



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MB-YL-2008-0004

**EGE BÖLGESİNDEKİ SIĞIRLARIN SÜT VE DIŞKI
ÖRNEKLERİNDEN *ESCHERİCHIA COLI* O157:H7
İZOLASYONU VE VEROTOKSİNLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Gıda Müh. Erdem ÇİÇEK

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Serap SAVAŞAN**

AYDIN - 2008

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MB-YL-2008-0004

**EGE BÖLGESİNDEKİ SIĞIRLARIN SÜT VE DIŞKI
ÖRNEKLERİNDEN *ESCHERİCHIA COLI* O157:H7
İZOLASYONU VE VEROTOKSİNLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Gıda Müh. Erdem ÇİÇEK

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

AYDIN - 2008

ÖNSÖZ

E.Coli, günümüzde bir çok infeksiyona yol açan suşları ile en zararlı patojenler arasında gösterilmektedir. E.Coli O157:H7, insanlarda kanlı veya kansız diyare, hemorajik kolitis, hemolitik üremik sendrom ve trombotik trombositopenik purpura olarak tanımlanan ciddi ve genellikle letal etkili infeksiyonlara neden olarak son yıllarda adından sıkça söz ettirmektedir. Ruminantlar özellikle sığırlar ve genç süt inekleri, STEC'nin ve özellikle *E. coli* O157:H7'nin birincil rezervuarı olarak kabul edilmektedir. *E. coli* O157:H7; Vero hücre kültürlerine sitotoksik etkili verotoksinler (Vt 1 ve Vt 2) üretmektedirler. Bu toksinlerin EHEC suşlarının insanlardaki virulansi açısından önemli roller üstlendiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, Ege bölgesinde bulunan sığırlardan alınan süt ve dışkı örneklerindeki *E. coli* O157:H7 bakterisinin varlığı ve verotoksin üretip üretmediği belirlenmiştir. *E. coli* O157:H7'nin insanlar için patojen olması ve dünyada letal etkili bir çok salgına yol açması nedeniyle, sunulan bu çalışmanın, Türkiye'de farklı bölgelerde bulunan sığırlarda yapılabilecek *E. coli* O157:H7 izolasyonuna ve verotoksin belirlenmesine yönelik diğer çalışmalara faydalı olabileceği düşünüldü.

Çalışmamız; Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (VTF-07-12 nolu proje) tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
1.GİRİŞ	1
2.GEREÇ VE YÖNTEM	19
2.1. Kullanılan Besiyerleri	19
2.1.1. Ön Zenginleştirme Besiyeri	19
2.1.2. Selektif Diferansiyel Besiyeri	20
2.2. Solüsyonlar	20
2.2.1. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)	20
2.2.2. Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS)	20
2.3. Standart Suş	21
2.4. Dışkı ve Süt Örnekleri Alımı	21
2.5.1. Dışkı Örnekleri için Ön Zenginleştirme	21
2.5.2. Süt Örnekleri için Ön Zenginleştirme	22
2.6. Selektif Diferansiyel Katı Besiyerine Ekim	22
2.7. İdentifikasyon	23
2.8. Biyokimyasal Testler	23
2.9. Lateks Aglütinasyon Testi	24
2.10. H7 Antiserumu ile Serotip Belirlenmesi	24
2.11. VTEC-RPLA Kiti ile Toksin Belirlenmesi	24

3. BULGULAR	26
4. TARTIŞMA	30
5. SONUÇ	35
ÖZET	36
SUMMARY	37
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	46
TEŞEKKÜR	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 1	Diyarejenik <i>E. coli</i> suşlarının klasifikasyonu	3
Çizelge 2	1989-2202 yılları arasında gerçekleşen büyük <i>E. coli</i> O157:H7 salgınları	5
Çizelge 3	<i>E. coli</i> biyokimyasal özellikleri	7
Çizelge 4	Toplam örnek sayısı, izolasyon oranı ve verotoksin üreten <i>E.coli</i> O157:H7 sayısı	26
Çizelge 5	Örneklerden izole edilen <i>E. coli</i> O157:H7 suşlarının yaşa göre dağılımı	27
Çizelge 6	İzole edilen <i>E. coli</i> O157:H7 suşlarının API 20E test sonuçları	28

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 1	Gıda kaynaklı salgınların nedenleri	11
Şekil 2	Salgınların ortaya çıkma nedenleri	11
Şekil 3	CT-SMAC agarda sorbitol ve β -glukuronidaz negatif <i>E. coli</i> O157:H7 kolonileri	27
Şekil 4	E.coli suşlarının API 20E kitinde verdiği reaksiyonlar	28
Şekil 5	<i>E. coli</i> O157 Lateks Testi ve değerlendirilmesi	29
Şekil 6	<i>E. coli</i> O157:H7 toksin belirleme kiti ve değerlendirmesi	29

GİRİŞ

E. coli ilk olarak 1885 yılında Theo Bald Escherich tarafından ishalleri bir çocuğun dışkılarından izole edilerek *bacterium coli commune* adıyla tarif edilmiş, daha sonra bağırsak dışı infeksiyonlardaki patojenliği tanınmış, 1919 yılında Castellani ve Chalmer tarafından *Escherichia* cins adı önerilene kadar *bacterium coli* adı kullanılmıştır (Topçu ve ark. 2002, Serpen 2007).

Escherichia coli, *Enterobacteriaceae* familyasına ait *Escherichia* genusunun en önemli türüdür. 1,1-1,5 µ çapında 2,0-6,0 µ boyunda, Gram negatif ve sporsuz bir bakteridir. Peritrik kirpikleriyle hareketlidir, fakat hareketleri yavaştır. Hareketsiz suşları da vardır. Bazı suşları kapsüllü olan *E. coli* insan ve çoğu sıcakkanlı hayvanın doğal bağırsak florasında bulunmaktadır (Bekar 1997, Ünlütürk ve Turantaş 1998, Bilgehan 2004, Aydın ve Paracıkoğlu 2006). Toplam fekal floranın küçük bir bölümünü oluşturmasına rağmen insan bağırsağında baskın fakültatif anaerob türdür ve normalde simbiyotik olarak bulunur. Bunun yanı sıra patojenik özellik gösteren bazı *E. coli* suşları insanlarda birçok hastalığa neden olurlar (Dunn 2003). Özellikle üriner sistem infeksiyonları (ÜSİ)'nin %95 'inden fazlası tek bir bakteri türü tarafından meydana getirilmekte ve akut infeksiyonlardan en sık izole edilen etken *E. coli* olmaktadır (Akay ve ark. 2006).

E. coli serogrup, serotip ve biotiplere ayrılabilir. Serolojik sınıflandırma sisteminin temelini "O" ve "H" antijenleri oluşturur. O antijeni suşun serogrubunu, H antijeni ise serotipini belirler. Somatik O antijenleri lipopolisakkarit özelliğinde olup, ısıya dirençli yüzey antijenleridir ve aglütinasyon testi (makro veya mikro) ile ortaya konulabilirler. Isıya duyarlı flagellar H antijenleri ise protein yapısında olup hareketli suşlarda bulunur ve

yine aglütinasyon ile ortaya konulabilir. Bugüne kadar 174 O antijeni [O1-O181 (31,47,67, 72,93,94 ve 122 silinmiştir)] ve en az 53 serotip belirlenmiştir. Biotiplendirme ise biyokimyasal profile göre belirlenir (Cohem ve Powderly 2004, Aydın ve Paracıkoğlu 2006, Gyles 2006).

Kapsül taşıyan *E. Coli* suşlarında somatik O antijeni üzerinde polisakkarit özelliğinde kapsüler “K” antijeni bulunur. K antijenine göre de 100 e yakın sero grup tespit edilmiştir. Bu nedenle K antijeni taşıyan suşlar O antiserumu ile aglutine olmazlar. Ayrıca hücre duvarının fimbrialarında, protein yapısında, önceleri “K” antijeninin L fraksiyonu olarak adlandırılan Fimbrial (Pilus) antijenleri bulunmaktadır. Bu antijenler de “K” antijenleri gibi bir suşun “O” antijenine göre identifiye edilmesini önlerler. *E. Coli*'lerde bulunan bu antijenlerin saptanması özellikle enteropatojenik *E. Coli* (EPEC)'lerin belirlenmesinde önemli rol oynar. Çünkü bu piluslar *E.Coli*'lerin virülans faktörü olarak kabul edilmektedir. *E. Coli*'lerde bulunan “O”, “K” ve “H” antijenlerinin sentezi bakteri kromozomu tarafından yönetilmesine rağmen, fimbria antijenlerinin sentezi hem kromozom, hem de plazmidler aracılığı ile olmaktadır (Aydın ve Paracıkoğlu 2006).

E. coli'nin patojenik suşları, ishale yol açan infeksiyonlar, idrar yolları infeksiyonları, menenjit, septisemi gibi çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir. Endemik ve epidemik ishal dünyada morbidite ve mortalitenin 3 önemli nedeninden biridir ve her yıl 5 yaşın altında beş milyon çocuğun ölümüne sebep olmaktadır. WHO raporlarına göre Latin Amerika'da çocuk ölümlerinin % 20'si ishal sonucudur. Patojenik *E. coli* suşlarının da ishal vakalarında önemli bir yer tuttuğu belirtilmektedir (Franzolin ve ark. 2005, Orlandi ve ark. 2006).

İshale yol açan *E. coli* suşları, oluşturdukları infeksiyon ve serolojik farklılıkları göz önüne alınarak beş gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar; enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), entero-agregativ *E. coli* (EAggEC) ve enterohemorajik *E. coli* (EHEC)'dir (Ünlütürk ve Turantaş 1998, Kimato ve ark. 2005)(Çizelge 1). Ayrıca bazı araştırmacılar şigatoksijenik *E. coli*'yi de (STEC) bu gruplara dahil etmektedir (Franzolin ve ark. 2005).

Çizelge 1. Diyarejenik *E. coli* suşlarının klasifikasyonu (Kuntz ve Kuntz, 1999).

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

EPEC suşları, 1940-1950'li yıllarda A.B.D.'nde bebeklerde ölüm oranı % 50'ye ulaşan infeksiyonlara yol açmış ve günümüzde özellikle çocuklarda görülen bakteriyel diyarenin en önemli nedeni haline gelmiştir (Ünlütürk ve Turantaş 1998, Girard ve ark. 2005). ETEC suşlarının patojenitesinde ısıya-dirençli (ST) ve ısıya duyarlı (LT) iki enterotoksin rol oynar (Ünlütürk ve Turantaş 1998, Aydın ve Paracıkoğlu 2006). Bu enterotoksinlerin etkisiyle bağırsağa bol sıvı elektrolit salgılanması sonucu ishal gelişir (Ustaçelebi 1999).

ETEC suşları 2 farklı plazmid içerir. Birisi adhezyonu diğeri enterotoksin yapımını yönetir (Ustaçelebi 1999). İçerdiği plazmide bağlı olarak enterotoksinlerden birini veya her ikisini üretebilen ETEC suşları, evcil hayvanlarda intestinal hastalıklara, bebek ve çocuklarda ise ishale neden olabilmektedir. Sık olarak turist diyaresinden sorumlu bir etkindir. İnsanlarda bu infeksiyonun oluşabilmesi için en az 10^6 hücrenin alınması gerekir (Akça 1994, Ünlütürk ve Turantaş 1998, Aydın ve Paracıkoğlu 2006).

EIEC suşları, *Shigella dysenteriae*'ye benzer bir infeksiyon oluşturur ve ülserasyon ve kanlı ishal neden olurlar (Ünlütürk ve Turantaş 1998).

EAggEC suşları, LT ve ST üretmeyen, invaziv olmayan, O ve H antijenlerine göre ETEC, EPEC, EIEC veya ETEC virotiplerinden olmayan, HEp-2 ve HeLa hücrelerine tipik olarak tutunan *E. coli* suşlarını tanımlar (Ustaçelebi 1999). Gelişmekte olan ülkelerde kronik ishal nedenidir (Yatsuyanagi ve ark. 2001, Olesen ve ark. 2005).

EHEC suşları, Patojen *E. coli* grupları içinde ciddi hastalıklara yol açar ve en yaygın tipi *E. coli* O157:H7' dir (Ünlütürk ve Turantaş 1998).

1945 yılında serogrup O11 suşlarının bir bakım evindeki çocuklarda ishal salgınlarına yol açtığı gösterilmesi ile bağırsak patojeni *E. coli* (EPEC) suşlarının tanımı başlamıştır. 1969 yılında Ortadoğudaki İngiliz askerlerindeki ishal olgularından ETEC suşları, yine aynı yıllarda Japonya ve Brezilya'da basilli dizanteriden ayırt edilemeyen bağırsak infeksiyonlarına yol açan EIEC suşları izole edilmiştir (Topçu ve ark. 2002).

