

T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KOORDİNASYON BİRİMİ

**ÇESİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN KANATLI ORİJİNLİ  
*E.COLİ* O157'NİN TOKSİN GENLERİNİN BELİRLENMESİ VE  
ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIKLARI**

**Proje No: TSA-09-883**

**NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ**

**SONUÇ RAPORU**

**Proje Yürütücüsü**  
Prof. Dr. Fuat AYDIN  
Veteriner Fakültesi  
Klinik Öncesi Bilimler Bölümü  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı  
Birimi/Bölümü

Yrd. Doç. Dr. Seçil ABAY  
Veteriner Fakültesi, Klinik Öncesi Bilimler Bölümü  
Prof. Dr. Zafer GÖNÜLALAN  
Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü  
Prof. Dr. H.İbrahim ATABAY  
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü  
Yrd. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ  
Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü  
Biolog Sevgi ERDOĞDU  
Veteriner Fakültesi, Klinik Öncesi Bilimler Bölümü  
Araş. Gör.Harun HIZLISOY  
Veteriner Fakültesi, Klinik Öncesi Bilimler Bölümü

Nisan 2012

KAYSERİ



**TEŞEKKÜR**

“Çeşitli kaynaklardan izole edilen kanatlı orjinli *E.coli* O157’nin toksin genlerinin belirlenmesi ve antibiyotiklere duyarlılıkları” başlıklı ve TSA-09-883 no’lu bu proje Erciyes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’nce desteklenmiştir. Bu birime şahsım ve projede yer alan yardımcı araştırmacılar adına teşekkürlerimi sunarım. 02.04.2012.

Prof. Dr. Fuat AYDIN  
Proje Yürütücüsü  
Veteriner Fakültesi  
Klinik Öncesi Bilimler Bölümü  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                   | Sayfa No |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>TEŞEKKÜR</b>                                                                                   | 3        |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>                                                                                | 4        |
| <b>ÖZET</b>                                                                                       | 6        |
| <b>ABSTRACT</b>                                                                                   | 7        |
| <b>1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM</b>                                                                  | 8        |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                                                          | 9        |
| <b>2.1. <i>Escherichia coli</i>'nin genel özellikleri</b>                                         | 9        |
| <b>2.2. <i>E.coli</i> Alt Tipleri</b>                                                             | 11       |
| <b>2.2.1. Enteropatojenik <i>E.coli</i> (EPEC)</b>                                                | 12       |
| <b>2.2.2. Enterotoksijenik <i>E.coli</i> (ETEC)</b>                                               | 13       |
| <b>2.2.3. Enteroinvasif <i>E.coli</i> (EIEC)</b>                                                  | 14       |
| <b>2.2.4. Enteroagregatif <i>E.coli</i> (EAggEC)</b>                                              | 14       |
| <b>2.2.5. Diffüz Adherent <i>E.coli</i> (DAEC)</b>                                                | 15       |
| <b>2.2.6. Enterohemorajik <i>E.coli</i> (EHEC)</b>                                                | 15       |
| <b>2.3. <i>Escherichia coli</i> O157:H7</b>                                                       | 17       |
| <b>2.4. <i>Escherichia coli</i> O157:H7'nin Biyokimyasal Özellikleri</b>                          | 18       |
| <b>2.5. <i>Escherichia coli</i> O157:H7'nin Patogenitesi ve Virulens Faktörleri</b>               | 19       |
| <b>2.5.1. Shiga like toksin</b>                                                                   | 20       |
| <b>2.5.2. LEE ( locus of enterocyte effacement), İntimin</b>                                      | 21       |
| <b>2.5.3. pO157</b>                                                                               | 21       |
| <b>2.5.4. Salgılanan bakteriyel proteinler ve Tip III sekresyon sistemi</b>                       | 21       |
| <b>2.5.5. Somatik antijen</b>                                                                     | 22       |
| <b>2.5.6. Enterohemolizin</b>                                                                     | 22       |
| <b>2.6. <i>Escherichia coli</i> O157:H7'nin Kaynağı ve Epidemiyolojisi</b>                        | 22       |
| <b>2.7. <i>Escherichia coli</i> O157:H7'nin İnsanlarda Yaptığı Hastalıklar</b>                    | 23       |
| <b>2.7.1. Hemorajik kolitis</b>                                                                   | 23       |
| <b>2.7.2. Hemorajik Üremik Sendrom</b>                                                            | 23       |
| <b>2.7.3. Trombotik Trombositopenik Purpura (TTP)</b>                                             | 24       |
| <b>2.8. <i>E. coli</i> O157:H7'nin Teşhis Yöntemleri</b>                                          | 24       |
| <b>2.8.1. Kültürel-Biyokimyasal yöntemler</b>                                                     | 24       |
| <b>2.8.2. Serolojik Yöntemler</b>                                                                 | 25       |
| <b>2.8.3. Moleküler Yöntemler</b>                                                                 | 26       |
| <b>2.9. <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Enfeksiyonunun Kontrolü ve Önleme Yolları</b>             | 27       |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                                                         | 28       |
| <b>3.1. Materyal</b>                                                                              | 28       |
| <b>3.2. Metot</b>                                                                                 | 29       |
| <b>3.2.1. Broyler tavuk etlerinden <i>E.coli</i> O157 izolasyonu</b>                              | 29       |
| <b>3.2.2. Broyler tavuklara ait barsak içeriğinden <i>E.coli</i> O157 izolasyonu</b>              | 30       |
| <b>3.2.3. Kanatlı kesimhanesinden alınan svaplardan <i>E.coli</i> O157 serotipinin izolasyonu</b> | 30       |
| <b>3.2.4. İmmunomanyetik Separasyon Yöntemi</b>                                                   | 30       |
| <b>3.2.5. Biyokimyasal testler</b>                                                                | 30       |

