringhama J, Topp E, Schraft H, Leung KT (2003). *A comparison of DNA extraction and purification methods to detect Escherichia coli O157:H7 in cattle manure*, *Journal of Microbiological Methods*, 54: 165– 175.

Tsen HY, Chi WR, Lin CK (1996). *Use of novel polymerase chain reaction primers for the specific detection of heat-labile toxin I, heat-stable toxin I and II enterotoxigenic Escherichia coli in milk*, *Journal of Clinical Microbiology*, 59: 795-802.

Tsuboi I, Ida H, Yoshikawa E, Hiyoshi S, Yamaji E, Nakayama I, Nonomiya T, Shigenobu F, Shimizu M, O'Hara K, Sawai T, Mizuoka K (1996). *Antibiotic susceptibility of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 isolated from an outbreak in Japan in 1996*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42: 431-432.

Tunail N (2000). *Mikrobiyel infeksiyonlar ve intoksikasyonlar*, Alınmıştır, "Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, Sim Matbaacılık Ltd. Ankara, 522 s". pp 81-184.

Tzipori S, Karch H, Wachsmuth IK, Robins-Browne RM, O'Brien AD, Lior H, Cohen ML, Smithers J, Levine MM (1987). *Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in gnotobiotic piglets*, Infection and Immunity, 55: 3117–3125.

Venkateswaran K, Kamijoh J, Ohashi E, Nakanishi H (1997). *A simple filtration technique to detect enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and its toxins in beef by multiplex PCR*, Applied Environmental Microbiology, 63(10): 4127-4131.

Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Ray-Gueniot S, Boutrand-Loei S, Meyrand A, Richard Y (1997). *Detection of Escherichia coli O157 in French food samples using an immunomagnetic separation method and the VIDAS E. coli O157*, Letters in Applied Microbiology, 25: 442-6.

Wadolowski EA, Burris JA, O'Brien AD (1990). *Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7*, Infection and Immunity, 58: 2438–2445.

Wallace JS, Cheasty T, Jones K (1997). *Isolation of Vero cytotoxin-producing Escherichia coli O157 from wild birds*, Journal of Applied Microbiology, 82: 399-404.

Weagant SD, Bryant JL, Jinneman KG (1995) *An improved rapid technique for isolation of Escherichia coli O157:H7 from foods*, Journal of Food Protection, 58: 7-12 .

Weagant SD, Jinneman KG, Wetherington JH (2000). *Use of multiplex polymerase chain reaction for identification of enterotoxigenic Escherichia coli*. Food and Drug Administration Laboratory Information Bulletin, 4227.

Wilkerson C, Samadpour M, Van Kirk N, Roberts MC (2004). *Antibiotic resistance and distribution of tetracycline resistance genes in Escherichia coli O157:H7 isolates from humans and bovines*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48: 1066–1067.

Willshaw GA, Smith HR, Roberts D, Thirlwell J, Cheasty T, Rowe B (1993). *Examination of raw beef products for the presence of Vero cytotoxin producing Escherichia coli, particularly those of serogroup O157*, Journal of Applied Microbiology, 75: 420-6.

Zadik PM, Chapman PA, Siddons CA (1993). *Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic Escherichia coli O157*, Journal of Medical Microbiology, 39: 155-158.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında İzmir’ de doğdu. Lise öğrenimini 1997 yılında Bornova Anadolu Lisesi Almanca Bölümünde tamamladı. 1997 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi’ni kazandı ve 2002 yılında mezun oldu. 2002 ve 2004 yılları arasında küçük hayvan kliniği ve devekuşu üretim çiftliğinde çalıştı. 2004 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora yapmaya hak kazandı. Doktora Programı sırasında Abalıoğlu Yem Soya Tekstil A.Ş.’ de çalışmaya başladı ve halen bu şirkette Ar-Ge uzmanı olarak çalışmaktadır.

Evli ve bir çocuk annesidir. Almanca ve ingilizce bilmektedir.

TEŞEKKÜR

Doktora tez konusunun seğimi ve ęalıŐmaların y¼r¼t¼lmesinde yardımlarını esirgemeyen, tez danıŐmanım Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fak¼ltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı BaŐkanı Prof. Dr. Osman KAYA`ya ve ęalıŐmalarımda desteklerini g¼rd¼ę¼m hocam Yrd. Doğ. Dr. Ő¼kr¼ KIRKAN, Araştırma G¼revlisi Serten TEKBIYIK, t¼m Anabilim Dalı Öğretim yeleri ve Araştırma G¼revlilerine, Abalıoğlu Yem Soya Tekstil A.Ő. ęalıŐma arkadaşlarıma, ayrıca tezimin her aŐamasında manevi desteğini esirgemeyen eŐim G¼rhan DURSUN` a ve t¼m aileme teşekkür ederim.