1982'de A.B.D.'de Michigan ve Oregon eyaletlerinde aynı restaurant zincirinden hamburger yiyen 47 kişinin benzer klinik belirtilerle; kramp, karın ağrısı, sulu ve hemorajik ishal başvurusu sonucu *E. coli* O157:H7 serotipi hemorajik kolitis (HC) ve hemolitik üremik sendrom (HUS)'a neden olan bir patojen olarak tanımlanmıştır (Boerlin ve ark. 1999, Tsai ve ark. 2000, Dunn 2003, Jin ve ark. 2005, Rangel ve ark. 2005). Yine 1993 yılında Amerika'da görülen ve yine hazır yemek restaurantlarında yetersiz pişirilmiş hamburgerlerin tüketilmesinden kaynaklanan, 732 kişinin etkilendiği, 4 kişinin de hayatını kaybettiği bir salgından sonra gıda zehirlenmelerinde O157:H7'nin önemi oldukça artmıştır (Semanchek ve Golden 1998, Taormina ve Beuchat 1999). 1982- 2000 arası salgın sayısı giderek artmış ve bu da *E. coli* O157:H7'nin daha ayrıntılı araştırılması sonucunu ortaya çıkarmıştır (Rangel ve ark. 2005). O tarihten itibaren *E. coli* O157:H7 HUS'un en önemli nedeni olarak A.B.D., Kanada, Arjantin, Japonya ve Avrupa ülkelerinde rapor edilmiştir. Kuzey Amerika'da HUS vakalarının % 85-90'nın *E. coli* O157:H7 kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Dunn 2003, Friedrich ve ark. 2005).

E. coli O157:H7 her yıl A.B.D.'de yaklaşık 73000 enfeksiyona neden olmaktadır ve 1982-2002 yılları arasında toplam 350 salgın ortaya çıkmıştır. Bu salgınlar her yıl ortalama 50 ölüme neden olmuştur (Gorbach ve ark. 2004, Gupro ve ark. 2004, Rangel ve ark. 2005). 1989-2002 yılları arasında meydana gelen büyük salgınlar Çizelge 2'de belirtilmiştir.

Çizelge 2. 1989-2202 yılları arasında gerçekleşen büyük *E. coli* O157:H7 salgınları (Petridis ve ark. 2002)

Yıl	Yerleşim Yeri	Hastalanan Kişi Sayısı	Kontaminasyon Kaynağı
1989	Montana, ABD	243	Az Pişmiş Kıyma
1996	Sakai, Japonya	5,727	Az Yıkanmış Turp
1996	İskoçya, UK	496	Az Pişmiş Kıyma
2000	Walkerton, Kanada	>2,000	Kontamine İçme Suyu
2002	Pensilvanya, ABD	51	İnfekte Süt Hayvanları ile Temas

E. coli O157:H7 serotipi diyare dışında insanlarda 3 temel sendroma neden olmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş 1998, Dunn 2003).

Hemorajik Kolitis (HC): İnfeksiyon şiddetli karın ağrıları ve sulu ishal şeklinde başlar. Genellikle 3. günden sonra sulu ishal kanlı ishale döner. Dışkı bazen hastalar tarafından “sadece kan” diye tanımlanır. İnfeksiyon 2-9 gün sürer (Ünlütürk ve Turantaş 1998, Boerlin ve ark. 1999, Tsai ve ark. 2000, Dunn 2003).

Hemolitik Üremik Sendrom (HUS): Özellikle çocuklar ve yaşlılar risk grubunu oluşturur, çocuklarda akut böbrek yetmezliğinin en önemli nedenidir. Kan pıhtılarının böbrekteki helezoni tüpleri tıkanması ve artık ürünlerin kanda birikmesi sonucu diyaliz tedavisi ve kan naklini gerektirecek böbrek yetmezliği oluşur (Ünlütürk ve Turantaş 1998, Jin ve ark. 2005). Ayrıca HUS hastalarında akut renal yetmezlik, trombositopeni ve mikroanjipatik hemolitik anemiyi takiben diyare görülür. % 5-10'a varan ölümler görülebilir (Boerlin ve ark. 1999, Dunn 2003, Gorbach ve ark. 2004). Günümüzde HUS hastaları için spesifik bir tedavi geliştirilemediği için *E. coli* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin anlaşılması çok önemlidir (Wang ve ark. 2002).

Trombotik Trombositopenik purpura (TTP) : HUS 'a benzer klinik belirtiler gösterir. Erişkin insanlarda daha sık görülür. HUS'tan farklı olarak nörolojik belirtiler daha yüksektir ve beyinde oluşan kan pıhtıları nedeniyle ölüm oranı yüksektir (Ünlütürk ve Turantaş 1998, Dunn 2003).

Bu temel klinik bulgular dışında *E. coli* O157:H7 ile infekte insanlarda gözlenen diğer komplikasyonlar ise hemorajik sistit, konvülsiyonlar, sepsis ve anemi şeklindedir (Padhye ve Doyle 1992).

E. coli O157:H7 diğer *E. coli* suşlarından ayıran 3 temel özellik sorbitolü fermente edememesi (Chapman ve ark. 1997, Dean-Nystrom ve ark. 1998, Durso ve ark. 2004, Maldonada ve ark. 2005), 4-methy lumbelliferone glucuronide'i (MUG) hidrolize eden β -glukorinadaz enzim aktivitesine sahip olmaması (Dunn 2003, Brooks ve ark. 2004, Kim ve ark. 2005) ve 44-45 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda gelişmemesidir (Kim ve ark. 2005).

E. coli O157:H7'yi ayıran diğer bir özellik ise 60 Md (pO157) plazmid taşıması ve hemolizine neden olmasıdır (Wang ve ark. 2002, Yang ve ark. 2004).

Yapılan çalışmalarda *E. coli* O157:H7'nin etli konserve besinlerin kullanılmasında korunmasında kullanılan asitlere (sitrik, asetik, laktik asitlere) diğer barsak patojenlerinden daha dayanıklı olduğu belirtilmiştir. pH 1,5 -2,5 değerlerinde bile *E. coli* O157:H7'nin 3-4 saat canlı kalabildiği belirlenmiştir. Bu da *E. coli* O157:H7'nin düşük dozlarda bile mide asidinden geçerek infeksiyona neden olmasını açıklamaktadır. *E. coli* O157:H7'nin infeksiyon dozu 1000 hücreden bile az olabilir (Topçu ve ark. 2002, Tamplin 2005).

E. coli'nin biyokimyasal testlere verdiği reaksiyonlar Çizelge 3'de belirtilmiştir. *E. coli* O157:H7'nin diğer *E. coli*'ler için geliştirilmiş biyokimyasal testlere onlarla aynı reaksiyonu verdiği belirtilmektedir (Koreman ve ark. 1997).

Çizelge 3 : *E. coli* biyokimyasal özellikleri (Koreman ve ark. 1997)

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

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

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

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

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

E. coli; nutrient agar ve kanlı agar gibi genel besiyerleri ve MacConkey (MC) agar, Eosine Methylen Blue (EMB) agar gibi selektif ve diferansiyel besiyerlerinde 37 °C'de 24 saatte yuvarlak 1.2 mm çapında, parlak, düzgün kenarlı, S- tipli koloniler meydana getirir. Etken laktozu fermente ettiği için MC agarda pembe renkli koloniler, EMB agarda metalik refle görünümünde koloniler oluşturur. Ayrıca besiyerlerinde kenarları düzgün olmayan, küçük ve kuru görümlü R- tipli koloniler ile mukoid özellikteki koloniler de görülür. Genellikle, patojen olan bazı suşları kanlı agarda hemoliz oluşturma yeteneğindedir. Buyyonda kısa bir süre içerisinde hafif bir bulanıklık oluşturarak ürer (Bisping ve Amtsberg 1988, Erensoy 1990).

50 den fazla serotipi bulunan EHEC'in en yaygın tipi olan *E. coli* O157:H7; *Shigella dysenteriae* tip I tarafından oluşturulan toksine benzerliğinden dolayı şigatoksinler olarak adlandırılan (Stx 1 ve Stx 2) toksinler üretmektedir. Şigatoksinler Vero hücre kültürlerine sitotoksik etkili olduğundan verotoksinler (Vt 1 ve Vt 2) olarak da adlandırılmaktadır. Bu toksinlerin EHEC suşlarının insanlardaki virulansi açısından önemli roller üstlendiği düşünülmektedir (Dean-Nystrom ve ark. 1998, Friedrich ve ark. 2002, Topçu ve ark. 2002, Wang ve ark. 2002, Dunn 2003, Baets ve ark. 2004).

Stx 1 *S. dysenteriae* tip I toksininden sadece bir aminoasit farklıdır ve antijenik olarak bu toksinden ayırt edilemez. Stx 2 ise bu toksinlere % 50-60 oranında benzerlik gösterir ve 5 değişik varyant içerir (Stx 2, 2c, 2d, 2e ve 2f). Şiga toksijenik *E. coli* (STEC) bu toksinlerin birini veya her ikisini de üretebilir (Kusumato ve ark. 2001, Wang ve ark. 2002, Dunn 2003, Henderson ve Brian 2003). Ciddi klinik semptomlar daha çok Stx 2 üreten *E. coli* O157:H7 infeksiyonlarında görülmektedir. Özellikle HUS vakalarında izole edilen toksin Stx 2'dir (Friedrich ve ark. 2002, Baets ve ark. 2004). Yapısal olarak Stx'ler shiga toksini gibi, toksik etkiyi gösteren bir A ve hücreye girişi sağlayan beş B alt ünitesi içerir. A ünitesi hücrede 60S ribozomda 28S rRNA'dan bir adenin molekülünün çıkması ile protein sentezini inhibe ederler. Bu olay geri dönüşüzdür. Hücrenin ölümünü sağlar. Stx'ler intestinal sistemde üretildikten sonra dolaşım sistemine karışarak iç organlarda hasara neden olurlar (Topçu ve ark. 2002, Ritchie ve ark. 2003, Kasper ve ark. 2006).

Stx'lerin patojenik mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat diyare, HC, HUS ve TTP gelişimine katkıda buldukları düşünülmektedir. HC'nin Stx'lerin intestinal

sisteme bırakıldıktan sonra ortaya çıktığı ve HUS/TTP'nin de yine Stx'lerin kana karışmasından sonra ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (Kusumato ve ark. 2001, Dunn 2003). HUS hastalarının kanlarında da Stx'lere rastlanmıştır. Stx 2 ve Stx 2c insan klinik izolatlarında en sık rastlanılan toksinler olduğu belirtilmektedir (Baets ve ark. 2004). Stx 1 ve Stx 2'nin hayvanlarda ve in vitro da değişik patojeniteleri görülmüştür (Kusumato ve ark. 2001, Dunn 2003, Gorbach ve ark. 2004).

STEC suşlarında, en önemli virulans faktörü şigatoksinlerdir. Diğer virulans özellikleri olarakta hemolizin, intimin yapışma faktörü ve pO157 plazmidi belirtilebilir. Bazı STEC suşları bağırsak epitel hücrelerine çok sıkı bir şekilde tutunur. Bu suşlar alt hücrelerde yapısal modifikasyonlara neden olarak “**yapışma ve silinme (A/E) lezyonları**” na neden olmaktadır. Araştırmalar STEC O157:H7'nin insan bağırsağı kolonizasyonunda, bir dış membran proteini olan intiminin gerekli olduğunu göstermektedir. Hemoliz üretimi ise pO157 plazmidi tarafından kodlanmaktadır. Enterohemolizin olarak adlandırılmakta ve en çok HUS'a neden olan *E. coli* O157:H7 suşları ile birlikte ruminant izolatlarında da görülmektedir. Enterohemolizin hedef hücrelerde gözenekler oluşturmaktadır. Stx ile sinerjistik bir etki yaptığı düşünülmekle birlikte, mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (Dean-Nystrom ve ark. 1998, Boerlin ve ark. 1999, Dunn ve ark. 2003, Girard ve ark. 2005).

Ayrıca bazı STEC serotiplerinde de bir proteaz “*E. coli*-secreted proteins” (EspP) yeni bir virulans faktörü olarak belirtilmeye başlamıştır. Bu immunreaktif proteinlerin tipik A/E lezyonlarının şekillenmesi için gerekli sinyal transdüksiyonunda rol aldığı belirtilmektedir. Tip III sekresyon sistemi bu proteinlerin sitoplazmadan direkt olarak hücre yüzeyine taşınmasında görev almaktadır (Park ve ark. 1999).