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| <b>3.2.6. Serolojik identifikasyon</b>  | 32 |
| <b>3.2.7. Moleküler Analiz</b>          | 32 |
| <b>4. BULGULAR</b>                      | 34 |
| <b>4.1. Biyokimyasal test sonuçları</b> | 36 |
| <b>4.2. Serolojik identifikasyon</b>    | 36 |
| <b>4.3. Moleküler Analiz</b>            | 36 |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>             | 37 |
| <b>6. KAYNAKLAR</b>                     | 39 |

## ÖZET

### ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN KANATLI ORJİNLI *E.COLI* O157'NİN TOKSİN GENLERİNİN BELİRLENMESİ VE ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIKLARI

Bu projede kanatlı orijinli çeşitli materyallerde *Esherichia coli* O157'nin prevalansının saptanması, elde edilen izolatların antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi ve moleküler yöntemle tiplendirilmesi amaçlandı. Bu amaçla Kayseri'de yetiştirilen broyler tavuklara ait 400 adet et örneği, 400 adet broiler barsak içeriği, 400 adet yumurtacı tavuklara ait dışkı örneği ve kanatlı mezbahanesinin farklı birimlerinden (haşlama tank suyu, duvar ve iç organ çıkarılma ünitesi) alınan 80 adet svap örneği çalışma kapsamında değerlendirildi. Materyaller Mart 2010 ile Şubat 2011 arasındaki bir yıl süresince 3 ay aralıklarla alındı. İzolasyon, novobiocin'li (20 mg/L) *E.coli* buyyonda 24 saat 37°C'de ön zenginleştirme, bunu takiben immunomanyetik separasyon ile SMAC (Sorbitol Mc Conkey) ve CHROM agara ekim aşamalarından oluştu. Buna göre toplam 1280 adet örneğin SMAC ve CHROM agarda meydana getirdikleri koloniler göz önünde bulundurulduğunda 116'sı *E.coli* O157 yönünden pozitif olarak değerlendirildi. Yüz onaltı örnekten alınan 334 adet koloni fenotipik testler ile *E.coli* yönünden incelendi ve tümü *E.coli* olarak doğrulandı. Bu izolatlar *E.coli* O157 açısından Lateks aglutinasyon testine tabi tutuldu ve 2 tanesi broiler dışkı ve 6 tanesi de tavuk kesimhane örnekleri olmak üzere 8 adedi pozitif bulundu. Bu 8 adet *E.coli* O157 şüpheli izolat O157PF8 ve O157PR8 primerleri kullanılarak yapılan polymerase chain reaction (PCR) testinde beklenen 420 bp büyüklüğünde bant vermedi ve tüm izolatlar bu etken yönünden negatif bulundu. Elde edilen sonuçlar Kayseri yöresinde kanatlı hayvanların ve bunlara ait et örneklerinin *E.coli* O157 serotipini taşımadıklarını göstermekle beraber değişik lokalizasyonlarda daha fazla sayıda kanatlı orijinli örneğin bu bakteri yönünden incelenmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Broyler, *Esherichia coli* O157, kanatlı kesimhanesi, yumurtacı tavuk, Immunumanyetik separasyon.