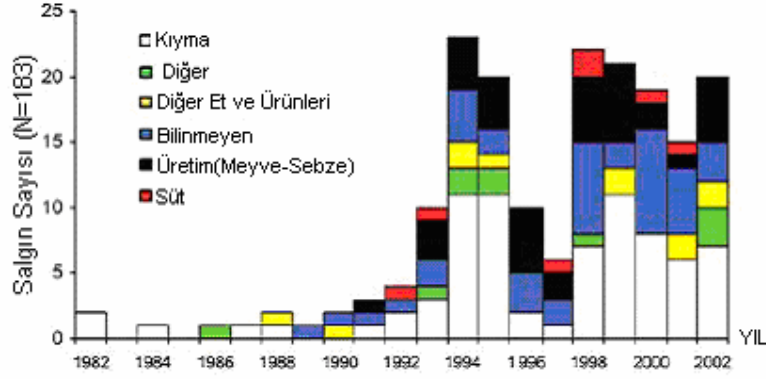
STEC/EHEC *E. coli* grubu içerisinde zoonotik orijinli tek patojenik gruptur ve birçok hayvan türünün bağırsak florasında bulunabilmektedir. Fakat ruminantların STEC'nin ve özellikle *E. coli* O157:H7'nin birincil rezervuarı olduğu belirtilmektedir. Bugüne kadar 435'ten fazla STEC serotipi sığırlardan izole edilmiştir (Gyles 2006). *E. coli* O157:H7 diğer STEC'ler gibi ruminantlarda hastalığa neden olmazlar. Fakat yüksek miktarda bu patojenin bulunması çekum, kolon ve rektumda AE lezyonlarına neden olabilir. Yapılan son çalışmalarda, insan için yüksek derecede virulans olan bu türün

sadece kontamine gıda veya suyun tüketilmesiyle değil, STEC pozitif hayvanlar veya ortamlarla temas ile de enfeksiyona neden olduğu ileri sürülmektedir (Dunn 2003, Caprioli ve ark. 2005).

Sığırlar *E. coli* O157:H7 enfeksiyonunun en önemli kaynağı olarak belirtilmektedir. Sığırların normal bağırsak mikroflorasının bir parçası olan *E. coli* O157:H7 miktarı sığırların yaşıyla da değişim göstermektedir. Yapılan çalışmalarda genç sığırların dışkılarında özellikle süttten kesildikten sonra erişkinlere göre çok daha yoğun ölçüde bu patojene rastlanmıştır. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda da yaz aylarında *E. coli* O157:H7 sayısının arttığı tespit edilmiştir (Dunn 2003, Caprioli ve ark. 2005).

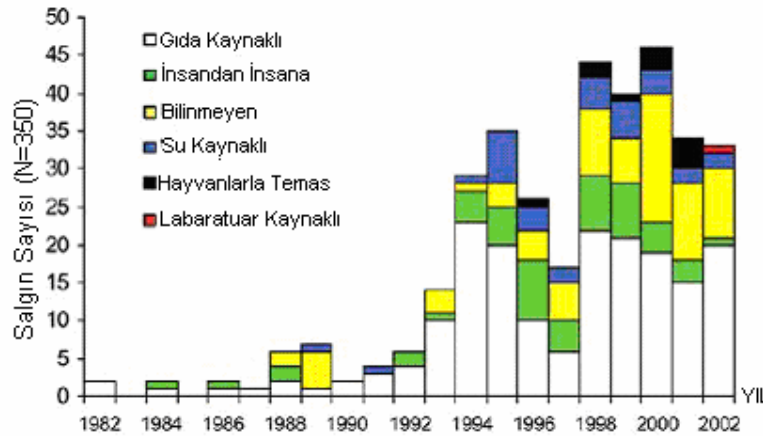
E. coli O157:H7'ye sığırlar dışında koyun, keçi, domuz, köpek ve at gibi evcil hayvanlarda, ayrıca geyik, kuş gibi vahşi hayvanlarda da rastlanmıştır. Vahşi hayvanlarla temas eden evcil hayvanlara bulaşmanın olabileceği ileri sürülmektedir. Canlı tavuklarda *E. coli* O157:H7'ye rastlanmamasına rağmen satış yapılan tavuk ve hindilerin intestinal sistemlerinden izole edilmiştir. Deneysel çalışmalarda da civcivlerin çekumunda üreyebildikleri gözlemlenmiştir (Dunn 2003, Caprioli ve ark. 2005).

E. coli O157:H7 enfeksiyonlarında ilk sırayı, doğrudan veya dolaylı olarak sığır dışkısıyla kontamine olmuş etlerin yeterince pişirilmeden tüketilmesinin aldığı düşünülmektedir. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar diğer bulaşma kaynaklarının da en az yeterince pişirilmemiş etler kadar yaygın olduğunu göstermektedir (Şekil 1). İlk *E. coli* O157:H7 enfeksiyonu kıyma kaynaklıdır. Özellikle fast-food gıdalar yeterince ısıl işlem görmediği takdirde *E. coli* O157:H7 enfeksiyonu için büyük risk taşımaktadır (Caprioli ve ark. 2005, Rangel ve ark. 2005).



Şekil 1: Gıda kaynaklı salgınların nedenleri (Rangel ve ark. 2005)

Diğer bir bulaşma kaynağı ise dışkıyla kontamine olmuş meyve ve sebzelerin tüketilmesidir. Çoğunlukla restaurantlarda meyve ve sebzelerin kros-kontaminasyonu sonucu *E. coli* O157:H7 salgınları çıktığı belirtilmektedir. Süt ve süt ürünleri de önemli bir bulaşma kaynağıdır. Özellikle çiğ sütün veya çiğ süt ile yapılan peynir, tereyağı gibi ürünlerin tüketilmesi infeksiyonlara neden olmaktadır. Son yıllarda insandan insana bulaşma ve su kaynaklı salgınların sayısında belirgin artışlar gözlemlenmiştir. Özellikle kontamine olmuş içme suları ve halka açık yüzme havuzları büyük salgınlara neden olmaktadır. Son 10 yılda hayvanat bahçesi veya çiftliklere insanlar tarafından yapılan ziyaretler nedeniyle hayvanlarla temas sonucu ortaya çıkan salgınların sayısında da büyük bir artış görüldüğü belirtilmektedir (Şekil 2) (Caprioli ve ark. 2005, Rangel ve ark. 2005).



Şekil 2: Salgınların ortaya çıkma nedenleri (Rangel ve ark. 2005)

Yapılan çalışmalarda sığırlarda, beslenme içeriği ve dışkıda bulunan STEC sayısı arasında belirgin bir ilişki olmadığı belirtilmesine rağmen, bazı araştırmacılar hububatça zengin bir beslenmenin bağırsak lümeninde asite dirençliliği destekleyerek dışkıdaki STEC sayısını arttırdığını belirtmektedirler. Fakat yapılan bir çok çalışmada da beslenme şekli ile bu patojenin sayısı arasında bir korelasyon saptanamamıştır. Yine de silaj işleminden sonra yetersiz fermantasyonla birlikte otların dışkı ile kontaminasyonu sonucu *E. coli* O157:H7 sayısında artış olduğu ve bu patojenin sığırlar arasında taşınmasında yetersiz silaj işleminin rol aldığı düşünülmektedir. *E. coli* O157:H7'nin sığırlar arasındaki bulaşmada içme suyunun kalitesi de önemli bir faktördür. Fekal kontaminasyona uğramış içme suyunun bu organizmanın yaşayabilmesi ve üreyebilmesi için uygun bir ortam olduğu ve sığırlar arası bulaşmaya neden olabileceği belirtilmektedir (Caprioli ve ark. 2005).

E. coli O157:H7 hayvan dışkılarında yaşamaya uygun bir organizmadır ve aylarca canlılığını koruyabilir. *E. coli* O157'nin 5 °C'de 0,98 su aktivesinde 70 gün yaşayabildiği, ayrıca 10⁸ hücre/gram *E. coli* O157:H7 taşıyan bir dışkıda 99 gün sonra bile organizmanın canlılığını koruyabildiği tespit edilmiştir. Bu patojenin toprakta bu kadar uzun süre canlılığını devam ettirebilmesi sığır ve insanlardaki infeksiyonlar için önemlidir. Hayvan artıkları, özellikle gübre ve silaj yapımında sıklıkla kullanılmaktadır ve bu da sığırların dolayısıyla insanlardaki infeksiyonların oluşumunda rol oynamaktadır (Caprioli ve ark. 2005).

E. coli O157:H7 serotipinin çeşitli gıda, klinik ve çevre örneklerinde aranmasına yönelik olarak klasik ve gelişmiş olmak üzere 2 ana grupta toplanabilecek çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Klasik yöntemler biyokimyasal testler üzerine kurulmuştur ve malzeme maliyeti açısından avantajlı fakat testlerin duyarlılığı ve süresi açısından dezavantajlıdır. Gelişmiş testler ise genellikle serolojik yöntemler üzerine dayandırılmıştır ve genellikle araştırma laboratuvarlarında uygulanmaktadır (Halkman ve ark. 2001).

Klasik Yöntemler: *E. coli* O157:H7'nin belirlenmesi amacıyla kullanılan klasik yöntemlerin büyük çoğunluğu selektif zenginleştirme ve katı besiyerlerine ekim aşamalarını içeren var/yok testleridir. Bu testler ile analiz edilen belirli bir miktar örnekte bu serotipin varlığı ya da yokluğu araştırılır (Halkman ve ark. 2001). Buna göre materyallerde *E. coli* O157:H7 varlığının gösterilmesinde üç aşama izlenir. İlk olarak örnekler diğer bazı mikroorganizmaları inhibe eden antibiyotikler içeren selektif bir sıvı besiyerinde zenginleştirme işlemine alınır. İkinci olarak selektif katı besiyerine ekim gerçekleştirilir. Şüpheli koloniler biyokimyasal testler ve lateks aglutinasyon testleri ile *E. coli* O157 olarak belirlenir. Son aşama da ise izolatanın H7 antijeni içerip içermediğine bakılır. Ayrıca O157 olduğu belirlenen izolatların verotoksin analizlerinin de yapılması gerekmektedir (Halkman ve ark. 2001, Dunn 2003).

Klasik yöntemlerle *E. coli* O157:H7 izolasyonunda, yoğun olarak bulunan normal flora varlığına bağlı olarak sıklıkla yalancı negatif sonuçlar alınabilmektedir. Selektif zenginleştirme ortamı olarak kullanılan besiyerlerinde *E. coli* O157:H7 serotipi ile aynı düzeyde gelişebilen *E. coli* tip 1, *Enterobacter* spp. ve *Hafnia alvei* gibi yakın akraba türler, selektif katı besiyerlerinde de rahatlıkla gelişebilmektedir. Eğer başlangıçta *E. coli* O157:H7 sayısı bu flora içinde yeterli bir oranda değilse, bu bakterilerin baskılaması nedeniyle analiz sonucu hatalı olarak negatif olabilmektedir. Burada kriter; sıvı ve katı besiyerlerinde gelişebilen yakın akraba türleri içeren flora içindeki hedef bakteri oranının en düşük % 1 olması gerektiği olarak belirtilmektedir. Klasik yöntemlerle yapılan analizlerde yakın akraba refakatçi floranın inhibasyonu üzerine pek çok çalışma yapılmaktadır. Bunların inhibasyonu için yükseltilmiş inkubasyon sıcaklığı, düşük pH, çeşitli antibiyotiklerin kullanımı ve kısa inkubasyon süresi gibi çeşitli faktörler araştırılmaktadır (Halkman ve ark. 2001).

Klasik yöntemlerde zenginleştirme besiyeri olarak Tryptone soy broth (TSB), modifiye *E. coli* broth (mECB), Lauryl sulfate Tryptose broth (LSTB) veya Buffered peptone water (BPW) kullanılabilir. Bu besiyerlerine novobiosin, cefiksim, cefsulodin, vancomisin gibi bir veya birkaç inhibe edici antibiyotik eklenir. Örnekler bu besiyerlerinde 24 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra selektif bir katı besiyerine ekim yapılır (Halkman ve ark. 2001, Dunn 2003). Ayrıca zenginleştirme kültürlerinin hidrofik grid membran

filtreden (HGMF) geçirilip, bu filtrelerin selektif katı besiyerleri üzerine yerleştirilmesi de yaygın bir uygulama alanı bulmuştur (Halkman ve ark. 2001).

Selektif katı besiyeri olarak günümüzde en yaygın olarak kullanılan sorbitollü MacConkey (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 besiyerinde renksiz koloniler oluşturmakta buna karşın sorbitolu kullanılan bakterilerin oluşturduğu asitlik, bir pH indikatörü yardımıyla kolonilerin kırmızı renkte görünmesine neden olmaktadır (Koreman ve ark. 1997, Halkman ve ark. 2001, Topçu ve ark. 2002, Dunn 2003). Yapılan çalışmalarda SMAC agar % 100 duyarlı, % 85 spesifik ve % 86 doğru sonuç veren bir besiyeri olarak tanımlanmaktadır. Ancak ileri araştırmalarda SMAC agarın gıda analizlerinde dışkı analizinde olduğu kadar başarılı olmadığı belirtilmektedir (Halkman ve ark. 2001).