## ABSTRACT

### THE DETERMINATION OF TOXIN GENES AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITIES OF *E. COLI* O157 ISOLATED FROM VARIOUS POULTRY SOURCES.

In this project, the determination of prevalence of poultry originated *Escherichia coli* O157 in different sources, the evaluation of antibiotic susceptibilities of obtained isolates and the typing with molecular methods were aimed. For this purpose, 400 meat samples belong to Broilers grown in Kayseri, 400 intestinal contents of Broiler, 400 stool samples of laying hens and 80 swap samples taken from various units of poultry processing plant (scalding, walls and evisceration ) were evaluated in the study. The materials were taken during a year period between March 2010 and February 2011 at three month intervals. The isolation period was formed of phases including pre-enrichment in *E.coli* broth with novobiocin (20mg/L) for 24 hours at 37°C, then immunomagnetic separation and plating on SMAC (Mac Conkey with sorbitol) and CHROM agar. Totally 116 of 1280 samples were found to be positive with regard to colonies grown on SMAC and CHROM agar in terms of *E.coli* O157. The 334 colonies taken from 116 samples were investigated with phenotypic tests according to *E.coli* and all of them were identified as *E.coli*. These isolates were subjected to latex agglutination test in terms of *E.coli* O157 and totally 8 of samples (2 of them were Broiler stools and 6 of them were poultry processing plant samples) were found as positive. These 8 suspicious *E.coli* O157 isolates were not given expected 420 bp length band with using primers O157PR8 and O157PF8 in Polymerase Chain Reaction (PCR) and all isolates were found negative in terms of this bacterium.

These obtained results showed that poultry digestive system and chicken meat did not carry *E.coli* O157 in Kayseri and the investigation of greater number of poultry originated samples from different locations in terms of this bacterium is thought to be useful.

**Key words:** Broiler, *Escherichia coli* O157, Poultry processing plant, Laying hens, Immunomagnetic separation

## 1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

İnsanda gözlenen gıda kaynaklı enfeksiyonlar ve toksikasyonlar arasında en önemli yeri hayvan gıda kaynaklı enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Hayvansal gıdalarla insanlara bulaşan enfeksiyöz etkenler arasında *E.coli* O157 serotipi önemli bir yer tutmaktadır. *Escherichia coli* O157 serotipi, gıda kaynaklı önemli bir zoonoz patojen olup, Genus *Escherichi*'da bulunan çok sayıda serotipten biridir. Shiga toksin salgılayan bu serotip, patojenik *E. coli*'lerin Enterohemorajik *E. coli* veya EHEC olarak adlandırılan grubuna dahildir. Bununla birlikte Verotoksin üreten *E. coli* (VTEC) veya daha ender olarak Shiga-benzeri toksin üreten *E. coli* (STEC) adları da alternatif olarak kullanılmaktadır. Bu serotip insanlarda hemolitik üremik sendrom (HUS), trombotik trombositopenik purpura ve hemorajik kolitise neden olmaktadır. Çeşitli araştırma sonuçları bu bakterinin başta süt inekleri olmak üzere sıcakkanlı hayvanlar olarak tanımlanan memeli hayvanlar ve kanatlı hayvanların dışkıları ile ete, süte, toprağa, suya ve dolayısı ile tüm çevreye yayıldığını göstermiştir. *E. coli* O157 serotipinin, köpek, kanatlı, koyun, geyik ve insan tarafından da taşıyıcılığının bildirilmesine rağmen, sığır temel kaynak ve rezervuar olarak ele alınmaktadır. İyi bir sanitasyonun uygulanmadığı durumlarda gıda maddelerinin üretimi, taşınması ve tüketimi sırasında ürünler kontamine olmaktadır. Buna bağlı olarak da mikroorganizmalarla bulaşık gıdaların tüketimi insan sağlığı açısından tehlike arz etmekte ve mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonları daha önemli hale getirmektedir. Kanatlı hayvanlar veya bunlara ait ürünlerde *E.coli* O157'nin varlığı veya taşıyıcılığı ile ilgili çalışmalarda bu bakterinin ya bulunmadığı veya %0.1 gibi çok düşük oranlar bildirilmektedir. Bu projede, broyler tavuklara ait et ve barsak içeriği, yumurtacı tavuklara ait dışkı örneği, kanatlı mezbahanesindeki haşlama tank suyu, duvar ve iç organ çıkarılma ünitesinden alınan kanatlı orijinli çeşitli materyallerde *E.coli* O157'nin varlığı araştırılmıştır. Materyaller Mart 2010 ile Şubat 2011 tarihleri arasındaki bir yıl süresince 3 aylık periyotlar halinde toplanmıştır. Örneklerden izolasyon amacıyla, novobiocin'li (20 mg/L) *E.coli* buyyonda 24 saat 37°C'de ön zenginleştirme, bunu takiben immunomanyetik separasyon ile SMAC (Sorbitol Mc Conkey) ve CHROM agara ekim yöntemi kullanılmıştır. Kayseri yöresinde yürütülen bu çalışmanın *E.coli* O157 ile ilgili çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Escherichia coli*'nin genel özellikleri

Bu bakteri ilk kez 1885 yılında Alman bakteriolog Theodor Escherich tarafından ishalleri bir çocuğun dışkılarından izole edilmiş ve *Bacterium coli commune* olarak isimlendirilmiştir (Wasteson 2001, Padhye ve Doyle 1992). Daha sonra, Escherich'in adına itafen, 1919 yılında Castelli ve Calmer tarafından etken *Escherichia coli* (*E.coli*) adı verilmiştir (Töreci K. 2002).

Etken; memeliler, kuşlar ve çoğu sıcakkanlı hayvanlarda gastrointestinal sistemin normal mikroflora üyesidir. Fakat belirli suşları, insan ve hayvanların gastrointestinal hastalıklarından izole edilmektedir. Bu suşlar, virulens özellikleri, patojenite mekanizmaları, klinik semptomlar ve serolojiye dayalı olarak patojenite gruplarına göre kategorize edilirler (Caprioli ve ark. 2005, Wasteson 2001). Etken, gerek insanlarda gerekse hayvanlarda değişik patogeneze ile seyreden çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır. Bu hastalıklar arasında çeşitli üriner sistem enfeksiyonları, sepsis, menenjit, enterik enfeksiyonlar, yara enfeksiyonları ve mastitisler yer almaktadır (Wasteson 2001, Nataro ve Kaper 1998).

*Escherichia coli*, Enterobacteriaceae ailesi içinde yer alan *Escherichia* genusuna bağlı, Gram negatif, aerob ya da fakültatif anaerob, sporsuz 1,1-1,5 x 2,0-6,0 µm boyutlarında, düzgün çomak tarzında bir etkidir (Quinn 2002, Arda 1997). *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 gözle görülebilir büyüklükte, düzgün kenarlı, S-tipli koloniler meydana getirir. Eski kültürlerde ise R tipli kaba, düzensiz koloniler gözlemlenebilir. Kapsüllü suşlar ise M tipi mukoid koloniler meydana getirir Nutrient buyyonda 24 saatte 37 °C'de bulanıklık oluşturarak ürer. Etken laktozu fermente ettiği için MC agarda pembe renkli koloniler, EMB agarda metalik refle görünümünde koloniler oluşturur. Ayrıca, patojen olan bazı suşları kanlı agarda hemoliz oluşturma yeteneğine sahiptir. (Arda 1997, İzgür 2002).

*E. coli*, glukoz, sukroz, laktoz, mannitol gibi bazı karbonhidratları fermente ederek asit ve gaz oluşturur. İndol ve Metil Red (MR) testleri pozitif, Voges Proskauer (VP) testi ise negatiftir. Sitratlı besi yerlerinde üremez, üreli besi yerlerinde üreyi kullanamadıkları için üreyemez. Genellikle hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) gazı oluşturmaz, oksidaz negatif olan *E. coli*, nitratları nitritlere redükte etme yeteneğine de sahiptir. *E.coli* fiziksel ve kimyasal etkenlere karşıda oldukça dayanıklıdır. Su, dışkı, hayvan barınakları gibi doğal koşullarda uzun süre canlılığını

koruyabilir, ısı ve soğuga dayanıklıdır. Dezenfektanlara, bazı boya maddelerine (Malaşit yeşili, Füksin vb.), safra ve safra tuzlarına , %7 NaCl'e karşı ise duyarlıdır (**Quinn 2002, Arda 1997**).