SMAC agarda *E. coli* O157:H7 dışında pek çok bakteri de gelişebilir. Bu nedenle çeşitli selektif ilaveler ile SMAC agar desteklenmekte ve besiyerine daha fazla selektivite kazandırılmaya çalışılmaktadır. Bu amaçla en çok cefiksim ve potasyum tellürit kullanılmaktadır. Cefiksim yanlış pozitif sonuçlar ortaya çıkarabilecek sorbitol-negatif bir bakteri olan *Proteus* spp. hedef alırken, potasyum tellürit diğer *E. coli* türlerinin ve *Aeromonas* spp. lerin besiyerinde üremesini inhibe etmektedir (Halkman ve ark. 2001, Dunn 2003).

Klasik yöntemle *E. coli* O157:H7 aranmasında son aşama selektif katı besiyerinden izole edilen şüpheli kolonilerin tanımlanmasıdır. Bu tanımlama O157 serotipi için biyokimyasal testlerle yapılacağı gibi doğrudan lateks aglutinasyon testi ile de yapılabilmektedir. *E. coli* O157:H7'nin biyokimyasal testlere verdiği reaksiyonlar Çizelge 3'de belirtilmiştir (Halkman ve ark. 2001).

E. coli O157 suşlarının serolojik esaslarla belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan lateks aglutinasyon kiti 2 adet lateks solüsyonu içermektedir. Bunlardan test solüsyonu *E. coli* O157 antijenine spesifik tavşan antikoru ile sensitize edilmiş lateks partiküllerinden oluşmaktadır. Kontrol solüsyonu ise pre-immun halde tavşan globulinleri

içermektedir. Test edilecek kültürler SMAC agar üzerinde geliştirildikten sonra, sorbitol negatif koloniler, lateks testine tabi tutularak test sonucu 1 dakika içerisinde tespit edilebilmektedir. Fekal örneklerde bulunabileceği gibi daha çok çiğ süt ve dana etinden izole edilen *Escherichia hermannii* sorbitol negatif olup *E. coli* O157 antiserumu ile agglutine olabilmekte ve böylece *E. coli* O157 ile karıştırılabilmektedir. Bu yüzden SMAC agarın yanı sıra sellobiyoz-MacConkey agar da bazı araştırmacılar tarafından kullanılmakta ve böylece *E. hermannii* sellobiyoz fermantasyonu ile *E. coli* O157'den ayırt edilebilmektedir (Halkman ve ark. 2001).

E. coli O157:H7 aranmasındaki son aşama ise *E. coli* O157 olarak saptanan izolata H7 antijeni içerip içermediğinin belirlenmesidir. Bu amaçla H7 antiserumu çeşitli besiyerlerine eklenerek immobilizasyon testi (Farmer ve Davis 1985, Murinda ve ark. 2002) uygulanmakta ya da H7 antiserumu ile lam ya da tüp aglutinasyon testi yapılmaktadır (Park ve ark. 1999).

Gelişmiş Testler: Klasik yöntemlerle birçok infeksiyon teşhis edilebilmekte ise de bunlar bazen yetersiz kalabilmekte ve özellikle refakatçi floranın baskılaması nedeniyle çoğu kez yanıltıcı sonuçlar alınabilmektedir. Bu nedenle giderek gelişen analiz teknikleri içerisinde başta DNA esaslı testler ve immunoenzimatik yöntemler olmak üzere çeşitli analiz yöntemleri üzerine çalışılmakta, bunların bir kısmı ticari olarak üretilip pazarlanmaktadır (Halkman ve ark. 2001).

E. coli O157:H7 tespitinde kullanılan bir çok serolojik ve biyokimyasal yöntem O₁₅₇H₇ antijeni veya Stx belirlenmesi esasına dayanmaktadır ve bu amaçla spesifik monoklonal ve poliklonal antiserumlar geliştirilmiştir (Dunn 2003). Bugün *E. coli* serotiplerinin belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemler immunomanyetik seperasyon (IMS), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), enzim immunoassay (EIA) ve immunoblot olarak belirtilmektedir (Chapman ve ark. 1997, Ritchie ve ark. 2003, Dunn 2003, Tsutsumi ve ark. 2004, Kim ve ark. 2005, Pao ve ark. 2005).

ELISA yöntemi O157 ve H7 antijenini teşhis için monoklonal antikorların (MAb) kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Özellikle fekal örneklerde ELISA ve gıda numunelerinde

“sandwich” ELISA yönteminin güvenilir ve hızlı sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Boerlin ve ark. 1999, Dunn 2003).

IMS sistemi manyetik bir aparatla O157 antijenine kovalent bağlanarak gelişen bir bakteriyel yakalama sistemi olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemde monoklonal antikorlarla kaplanmış manyetik tanecikler kullanılmaktadır. Bu antikorlar bakteriyi bağlayarak onların sayımını mümkün kılmaktadır (Okrend ve Rose 1992, Clark 1995). IMS yönteminin klinik örneklerde, gıda numunelerinde ve sığır fekal örneklerinde klasik yöntemlere oranla çok daha duyarlı olduğu belirtilmektedir. Ayrıca uygulanmasının benzer yöntemlere oranla basit olması artı bir özellik olarak gösterilmektedir (Dunn 2003, Kim ve ark. 2005).

Günümüzde *E. coli* O157:H7 belirlenmesinde multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği de sıklıkla kullanılmaktadır. PZR, DNA'nın ortamda polimeraz enzimi ve DNA sentezi için uygun maddeler bulunması halinde karşıt sıralarını sentezleyebilme yeteneğinden faydalanılarak oluşturulan bir reaksiyondur. DNA ve RNA dizilerinin sayısal olarak arttırılması esasına dayanan PZR'in en önemli özelliği seçilmiş bir DNA dizisini çoğaltarak istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasını engellemesidir. Bu özellik sadece dizinin tanınmasını kolaylaştırmakla kalmaz, ayrıca DNA'nın analiz edilmesini de sağlamaktadır. (Kong ve ark. 2002). PZR ile virulans faktör genleri teşhis edilebilmekte ve böylece serotip tanımlanabilmektedir. O veya H antijeni, Stx genleri, 60 Mda plazmid gibi virulans faktörleri tespit edilerek *E. coli* O157:H7 serotipi belirlenmektedir. PZR tekniğinin de *E. coli* O157:H7 'nin diğer *E. coli* serotiplerinden ve diğer Gram negatif bakterilerden ayrılmasında duyarlı ve hızlı bir yöntem olduğu belirtilmektedir (Dunn 2003, Kim ve ark. 2005, Jin ve ark. 2005).

E. coli O157:H7 infeksiyonu tedavisinde antimikrobiyal ajanların kullanılması tartışılmaktadır. Çünkü birçok in vitro çalışmada antibiyotiklerin Stx oluşumunu arttırdığı belirlenmiştir. Mitomisin gibi bazı antimikrobiyaller vitro çalışmalarda tanı amaçlı Stx miktarını çoğaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Eğer in vivo ortamlarda da antibiyotiklerin aynı etkiyi gösterdiği düşünülürse, hastalarda antibiyotik kullanımından sonra toksin serbest olarak bağırsakta bulunabilmektedir. Bunun da HUS riskini artırabileceği belirtilmektedir. Bu konuda yapılan araştırmalar birbirinden farklılık gösterse de DNA

sentezini inhibe eden antimikrobiyallerin (trimetoprim, mitomisin) in vivo ve in vitro da toksin üretimini artırdığı rapor edilmiştir. Örneğin kanser kemoterapisinde kullanılan mitomisin'in kanser hastalarında HUS riskini artırdığı tespit edilmiştir. Birçok araştırmacı bu konudaki araştırmalar kesin sonuçlar ortaya koymadan *E. coli* O157:H7 infeksiyonunda antibiyotik kullanımının sakıncalı olduğunu belirtmektedir (Dunn 2003, Gorbach ve ark. 2004, Tarr ve Neill 2005). Japonya'da 1996 yılında görülen ve çoğu okul çocuğu olan 6000 kişinin etkilendiği salgında, infeksiyonun 7. gününde alınan antidiyarejenik ilaçların infeksiyonu daha da şiddetlendirdiği belirlenmiştir. (Park ve ark., 1999).

E. coli O157:H7'nin kontrolü birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. *E. coli* O157:H7 sağlıklı sığırlarda kolonize olabilir, gıda ve suda yaşayabilir, asitli ortamlara dirençlidir ve en önemlisi infeksiyon dozu çok düşüktür. Bu yüzden her aşamada korunma ölçümlerinin yapılması gerektiği belirtilmektedir (Gorbach ve ark. 2004, Caprioli ve ark. 2005).

E. coli O157:H7'nin birincil rezarvuarı sığırlar olarak belirtilmektedir. Bu yüzden hayvan yemlerinde sanitasyon uygulaması, hayvan sayısının az tutulması ve gübre gibi organik maddelerin çabuk uzaklaştırılmasının çiftliklerde korunma açısından önemli olduğu vurgulanmaktadır. Kesimden sonrada karkasların su veya uygun solüsyonlarla yıkanması ve kros-kontaminasyonu engelleyici uygulamaların yapılmasının da etkili olduğu belirtilmektedir. Aynı şekilde süt sağımında benzer uygulamaların yapılması gerektiği önerilmektedir. Pişirme esnasında da 72 °C' ye ulaşılması korunmada diğer önemli bir etken olarak gösterilmektedir (Gorbach ve ark. 2004, Caprioli ve ark. 2005).

Hayvanlarla temas sonrasında ellerin yıkanmasının da önemli olduğu belirtilmektedir. Ayrıca son yıllarda insandan insana geçişte büyük oranda artış göstermiştir. Hastane ve kliniklerde hijyen kurallarına uyulmasının önemi vurgulanmaktadır. *E. coli* O157:H7 klor karşı duyarlı olması nedeniyle içme suyunun ve yüzme havuzlarının klorlanması da infeksiyonun kontamine su kaynaklı yayılmasını önlemektedir (Gorbach ve ark. 2004, Caprioli ve ark. 2005).

Olası bir *E. coli* O157:H7 identifikasyonunda, salgının önlenmesi amacıyla kontrol mekanizmaları hızla devreye sokulmalıdır. 1993'te A.B.D.'de kıymadan meydana gelen bir salgında erken teşhis ve *E. coli* O157:H7 infeksiyonlarının ve HUS vakalarının hemen rapor edilmesi yaklaşık 800 infeksiyonun önlenmesini sağlamıştır (Gorbach ve ark. 2004, Caprioli ve ark. 2005).

Tüm bunların yanı sıra hammaddeden son ürüne kadar genel hijyenik kuralların uygulanması ve özellikle gıda üretim ve satış yerlerinde kros-kontaminasyonu engelleyici önlemlerin alınması bu infeksiyonun ortaya çıkmasını büyük ölçüde önleyebilmektedir (Gorbach ve ark. 2004, Caprioli ve ark. 2005).

Bu çalışmada, Ege bölgesinde bulunan sığırlardan alınacak süt ve dışkı örneklerdeki *E. coli* O157:H7 bakterisinin varlığı ve verotoksin üretip üretmediğinin belirlenmesi amaçlandı.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Besiyerleri

2.1.1. Ön Zenginleştirme Besiyeri

Modified Tryptone Soy Broth (mTSB)

Dışkı ve süt örneklerinden *E. coli* O157:H7 izolasyonu amacıyla ön zenginleştirme besiyeri olarak Novobiocin (Oxoid SR0181) katkılı mTSB (Oxoid CM989) kullanıldı. Temel besiyeri 33 g / 1000 ml olacak şekilde hazırlanarak pH'ı 7,4'e ayarlandı ve 121 °C'de 15 dk sterilize edildi. Bir vial Novobiocin selective supplement 2 ml steril distile su içerisinde çözüldü. Besiyeri 50 °C olduğunda, 0,2 µm çaplı steril filtreden süzülerek 20 mg / 1000 ml olacak şekilde besiyerine eklendi.

2.1.2. Selektif Diferansiyel Besiyeri

Sorbitol MacConkey Agar (SMAC)

Dışkı ve süt örneklerinden *E. coli* O157:H7 izolasyonu amacıyla selektif-diferansiyel besiyeri olarak Cefiksim-Tellurite (Oxoid SR0172) katkılı SMAC agar (Oxoid CM981) kullanıldı. Temel besiyeri 25,8 g / 500 ml olacak şekilde hazırlanarak pH'ı 7,1'e ayarlandı ve 121 °C'de 15 dk sterilize edildi. Bir vial C-T selective supplement 2 ml steril distile su içerisinde çözüldü. Besiyeri 50 °C olduğunda, 0,2 µm çaplı steril filtreden (Schleicher&Schuell, BR0534-2) süzülerek, 1 vial / 500ml olacak şekilde besiyerine eklendi.