*E. coli*'nin antijenik yapısı oldukça komplike olup, özellikle patojen suşlarda bu yapılar önem taşımaktadır. *E. coli* suşları arasında serolojik bir bağlantı olduğu ilk kez 1921 'de Dodgeon ve arkadaşları tarafından belirtilmiş, sonra 1937 'de Lowel *E. coli* 'nin kapsül ve somatik olmak üzere 2 çeşit antijeni olduğunu ileri sürmüş, 1943 'de ise Kaufmann flagella antijenini de göstermiştir. Buna göre *E. coli* 'de O1-O171 arasında gösterilen 165 somatik O antijeni, K1-K90 arasında gösterilen 90 kapsül K antijeni ve H1-H56 arasında gösterilen 56 flagella H antijeni saptanmıştır ancak en son çalışmalara göre bugün 174 O, 56 H ve 80 K antijeni olduğu saptanmıştır (**Halkman ve ark. 2001**). Günümüzde *E. coli*'nin serolojik tiplendirilmesinde hala Kauffman tarafından şematize edilen serolojik sınıflandırmanın modifiye edilmiş hali kullanılmaktadır (**Nataro ve Kaper 1998**). Modifiye Kauffman şemasına göre *E. coli*'ler O, H ve K yüzey antijenlerine göre serogruplara ayrılmıştır. *Escherichia coli*'nin somatik "O" antijenleri lipopolisakkarit özelliğinde olup ısıya dirençli yüzey antijenleridir. Makroaglutinasyon ve mikroaglutinasyon testi ile ortaya konulabilir. Ancak kapsüller ve fimbrial antijenlere sahip *E. coli*'lerde somatik antijenlerin ortaya konulması güçlük yaratmaktadır. Bu nedenle bu tür suşların 120 °C'de 2 saat ısıtıldıktan sonra aglutinasyona tabi tutulması önerilir (**Nataro ve Kaper 1998, İzgür 1999**). Flagellar "H" antijenleri ise hareketli suşlarda bulunur, protein yapısındadır ve ısıya dayanıksız olup aglutinasyonla ortaya konulabilir (**İzgür 1999**).

Kapsüller "K" antijenleri polisakkarit özelliğinde olan bu antijenik yapı, kapsül taşıyan *E.coli* suşlarında "O" somatik antijenlerinin üzerinde bulunur. Bu nedenle "K" antijeni taşıyan suşlar "O" antiserumları ile aglutine olmazlar. "K" antijenlerinin K(A) ve K(B) olmak üzere iki önemli komponenti bulunur. K(A) antijenleri 120°C'de 2 saat içerisinde, K(B) antijenleri ise 100 °C'de tahrip olabilen polisakkarit yapısındaki antijenlerdir (**İzgür 1999**). Önceleri "K" antijeninin L fraksiyonu olarak adlandırılan fimbrial antijenler (pilus), protein yapısında olup fimbriya da bulunur. Bu antijenler de "K" antijenleri gibi bir suşun "O" antijenine göre identifiye edilmesini önler. *E.coli*'lerde bulunan bu antijenlerin saptanması, özellikle enteropatojenik *E.coli*'lerin (EPEC) belirlenmesinde önemli rol oynar. Bu piluslar *E.coli*'lerin virulans faktörü olarak kabul edilir (**İzgür 1999**). *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 gerçekleşmektedir (**İzgür 1999**).

*Escherichia coli*'nin toksinleri de önem taşımaktadır. *E.coli*'ler de enterotoksin, nörotoksin ve endotoksin gibi çeşitli toksinler de bulunur. Enterotoksinler genellikle, genç hayvanlarda görülen bağırsak infeksiyonlarından sorumludurlar. Bu toksinlerin stabil toksin (ST) ve labil toksin (LT) olmak üzere iki fraksiyonu bulunur. Stabil toksin ısıya dayanıklı, immunolojik özelliği bulunmayan ve aside dirençli olmayan, proteinazlara duyarlı ST<sub>a</sub> ve ST<sub>b</sub> olmak üzere iki varyanta sahiptir. Labil toksin ise ısıya duyarlı olup, antijenik yapısı nedeniyle kolera toksinine benzerlik gösterir (**İzgür 1999**). Nörotoksinler lipoprotein özelliğinde olup, domuzlarda enterotoksemiye neden olan, ısıya duyarlı toksinlerdir. Bu toksin farelerde merkezi sinir sistemi bozukluklarına neden olması ile enterotoksin ve endotoksinlerden ayrılır. Endotoksinler ise bütün *E. coli* suşlarında bulunur ve kimyasal olarak protein-fosfolipid-polisakkarit kompleksinden oluşmuş toksinlerdir. O somatik antijeninin polisakkarit fraksiyonları antijeniteyi belirlerken, lipoproteinler toksisiteyi belirler. (**İzgür 1999**).