2.2. Solüsyonlar

2.2.1. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

NaCl	85 g
Distile su	1000 ml

2.2.2. Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS)

Peptone	10 g
Sodium chloride	5 g

Potassium dihydrogen phosphate	1,5 g
Disodium hydrogen phosphate	3,7 g
Distile su	1000 ml

2.3 Standart Suş

Standart *E. coli* O157:H7 suşu (Suş kodu: 931, EDL), T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Kültür Koleksiyonundan sağlandı.

2.4. Dışkı ve Süt Örnekleri Alımı

Bu çalışmada Ege bölgesinde bulunan çeşitli çiftlikler ve köy evleri ziyaret edilerek farklı yaş ve cinsiyetteki sağlıklı sığırlardan 150 dışkı örneği toplandı. Örnekler, çapraz kontaminasyonu önlemek amacıyla her hayvan için farklı rektal muayene eldiveni kullanılarak rektumdan alındı. Alınan dışkı örnekleri tek kullanımlık steril plastik dışkı kaplarına aktararak soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı. Yine aynı çiftlik ve köy evlerinden 150 çiğ süt örneği toplandı. Çiğ süt örneklerinin bazıları dışkı örneği alınan sığırlardan, bazıları ise dışkı örneği alınmayan sığırlardan temin edildi. Örnekler, hayvanların memelerinden enjektör ile 50 ml'lik steril cam şişeler içerisine alındı ve soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı.

2.5.1. Dışkı Örnekleri için Ön Zenginleştirme

Sığırlardan rektal yolla sağlanan ve tek kullanımlık steril plastik dışkı kaplarına alınan dışkı örnekleri zaman kaybedilmeden soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı. Ön

zenginleştirme uygulamalarında Zhao ve ark.'nın (1995) uyguladığı yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Dışkı örneklerinden *E. coli* O157:H7 izolasyonu amacıyla ön zenginleştirme besiyeri olarak Novobiocin (Oxoid SR0181) katkılı mTSB (Oxoid CM989) kullanıldı. Besiyerinin pH'ı 7,4'e ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrası besiyeri sıcaklığı 50 °C'ye düştüğünde içerisine hazırlanan Novobiocin solüsyonu 0,2 µm çaplı steril milipor filtreden süzülerek 20 mg / 1000 ml olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan besiyerinden 9 ml olacak şekilde tüplere dağıtıldı. Dışkı örneklerinden 1 gram alınarak, içerisinde 9 ml mTSB bulunan tüplere aktarıldı. 120 devirde 5 dk vortekslenerek homojenize edildi. Süpernatant 37 °C'de 24 saat inkube edildi.

2.5.2. Süt Örnekleri için Ön Zenginleştirme

Enjektör ile sığır memelerinden alınan örnekler, kapaklı, steril edilmiş cam şişeler içerisine alınarak, zaman kaybedilmeden soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı. Süt örneklerinden *E. coli* O157:H7 izolasyonu amacıyla ön zenginleştirme besiyeri olarak Novobiocin (Oxoid SR0181) katkılı mTSB (Oxoid CM989) kullanıldı. pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra besiyeri 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrası besiyeri sıcaklığı 50 °C'ye düştüğünde içerisine hazırlanan Novobiocin solüsyonu 0,2 µm çaplı steril milipor filtreden süzülerek 20 mg / 1000 ml olacak şekilde ilave edildi. Besiyerinden sterilize edilmiş erlenler içerisine 225 ml aktarıldı. Üzerine süt örneklerinden 25 ml ilave edildi. Erlenler çalkalayıcı üzerine alınarak, 37 °C'de 24 saat inkubasyona kaldırıldı (Doyle ve Schoeni, 1987).

2.6. Selektif-Diferansiyel Katı Besiyerine Ekim

Selektif-diferansiyel katı besiyeri olarak Cefiksim- Tellürit (Oxoid SR0172) ilave edilmiş SMAC agar (Oxoid CM981) kullanıldı. SMAC agar içerisine hazırlanan Cefiksim-Tellürit solüsyonu 0,2 µm çaplı steril milipor filtreden süzülerek ilave edildi. Ön

zenginleştirme sıvısından 1-2 öze dolusu alınarak CT-SMAC agara ekim yapıldı. 37 °C’de aerobik koşullarda 24 saat inkübe edildi. CT-SMAC agarda üreyen sorbitol fermentasyonu ve β -glukuronidaz negatif renksiz koloniler şüpheli olarak değerlendirildi (Şekil 3) (Zadik ve ark.1993, Zhao ve ark. 1995).

2.7. İdentifikasyon

CT-SMAC agarda üreyen, sorbitol fermentasyonu ve β -glukuronidaz aktivitesi negatif olarak belirlenen şüpheli koloniler, Gram boyama yöntemi ile boyandı. Boyama sonrası Gram negatif çomak olarak belirlenen şüpheli izolatlarla ve standart suşa ticari bir kit olan API 20E (BioMerieux, Lyon, France) ile biyokimyasal testler uygulandı.

2.8. Biyokimyasal Testler

Şüpheli izolatların ve standart suşun biyokimyasal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla API 20E kiti kullanıldı. Şüpheli kolonilere ve standart suşa üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde API 20E kiti ile beta-galaktosidaz, arjinin hidrolaz, lizin ve ornitin dekarboksilaz, sitrat, H₂S, üreaz, aminaz, indol, VP, gelatinaz, glukoz, mannitol, inositol, sorbitol, ramnoz, sukroz, melibiose, amygdalin, arabinoz testi uygulandı. Örneklerin *E.coli* olup olmadığı üretici firmanın önerdiği şekilde incelendi.

2.9. Lateks Aglutinasyon Testi

API 20E ticari kiti ile *E. coli* O157 şüpheli olarak belirlenen izolatlar *E. coli* O157 Latex Test (Oxoid, DR620M) uygulandı. Test çözeltisi iyice karıştırılarak test kartındaki alana bir damla test çözeltisi, bir damla % 0,85'lik FTS damlatıldı. CT-SMAC agardaki sorbitol negatif kolonilerden bir tane seçilerek, önce FTS ile süspanse edildi. Daha sonra bu süspanسیون ile test çözeltisi karıştırıldı. Test kartı aşağı yukarı hareket ettirilerek bir dakika içerisinde aglutinasyonun oluşup oluşmadığı belirlendi. Aglutinasyon gösteren izolatlar, *E. coli* O157 olarak belirlendi. Aynı işlem negatif kontrol süspanسیونu ile de tekrarlanarak yalancı pozitif sonuçlar kontrol edildi (March ve Ratnam, 1989).

2.10. H7 Antiserumu ile Serotip Belirlenmesi

E. coli O157 olarak saptanan suşların H antijen tipinin belirlenmesi amacıyla *Escherichia coli* Antisera (Denka Seiken Co.) kullanıldı. H antijen tipinin belirlenmesi prosedürde belirtildiği gibi sıvı besiyerindeki kültürün test tüp yöntemi kullanılarak saptanması esasına dayanarak gerçekleştirildi. Craigie tüplü yarı-sıvı besiyerinden 3-5 defa geçen organizmalar, sıvı besiyerinde 37 °C de bir gece inkübe edildikten sonra hücre süspanسیونu hazırlandı. Test tüplerine 3 damla H antiserumu damlatıldı ve her tüpe 0,5 mL hücre süspanسیونu eklendi. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 50 °C de 1 saat su banyosunda bekletildi ve çıplak gözle aglutinasyona bakıldı. Aglutinasyon gösteren izolatlar, *E. coli* O157:H7 olarak belirlendi

2.11. VTEC-RPLA Kiti ile Toksin Belirlenmesi

Yapılan incelemelerle *E. coli* O157:H7 olduğu tespit edilen suşların toksin üretip üretmediğinin belirlenmesi amacıyla VTEC-RPLA toksin belirleme kiti (Oxoid TD960)

kullanıldı. Prosedürde belirtilen şekilde örnekler Brain Heart Infusion Agara inoküle edilerek 18-20 saat inkubasyona bırakıldı. Mikroplate'e yerleştirilerek test latex VT1, test latex VT2 aglütinasyonları incelenerek suşların VT1 ve VT2 üretip üretmediği belirlendi.

3. BULGULAR

İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Çalışmada kullanılan 150 sığıra ait rektal dışkı örneğinin 3'ünden (% 2) *E. coli* O157 izole edilirken, *Escherichia coli* antiserum testi sonucunda 2 örnek (% 1,3) *E. coli* O157:H7, 1 örnekte (% 0,7) *E.coli* O157:H⁻ olarak belirlendi. Benzer şekilde 150 çiğ süt örneğinin 3'ünden (% 2) *E. coli* O157 izole edilirken bunlardan 2'si (1,3%) *E. coli* O157:H7, 1'i (% 0,7) *E.coli* O157:H⁻ olarak tespit edildi. Yapılan verotoksin testi sonucunda süttten izole edilen *E. coli* O157:H7 suşlarından birinin VT1 ürettiği belirlendi. Toplam dışkı ve süt örnek sayıları, E.coli O157:H7 izolasyon oranı ve verotoksin test sonucu Çizelge 4'te belirtilmiştir.

Çizelge 4. Toplam örnek sayısı, izolasyon oranı ve verotoksin üreten E.coli O157:H7 sayısı

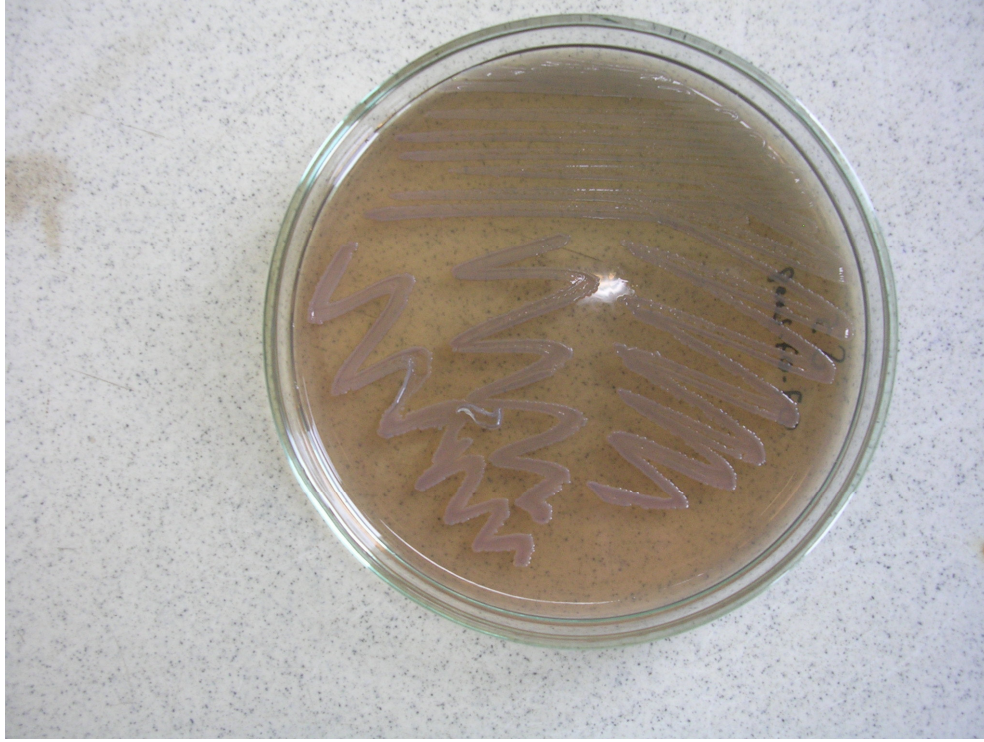
Örnekler	Örnek sayısı (n)	İzolasyon oranı (%)	VT1 (%)	VT2 (%)
Dışkı Örnekleri	150	2 (1,3%)	-	-
Süt Örnekleri	150	2 (1,3%)	1 (50%)	-

Çalışmada 250 farklı sığırdan elde edilen örneklerden izole edilen *E.coli* O157:H7 suşlarından 3'ü 2 yaş üzerindeki sığırlara, 1'i ise 2 yaş altındaki sığıra ait olduğu belirlendi (Çalışmada ilk 50 sığırdan hem süt hem dışkı örneği alınmıştır). İzole edilen E.coli O157:H7 suşlarının yaşa göre dağılımı Çizelge 5'te belirtilmiştir.

Çizelge 5. Örneklerden izole edilen *E. coli* O157:H7 suşlarının yaşa göre dağılımı

Yaş grubu	Örnek sayısı (n)	İzolasyon oranı (%)
2 yaş altı	82	1 (% 1,2)
2 yaş ve üzeri	168	3 (% 1,8)
Toplam	250	4(% 1,6)

Çalışmada *E. coli* O157:H7'nin CT-SMAC agarda sorbitolü fermente edemediği ve β -glukuronidaz enzim aktivitesine sahip olmadığı için renksiz koloniler oluşturduğu gözlemlendi. *E. coli* O157:H7'nin CT-SMAC agardaki üremesi Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3 CT-SMAC agarda sorbitol ve β -glukuronidaz negatif *E. coli* O157:H7 kolonileri

SMAC agarda renksiz koloni oluşturan tüm şüpheli suşlara API 20E ticari kiti ile beta-galaktosidaz, arjinin hidrolaz, lizin ve ornitin dekarboksilaz, sitrat, H₂S, üreaz, aminaz, indol, VP, gelatinaz, glukoz, mannitol, inositol, sorbitol, ramnoz, sukroz, melibiose, amygdalin, arabinoz testi uygulandı. *E.coli* suşlarının test sonuçları Şekil 4'te

belirtilmiştir. *E.coli* olarak tespit edilen suşların bu testlere verdiği reaksiyonlar Çizelge 6'da belirtilmiştir.

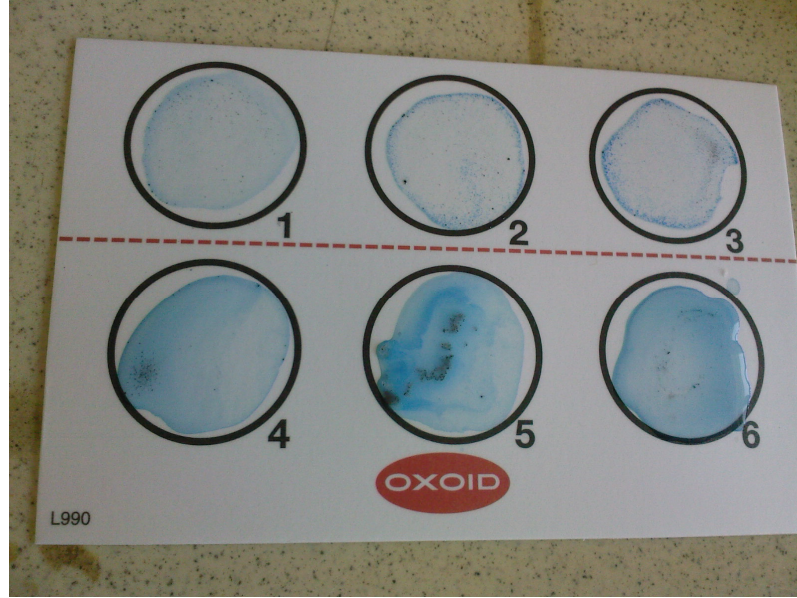


Şekil 4. *E.coli* suşlarının API 20E kitinde verdiği reaksiyonlar

Çizelge 6 İzole edilen *E. coli* O157:H7 suşlarının API 20E test sonuçları

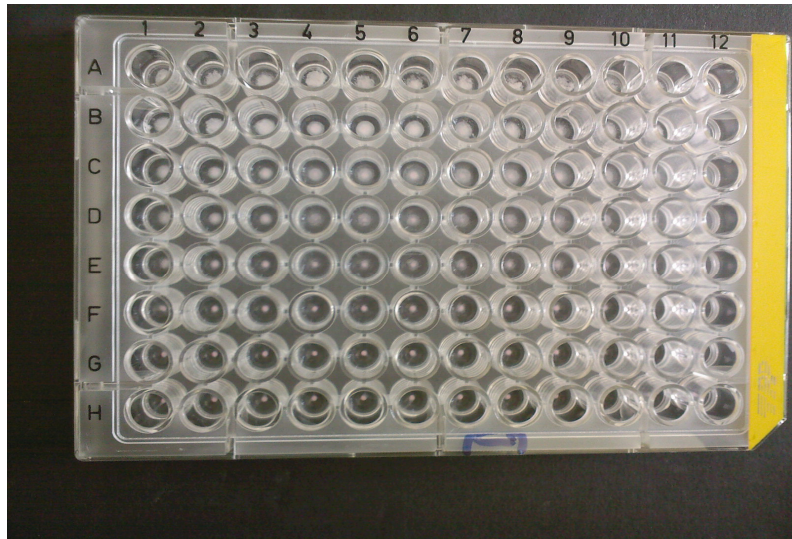
Test	Sonuç
ONPG	+
ADH	-
LDC	+
ODC	+
CIT	-
H ₂ S	-
ÜRE	-
TDA	-
IND	+
VP	-
GEL	-
GLU	+
MAN	+
INO	-
SOR	+
RHA	+
SAC	+
MEL	+
AMY	-
ARA	+

CT-SMAC agarda sorbitol ve β -glukuronidaz negatif şüpheli kolonilerin biyokimyasal özellikleri belirlendikten sonra yapılan lateks aglutinasyon testi sonucunda dışkı ve süt örneklerinden elde edilen izolatların 3'ü (% 2), *E. coli* O157 olarak belirlendi. Yapılan lateks aglutinasyon testi ve değerlendirilmesi Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 5 *E. coli* O157 Lateks Testi ve değerlendirilmesi. Pozitif kontrol (1), pozitif reaksiyon (2,3), negatif kontrol (4), negatif reaksiyon (5,6)

Yapılan incelemelerle *E. coli* O157:H7 olduğu tespit edilen suşların toksin üretip üretmediğinin belirlenmesi amacıyla toksin belirleme kiti kullanıldı. Suşlardan sadece 1'inin VT1 ürettiği tespit edildi. Yapılan VTEC-RPLA toksin belirleme kiti ve değerlendirmesi Şekil 6'da belirtilmiştir.



Şekil 6 *E. coli* O157:H7 toksin belirleme kiti ve değerlendirilmesi

4. TARTIŞMA

1945 yılında serogrup 011 suşlarının bir bakım evindeki çocuklarda ishal salgınlarına yol açtığıın gösterilmesi ile bağırsak patojeni olarak tanımlanmaya başlanan *E.Coli*, günümüzde birçok infeksiyona yol açan suşları ile en zararlı patojenler arasında gösterilmektedir (Topçu ve ark. 2002, Bidet ve ark. 2005). 50 den fazla serotipi bulunan EHEC'in en yaygın tipi olan *E.Coli* O157:H7, insanlarda kanlı veya kansız diyare, hemorajik kolit, hemolitik üremik sendrom ve trombotik trombositopenik purpura olarak tanımlanan ciddi ve genellikle letal etkili infeksiyonlara neden olarak son yıllarda adından sıkça söz ettirmektedir (Zhao ve ark. 1995, Ünlütürk ve Turantaş 1998, Dunn 2003, Baets ve ark. 2004).

Ruminantlar özellikle sığırlar ve genç süt inekleri, STEC'nin ve özellikle *E. coli* O157:H7'nin birincil rezervuarı olarak kabul edilmektedir (Zhao ve ark. 1995, Dunn 2003, Caprioli ve ark. 2005). Sığır populasyonlarında yapılan çalışmalarda *E. coli* O157:H7 prevalansının A.B.D.'nde % 1-% 5 (Zhao ve ark. 1995), çeşitli avrupa ülkelerinde % 1-% 13 (Blanco ve ark. 2001) arasında olduğu bildirilmektedir.

E. coli O157:H7'ye sığırlar dışında koyun, keçi, domuz, köpek ve at gibi evcil hayvanlarda, ayrıca geyik, kuş gibi vahşi hayvanlarda da rastlanmıştır. Vahşi hayvanlarla temas eden evcil hayvanlara da bulaşmanın olabileceği belirtilmiştir. Canlı tavuklarda *E. coli* O157:H7'ye rastlanmamasına rağmen satış yapılan tavuklardan ve hindilerin intestinal sistemlerinden izole edilmiştir. Deneysel çalışmalarda da civcivlerin çekumunda üreyebildikleri gözlemlenmiştir (Dunn 2003, Caprioli ve ark. 2005).

Sığır ve süt ineklerinde *E. coli* O157:H7 izolasyonuna yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. Wells ve arkadaşları, 1266 sağlıklı sığırdan aldıkları süt rneklarinin 18'inde (1.4%) *E. coli* O157:H7 izolasyonu gerçekleştirdiklerini bildirmiştir. Amerika Washington'da 3570 dışkı rneği alınarak yapılan bir çalışmada ise 10 adet (0.28%) *E. coli* O157:H7 izolasyonu gerçekleştiği bildirilmiştir (Hancock ve ark. 1994).

Ülkemizde de sığır ve süt ineklerinde *E. coli* O157:H7 izolasyonuna yönelik çalışmalar yapılmıştır. Van yöresinde yapılan bir çalışmada, sağlıklı süt sığırlarından alınan 312 dışkı örneğinden 4'nde (1.28%) *E. coli* O157:H7 saptandığı belirtilmiştir (abalar ve ark. 2001). Yılmaz ve ark. (2002), Türkiye'deki sığırlarda *E. coli* O157:H7'ye rastlanma sıklığını araştırdıkları bir çalışmada, İstanbul'dan alınan 330 rektal swap örneğinin 88'inde (26.7%) SMAC agarda sorbitol-negatif koloni gözlemlendiğini, bunlardan 13'nden (3.93%) de *E. coli* O157:H7 izolasyonu gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada klinik olarak sağlıklı görünen sığırlara ait 150 rektal dışkı rneği incelendi. İncelen rnekların 3'nden (% 2) *E. coli* O157 izole edilirken, *Escherichia coli* antiserum testi sonucunda 2 rneğin (% 1,3) *E. coli* O157:H7 olarak tespit edildiği belirtilmektedir. Çalışmadaki %1,3'lk izolasyon oranı Türkiye'de ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Sığırların normal bağırsak mikroflorasının bir parçası olan *E. coli* O157:H7 varlığı sığırların yaşıyla da değişim göstermektedir. Yapılan çalışmalarda ge sığırların dışkılarında özellikle sütten kesildikten sonra erişkinlere göre çok daha yoğun lde bu patojene rastlanmıştır (Dunn 2003, Caprioli ve ark. 2005). Wells ve ark. (1991), farklı yaşlardaki sığırlarda *E. coli* O157:H7 prevalansını araştırdıkları bir çalışmada; 210 buzağının 5'inde (2.3%), 394 dvenin 12'sinde, fakat 662 yetişkin sığırın sadece 1'inde (0.15%) *E. coli* O157:H7 izolasyonu gerçekleştirdiğini bildirmiştir. Yılmaz ve ark. (2002), sığırlarda yaptıkları çalışmada, izolasyonun genellikle 2 yaşındaki hayvanlardan yapıldığını bildirmiştir. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda da yaz aylarında *E. coli* O157:H7 sayısının arttığı tespit edilmiştir (Dunn 2003, Caprioli ve ark. 2005). Aslantaş ve ark. (2006), sığırlarda her ay örnek alarak yaptıkları bir çalışmada, *E. coli* O157:H7

izolasyonunun Temmuz ve Ekim aylarında diğer aylara göre daha yüksek, Şubat ayında ise en düşük gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada izole edilen suşların 3'ünün (%1,8) 2 yaş üzerindeki sığırlara, 1'inin (%1,2) ise 2 yaş altındaki sığıra ait olduğu belirlendi. Çalışmada yetişkin sığırlardan gerçekleşen izolasyon oranının genç sığırlardakine göre yüksek çıkması diğer çalışmalarla farklılık göstermektedir. Bu farklılıkta coğrafik açıdan değişkenlerin etkili olabileceği düşünüldü. Çalışmada tüm örnekler haziran ve temmuz aylarında toplandığı için mevsimsel bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Çiğ sütlerden *E. coli* O157:H7 izolasyonuna yönelik yapılan çeşitli çalışmalarda, çiğ sütlerde prevalansın oldukça düşük olduğu ve % 0 ile % 10 arasında değiştiği belirtilmektedir (Padhye ve Doyle, 1991). Heuvelink ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada, 1011 çiğ süt örneğinden hiç *E. coli* O157 izolasyonu gerçekleşmediğini bildirmişlerdir. İtalya'da yapılan sorbitol-negatif *E.coli* suşlarının araştırıldığı bir çalışmada ise, inek ve keçilere ait toplam 144 çiğ süt örneğinden sadece 1'inden *E. coli* O157:H izole edildiği belirtilmiştir (Picozzi ve ark. 2005). Arjantinde immunomanyetik separasyon yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, 150 süt örneğinin hiç birinden STEC O157 izolasyonu yapılmadığı belirtilmiştir (Roldan ve ark. 2007). Türkiye'de Öksüz ve ark.'nın (2004) çiğ süt ve çiğ süttten yapılmış peynirlerde *E. coli* O157 insidansına yönelik yaptıkları bir çalışmada 100 çiğ süt örneğinden sadece 1'inde (%1) *E. coli* O157 tespit edildiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada 150 çiğ süt örneğinin 2'sinden (1,3%) *E. coli* O157:H7 tespit edildi. Bu sonuç Türkiye'de ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir.

E. coli O157:H7 serotipinin çeşitli gıda, klinik ve çevre örneklerinde aranmasına yönelik çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Klasik yöntemler biyokimyasal testler üzerine kurulmuştur. Gelişmiş testler ise genellikle serolojik yöntemler üzerine dayandırılmıştır ve genellikle araştırma laboratuvarlarında uygulanmaktadır (Halkman ve ark. 2001). Klasik yöntemlerle *E. coli* O157:H7 izolasyonunda, yoğun olarak bulunan normal flora varlığına bağlı olarak sıklıkla yalancı negatif sonuçlar alınabilmektedir. Özellikle sığır orijinli fekal

örneklerde *E. coli* O157:H7 tespiti, bakteri sayısının çok düşük olmasından dolayı oldukça güçtür. Hedef bakterinin sıvı ve katı besiyerlerinde gelişebilen yakın akraba türleri içeren flora içindeki oranının en düşük % 1 olması gerektiği olarak belirtilmektedir (Halkman ve ark. 2001, Tutenel ve ark. 2003).

Selektif katı besiyeri olarak günümüzde en yaygın olarak kullanılan sorbitollü MacConkey (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 besiyerinde renksiz koloniler oluşturmakta buna karşın sorbitolu kullanılan bakterilerin oluşturduğu asitlik, bir pH indikatörü yardımıyla kolonilerin kırmızı renkte görünmesine neden olmaktadır (Koreman ve ark. 1997, Halkman ve ark. 2001, Topçu ve ark. 2002, Dunn 2003). Yapılan çalışmalarda SMAC agar %100 duyarlı, % 85 spesifik ve % 86 doğru sonuç veren bir besiyeri olarak tanımlanmış iken ileri araştırmalarda SMAC agarın gıda analizlerinde dışkı analizinde olduğu kadar başarılı olmadığı belirtilmiştir (Halkman ve ark. 2001). Fekal örneklerde bulunabileceği gibi daha çok çiğ süt ve dana etinden izole edilen *Escherichia hermannii* sorbitol negatif olup *E. coli* O157 antiserumu ile aglutine olabilmekte ve böylece *E. coli* O157 ile karıştırılabilmektedir. Bu yüzden SMAC agarın yanı sıra sellobiyoz-MacConkey agarda bazı araştırmacılar tarafından kullanılmakta ve böylece *E. hermannii* sellobiyoz fermantasyonu ile *E. coli* O157'den ayırt edilebilmektedir (Halkman ve ark. 2001).

SMAC agar çeşitli selektif ilaveler ile desteklenmekte ve besiyerine daha fazla selektivite kazandırılmaya çalışılmaktadır. Bu amaçla en çok cefiksime ve potasyum tellürit kullanılmaktadır. (Halkman ve ark. 2001, Dunn 2003). Zadik ve ark.'nın (1993) besiyerlerine yönelik yaptığı bir çalışmada, CT-SMAC agarın, VT oluşturmayan diğer *E. coli*'lerin üremesini % 67 oranında, *Proteus* spp., *Aeromonas* spp., *Morganella* spp. ve *Providencia* spp.'nin üremesini % 97 oranında inhibe ettiği bildirilmiştir.

Wells ve ark. (1991), 1266 sağlıklı süt ineği dışkısında *E. coli* O157:H7 izolasyonuna yönelik mTSB ve SMAC agar kullandıkları ve mTSB'de 24 saatlik bir ön zenginleştirme uyguladıkları bir çalışmada, 18 (% 1,4) örnekte izolasyon yaptıklarını bildirmişlerdir. Yine mTSB ve SMAC agar kullanılarak yapılan bir çalışmada; mTSB'de

18 saatlik bir ön zenginleştirme ve SMAC agarda 18-24 saatlik inkübasyon sonucunda 995 dışkı örneğinden 31 (% 3,11) izolasyon gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Zhao ve ark. 1995).

Bu çalışmada dışkı örnekleri için Zhao ve ark. (1995) kullandıkları yönteme benzer şekilde ön zenginleştirme besiyeri olarak novobiocin katkılı mTSB kullanıldı ve örnekler 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Bu aşamadan sonra E.coli O157 izolasyonunda en sık kullanılan selektif besiyeri olan CT-SMAC agara ekim yapıldı ve örnekler 24 saat inkübasyona bırakıldı. İncelenen 150 dışkı örneğinin 2'sinden (% 1,3) *E. coli* O157:H7 izole edildi. Çalışmada kullanılan çiğ süt örneklerinden izolasyonda, Doyle ve Schoeni (1987) tarafından gıdalardan *E. coli* O157:H7 izolasyonu için geliştirilen yöntem kullanıldı. Yine önzenginleştirme besiyeri olarak novobiocin katkılı mTSB kullanıldı ve selektif besiyeri olan CT-SMAC agara ekim yapıldı. İncelenen 150 süt örneğinin 2'sinden (% 1,3) *E. coli* O157:H7 izole edildi. Dışkı ve süt örneklerinden elde edilen izolasyon oranları ülkemizde ve dünyada gerçekleştirilen çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Wang ve ark.(2002) , 81 *E. coli* O157:H7 suşunun virulans faktörlerini araştırdıkları bir çalışmada, 32 (%39) suşun VT1, 68 suşunda VT2 (%83) ürettiklerini belirtmişlerdir.

Çalışmada izole edilen 4 *E. coli* O157:H7 suşundan 1'inin (%25) Stx1 ürettiği tespit edildi. İzole edilen suşlardan hiç birinin Stx2 üretmediği belirlendi. Bu sonucun diğer çalışmalarla farklılık göstermesi izolatların sayısının yeterli olmaması ile açıklanabilir.

Bu çalışma ile Ege bölgesinde bulunan sığırlardan kültürel yöntemler kullanılarak *E. coli* O157:H7 izolasyonu gerçekleştirildi ve Türkiye'de gerçekleştirilen bir çok çalışmadan farklı olarak suşların verotoksin üretip üretmedikleri belirlendi. Sunulan bu çalışmanın, Türkiye'de gerçekleştirilecek *E. coli* O157:H7 izolasyonuna ve verotoksin araştırmalarına yönelik diğer çalışmalar için yarar sağlayabileceği düşünülmüştür.

5. SONUÇ

Ege bölgesinde bulunan sığırlardan alınacak süt ve dışkı örneklerdeki *E. coli* O157:H7 bakterisinin varlığı ve verotoksin üretilip üretilmediğinin belirlenmesinin amaçlandığı bu çalışmada, sığırlardan alınan 150 dışkı ve süt örneğinden 2'ser (% 1,3) *E. coli* O157:H7 izole edildi. Süt örneklerinden izole edilen *E. coli* O157:H7'lerden sadece birinin VT1 ürettiği belirlendi. Böylece Ege Bölgesi sığırlarında *E. coli* O157:H7 varlığı ve verotoksin ürettikleri gösterilmiş oldu.

Çalışmada klasik yöntemler kullanıldı. Böylece *E. coli* O157:H7 izolasyonunda kültürel yöntemlerin kullanılabilirliği ve verotoksin analizin yapılabileceği belirlendi. Sunulan bu çalışmanın Türkiye'de gerçekleştirilecek verotoksin belirlenmesine yönelik diğer çalışmalara faydalı olabileceği düşünüldü.

Bu çalışma ile; *E. coli* O157:H7'nin insanlar için patojen olduğu ve dünyada letal etkili bir çok salgına yol açtığı göz önüne alınırsa, çiftlikler ve köy evlerinden başlayarak gıda üretim ve satış yerlerinde, hammaddeden son ürüne kadar genel hijyenik kuralların uygulanmasının ve kros-kontaminasyonu engelleyici önlemlerin alınmasının gerekliliği ortaya konuldu.

ÖZET

Ege Bölgesindeki Sığırların Süt ve Dışkı Örneklerinden *Escherichia Coli* O157:H7 İzolasyonu ve Verotoksinlerinin Belirlenmesi

Escherichia coli O157:H7 ilk kez 1982 yılında ABD de meydana gelen 2 ayrı hemorajik kolitis salgını sonucu tanımlanmaya başlamıştır ve en sık izole edilen enterik patojenlerden biridir. *E. coli* O157:H7 ile infekte olan kişiler asimptomatik olabilir, kanlı yada kansız diare, hemolitik üremik sendrom ve trombotik trombositopenik purpura semptomları gösterebilir. Shiga-benzeri toksin üreten *Escherichia coli* (STEC), Vero toksin üreten *E.coli* (VTEC) olarak ta adlandırılır, infeksiyonu gıda kaynaklıdır ve sığırlar STEC infeksiyonunun birincil rezervuarı olarak belirtilmektedir.

Çalışmamızda, Ege bölgesinde bulunan sığırlardan alınacak süt ve dışkı örneklerdeki *E. coli* O157:H7 bakterisinin varlığı ve verotoksin üretilip üretilmediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada, incelenen 150 süt ve 150 dışkı örneğinden 2 si süt diğer 2 si ise dışkı örneklerinden olmak üzere 4 (%1,3) *E. coli* O157:H7 izole edildi. Süt örneklerinden izole edilen suşlardan 1'inin VT1 ürettiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler : Sığır, *E.coli* O157:H7, İzolasyon, Verotoksin

SUMMARY

The Isolation of *Escherichia Coli* O157:H7 in milk and faeces of cattle in Egean Region and determination of their verotoxin

Escherichia coli O157:H7 was first identified as a human pathogen following two geographically separate outbreaks of hemorrhagic colitis in the United States in 1982. *E. coli* O157:H7 was one of the most common enteric pathogen isolated. Persons infected with *E. coli* O157:H7 may be asymptomatic, symptoms may include diarrhea, bloody diarrhea, hemolytic-uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), also known as Vero toxin-producing *E. coli* (VTEC), infection in humans is food-borne and that cattle act as a reservoir for STEC infection. The aim of this study was, investigate the presence of *E. coli* O157:H7 in milk and faeces of cattle that taken from Aydın and İzmir region and determine their verotoxin production capability.

In this study, 4 (%1,3) *E. coli* O157:H7 isolated from 150 milk and 150 faeces. Two *E. coli* O157:H7 isolated from both milk and faeces sample and we determine that one of the isolate taken from milk produce VT1.

Key Words : Cattle, *E.coli* O157:H7, Isolation, Verotoxin

KAYNAKLAR

Akay H, Duranay M, Akay A (2006) *Üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen mikroorganizmaların dağılımı ve escherichia coli suşlarında antibiyotik duyarlılığı*, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi, 69(1), s: 1-4.

Akça, M.Ö (1994) *Gastroenteritli olgularda etken olarak E.coli O157:H7 araştırılması*, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.

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

Aydın N, Paracıkoğlu J (2006) *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*, 1. Baskı. İlke-Emek Yayınları, Ankara.

Baets LD, Taelen IVD, Filette MD, Pierard D, Allison L, Greve HD, Hernalsteens JP, Imberechts H (2004) *Genetic Typing of Shiga Toxin 2 Variants of Escherichia coli by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis*, Applied and Environmental Microbiology, 70(10), p: 6309-6314.

Bekar, M (1997) *Enterobacteriaceae Familyası Mikroorganizmaların Genel Karakterleri ve Tanı Yöntemleri*, Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayın No: 97-1, Ankara.

Bidet P, Mariani-Kurkdjian P, Grimont F, Brahimi N, Courroux C, Grimont P, Bingen E (2005) *Characterization of Escherichia coli O157:H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France*, Journal of Medical Microbiology, 54, p: 71-75.

Bilgehan, H (2004) *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları, İzmir.

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

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

Boerlin P, Mceven SA, Petzold FB, Wilson JB, Jhonson RP, Gyles CL (1999) *Associations Between Virulence Factors of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli and Disease in Humans*, Journal of Clinical Microbiology, 37(3), p :497-503.

Brooks GF, Butel JS, Morse SA (2004) Enteric Gram Negative Rods (Enterobacteriaceae), Chapter16, in: Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. Twenthy Third Edition, Mcgraw Hill Education, Boston, p: 252-255.

Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E (2005) *Enterohemorrhagic Escherichia coli: Emerging Issues on Virulence and Modes of Transmission*, Veterinary Research, 36, p :289-311.

Chapman PA, Malo ATC, Siddons CA, Harkin M (1997) *Use of Commercial Enzyme Immunoassays and Immunomagnetic Separation Systems for Detecting Escherichia coli O157 in Bovine Fecal Samples*, Applied and Environmental Microbiology, 63(7), p: 2549-2553.

Clark CG, Johnson S, Joohnson RP (1995) *Further characterisation of a monoclonal antibody reactive with Escherichia coli O157:H7*, Journal of Medical Microbiology, 43 (4), p: 262-269.

Cohem J, Powderly WG (2004) Infectious Diseases, The Enterobacteriaceae, Second Edition, Mosby, Vol:1, Chapter 228, Edinburg, London, Oxford.

Çabalar M, Boynukara B, Gülhan T, Ekin İH (2001) *Prevalence of Rotavirus, Escherichia coli K99 and O157:H7 in Healthy Dairy Cattle Herds in Van, Turkey*, Turk Journal of Veterinary Animal Science, 25, p: 191-196.

Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Moon HW, O'brien AD (1998) *Escherichia coli O157:H7 Requires Intimin for Enteropathogenicity in Calves*, Infection And Immunity, 66(9), p: 4560–4563.

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

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

Durso LM, Smith D, Hutkins RW (2004) *Measurements of Fitness and Competition in Commensal Escherichia coli and E. Coli O 157:H7 Strains*, Applied and Environmental Microbiology, 70(11), p: 6466-6472.

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

Farmer JJ, Davis BR (1985) *H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting Escherichia coli O157:H7 associated with hemorrhagic colitis*, Journal of Clinical Microbiology, 22, p: 620-625.

Franzolin MR, Alves RCB, Keller R, Gomes TAT, Beutin K, Barreto ML, Milroy C, Strina A, Riberio H, Trabusi LR (2005) *Prevalence of Diarrheagenic Escherichia coli in Children with Diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil*, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 100(4), p: 359-363.

Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang W, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H (2002) *Escherichia coli Harboring Shiga Toxin 2 Gene Variants: Frequency and Association with Clinical Symptomes*, The Journal of Infections Diseasee, 185, p: 74-84.

Friedrich AW, Köck R, Bielaszewska M, Zhang W, Kacch H, Mathys W (2005) *Distrubution of the Urease Gene Cluster Among and Ureas Activities of Enterohemorrhagic Escherichia coli O 157 Isolates fron Humans*, Journal of Clinical Microbiology, 43(2), p: 546-550.

Girard F, Batisson I, Frankel GM., Harel J, Fairbrother JM (2005) *Interaction of Enteropathogenic and Shiga Toxin-Producing Escherichia coli and Porcine Intestinal Mucose:Role of Intimin and Tir in Adherence*, Infection and Immunity, 73(9), p: 6005-6016.

Glass KA, Loeffelholz JM, Ford JP, Doyle MP (1992) *Fate of Escherichia coli O157:H7 as Affected by PH or Sodium Chloride and in Fermented Dry Sausage*, Applied and Environmental Microbiology, 58, p: 2513-2516.

Gorbach , Barleth, Blacklow (2004) *İnfectious diseases , Chapter 70, Escherichia coli and Other Shiga-Toxin Producing E. coli* ,Lippincott, Philedelphia, 643-647.

Gupro A, Hunter SB, Bidol SA, Dietrich S, Kincaid J, Salehi E, Nicholson L, Genese CA, Weinstein ST, Marengo L, Kimura AC, Brooks JT (2004) *Escherichia coli O157 Cluster Evalation*, Emerging Infectious Diseases, 10(10), p:1856-1858.

Gyles CL (2006) *Shiga toxin-producing Escherichia coli : An overview*, Journal of Animal Science, 2007.85:E45-E62.

http://jas.fass.org/cgi/content/full/85/13_suppl/E45

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

Hancock DD, Besser TE, Kinsel ML, Tarr PI, Rice DH, Paros MG (1994) *The prevalence of Escherichia coli O157.H7 in dairy and beef cattle in Washington State*, Epidemiol Infection, 113(2), p: 199-207.

Henderson, Brian (2003) Bacteria Evasion of Host Immune Responses, West Nyack, NY, USA, 257-260.

[<http://site.ebrary.com/lib/deulibrary/Doc?id=10070373&ppg=275>]

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

İzgür M, Akan M (2002) Koli İnfeksiyonları. In: Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Medisan Yayınevi, Ankara, s:55-59.

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

Kasper, Dennis L, Harrison (2006) Principles of Internal Medicine, Disease Caused by Gram-Negative Enteric Bacilli, 16th edition, Blacklick, OH, USA, 878-879.

[<http://site.ebrary.com/lib/deulibrary/Doc?id=10115204&ppg=908>]

Kehl SC (2002) *Role of Laboratory in the Diagnosis of Enterohemorrhagic Escherichia coli Infections*, Journal of Clinical Microbiology, 40, p: 2711-2715.

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

Kimato K, Shima T, Shimizu M, Tonako D, Isobe J, Gyobu Y, Wstshiki M, Nagai Y (2005) *Rapid Categorization of Pathogenic Escherichia coli by Multiplex PCR*, Microbiology Immunology, 49(6), p: 485-492.

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

Koreman EW, Allen SD, Janda WM, Shchreckerberger PG, Winn WC (1997) Color Atlas and Teret Book of Diagnostik Microbiology, Enteric Gram Negative Rods, Chapter 4, Fifth Edition, Lippincott, Philedelphia, Newyork,196-199.

Kuntz TB, Kuntz ST (1999) *Enterohemorrhagic E.coli infection*, Prim Care Update OB/GYNS, p:192-196.

Kusumato M, Okitsu T, Nishiya Y, Suzuki R, Yamai S, Kawamura Y (2001) *Spontaneous Reactivation of Shiga Toxins in Escherichia coli O157:H7 Cells Caused by Transposon Excision*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 92(2), p: 114-120.

Maldonado Y, Fiser JC, Nakatsu CH, Bhunia AK (2005) *Cytotoxicity Potential and Genotypic Characterization of Escherichia coli Isolated from Environmental and Food Sources*, Applied and Environmental Microbiology, 71(4), p: 1890-1898.

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

Murinda SE, Nguyen LT, Ivey SJ, Almeida RA, Oliver SP (2002) *Novel single-tube agar-based test system for motility enhancement and immunocapture of Escherichia coli O157:H7 by H7 flagellar antigen-specific antibodies*, Journal of Clinical Microbiology, 40, p: 4685-4690.

Okrend AJG, Rose BE (1992) *Isolation of Escherichia coli O157:H7 using O157 specific antibody coated magnetic beads*, Journal of Food Protection, 55, p: 214-217.

Olesen B, Neimann J, Böttiger B, Ethelberg S, Schiellerop P, Jensen C, Helms M, Schectz F, Olsen KEP, Krogh K, Petersen E, Molbak K, Gerner-Smidt P (2005) *Etiology of Diarrhea in Young Children in Denmark; a Case Control Study*, Journal of Clinical Microbiology, 43(8), p: 3636-3641.

Orlandi PP, Magalhaes GF, Matos NB, Silva T, Penatti M, Nogueira PA, Peraira da Silva LH (2006) *Etiology of Diarrheal Infections in Children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon Region, Brazil)*, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 39(4), p: 507-517.

Öksüz Ö, Arıcı M, Kurultay S, Gümüş T (2004) *Incidence of Escherichia coli O157 in raw milk and pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey*, Food Control, 15, p: 453-456.

Padhye NY, Doyle MP (1991) *Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic Escherichia coli O157 in food*, Applied and Environmental Microbiology, 57, p: 2693-2698.

Padhye NV, Doyle MP (1992) *Escherichia coli O157:H7 epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food*, Journal of Food Protection, 55, p: 555-565.

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), p: 2158–2161.

Park S, Worobo RB, Durst RA (1999) *Escherichia coli O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 39, s: 481-502.

Petridis H, Kidder G, Ogram A (2002) *E. coli O157:H7 A Potential Health Concern*, University of Florida, Gainesville, 32611.
<http://edis.ifas.ufl.edu>

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

Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL (2005) *Epidemiology of Escherichia coli O 157:H7 Outbreaks, United States, 1982-2002*, Emerging Infectious Diseases, 11(4), p: 603-609.

Ritchie JM, Wagner PL, Acheson DWK, Waldor MK (2003) *Comparison of Shiga Toxin Production by Hemolytic-Uremic Syndrome- Associated and Bovine-Associated Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Isolates*, Applied and Environmental Microbiology, 69(2), p: 1059-1066.

Roldan ML, Chinen I, Otero JI, Mihwebsky ES, Alfaro N (2007) *Isolation, characterization and typing of Escherichia coli O157:H7 strains from beef products and milk*, Revista Argentina de Microbiología, 39, p: 113-119.

Serpen, A (2007) *Gıda güvenliğini ve sağlığını tehdit eden gıda kaynaklı gizli zoonotik tehlike E.coli O157:H7*, İnovet Aylık Hayvan Sağlığı Dergisi – Mayıs 2007 Sayı: 41.

Semanchek JJ, Golden DA (1998) *Influence of growth temperature on inactivation and injury of E.coli O157:H7 by heat, acid and freezing*, Journal of Food Protection, 61 (4), s: 395-401.

Tamplin ML (2005) *Inactivation of Escherichia coli O 157:H7 in Simulated Human Gastric Fluid*, Applied and Environmental Microbiology, 71(1), p: 320-325.

Taormina PJ, Beuchat LR (1999) *Behavior of enterohemorrhagic E.coli O157:H7 on alfalfa sprouts during the sprouting process as influenced by treatments with various chemicals*, Journal of Food Protection, 62 (8), s: 850-856.

Tarr PI, Neill MA (2005) *Using antibiotics in suspected haemolytic-uraemic syndrome*, 330, p: 1209.

[\[http://bmj.bmjournals.com/cgi/content/extract/330/7501/1209\]](http://bmj.bmjournals.com/cgi/content/extract/330/7501/1209)

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

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

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

Tsutsumi R, Ichinohe N, Shimoaki O, Obata F, Takahahi K, Inada K, Sasaki M, Sato S, Chida S (2004) *Homologous and Heterologous Antibody responses to Lipopolysaccharide after Enterohemorrhagic Escherichia coli Infection*, Microbiology Immunology, 48(1), p: 27-38.

Tutenel AV, Pierard D, Vandekerchove D, Hoof JV, De Zutter L (2003) *Sensitivity of methods for the isolation of Escherichia coli O157 from naturally infected bovine faeces*, Veterinary Microbiology, 94, p: 341-346.

Ustaçelebi Ş (1999) Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Bakteriyoloji,1. Basım, Güneş Kitapevi, Ankara, 480-485.

Ünlütürk A, Turantaş F (1998) Gıda Mikrobiyolojisi, 1. Basım, Mengi Tan Basımevi, İzmir.

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

Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN, Downes FP, Martin ML, Griffin PM, Ostroff SM, Potter ME, Tauxe RV, Wachsmuth IK (1991) *Isolation of Escherichia coli serotype O157:H7 and other shiga-like-toxin-producing E.coli from dairy cattle*, Journal of Clinical Microbiology, 29, p: 985-989.

Yang ZM, Kovar J, Kim J, Nietfelt J, Smith DR, Moxley RA, Olson ME, Fey PD, Benson AK (2004) *Identification of Common Subpopulations of Non-Sorbitol-Fermenting, β -Glucuronidase- Negative Escherichia coli O 157:H7 from Bovina Production Environments and Human Clinical Samples*, Applied and Environmental Microbiology, 70(11), p: 6846-6854.

Yatsuyanagi J, Saito S, Sato H, Miyojimo Y, Amono KI, Enomoto K (2001) *Characterization of Enteropathogenic and Enteroaggregative Escherichia coli Isolated from Diarrheal Outbreaks*, Journal of Clinical Microbiology, 40(1), p: 294-29

Yilmaz A, Gun H, Yilmaz H (2002) *Frequency of Escherichia coli O157:H7 in Turkish cattle*, Journal of Food Protection, 10, p: 1637-1640.

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

Zhao T, Doyle MP, Shere J, Garber L (1995) *Prevalence of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in a Survey of Dairy Herds*, 61,4, p:1290-129

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Aydın'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Aydın'da, lise öğrenimini Bursa A.O.S. Fen Lisesinde tamamladı. 1998 yılında Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünü kazandı. 1 yıl Hacettepe Üniversitesi Yabancı Diller Y.O.'nda İngilizce eğitimi aldıktan sonra 2004 yılında Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünden mezun oldu. 2004 yılından itibaren T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığında Gıda Kontrolörü olarak çalışmaktadır. 2005 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimime başladı.

İyi derecede ingilizce bilmektedir.

TEŐEKKÖR

Tez çalıŐmalarım boyunca ilgi ve yardımlarını gördüğüm danışmanım Yard. Doç. Dr. Serap SAVAŞAN'a, araŐtırmalarımın yapılmasında katkıda bulunan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Osman KAYA'ya, tezimin tüm aŐamalarında destek ve yardımlarını esirgemeyen ADÜ Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, çalıŐmalarım sırasında araŐtırmalarımın yapılmasında katkıda bulunan AraŐ. Gör. Serten TEKBIYIK'a teşekkür ederim.