## 2.2. *E.coli* Alt Tipleri

Tüm dünyada genel olarak ishal enfeksiyonları ile anılan diyarejenik *E. coli*'ler O:H antijenik yapıları, diğer virülens faktörleri, hedef hücrede yaptıkları hücrel değişiklikler, sahip oldukları enterotoksin yapısı, ortaya çıkan klinik tablo ve epidemiyolojilerine göre; Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enteroinvasiv *E. coli* (EIEC), Enteroagregatif *E. coli* (EAEC) Diffuz-adherent *E. coli* (DAEC), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) olarak adlandırılmaktadır. Ancak bunlardan diffuz-adherent *E. coli*'nin klinik önemi henüz tartışmalıdır (**Öngen 2008, Nataro ve Kaper 1998**).

Bununla birlikte, diyareye neden olan serotiplerin bu şekilde kesin bir ayrımı yoktur. Bu gruplara ilaveten fakültatif enteropatojenik (FEEC), verotoksin oluşturanlar (VTEC), önceleri shiga benzeri toksin oluşturanlar (=shiga like toxin ; SLTEC) olarak adlandırılmış olmakla beraber son zamanlarda doğrudan shiga toksin (Stx ; çoğul formda Stxs) oluşturanlar (STEC) şeklinde tanımlanmış olması, diyare oluşturanlar (DEC) gibi grupların başka gruplar ile de tarif edilebilmesi, diyareye neden olan *E. coli* 'lerin enfeksiyon veya intoksikasyon etmeni olarak gruplandırılması bu konudaki terminolojiyi zorlamaktadır (**Halkman ve ark. 2001**).

### 2.2.1. Enteropatojenik *E.coli* (EPEC)

EPEC suşları, özellikle gelişmekte olan ülkelerde neonatal ve infantil diyarelerle ilişkilendirilmektedir. Brezilya, Güney Afrika ve Meksika gibi ülkelerde yapılan çalışmalar bebeklerde bu etkene bağlı ishallerin %30-40 arasında olduğunu göstermişlerdir (**Behiry ve ark. 2011**).

EPEC suşları, ısıya dayanıklı ST (ST<sub>a</sub>, ST<sub>b</sub>) ve ısıya duyarlı LT (LT-I, LT-II) olmak üzere bir veya daha fazla sayıda enterotoksin oluşturmaktadır. Bu suşlar; morfolojik lezyonlar oluşturmaksızın ince bağırsak epitel hücrelerindeki mikrovilluslara tutunmakta ve sentezledikleri enterotoksinlerle enterositleri lokal olarak etkileyerek buzağılarda, kuzularda ve domuz yavrularında neonatal diyareye ve ileitise, özellikle sıcak mevsimlerde de bebeklerde diyarelere neden olmaktadır (**Padhye ve Doyle 1992, Willke 2008**).

EPEC infeksiyonunun histopatolojik olarak en önemli özelliği tutunma ve bozma (attaching and effacing effect) etkisidir. Bu etkinin oluşması; bakterinin enterosite lokal aderensi, bakterinin enterosit sinyal sistemini uyarması ve enterositle bakteri arasındaki sıkı bir bağlanmanın gerçekleşmesi basamakları ile olur. EPEC virulens faktörleri kromozom ve plazmidler üzerinde bulunan genlerin kontrolündedir. Tutunma ve bozma etkisi “enterosit bozma lokusu”(locus of enterocyte effacement: LEE ) denilen bir T3SS, intimin denilen dış membran adezini transloke intimin reseptörü (Tir) ve diğer proteinleri kodlayan bir patojenite adası tarafından yönetilir. Ek olarak birçok EPEC suşu EPEC aderens faktörü (EAF) plazmidi denilen ve tip IV fimbria ve demet oluşturan piluslar (bundle forming pilus Bfp) denilen pilusları kodlayan plazmidler taşır. Bfp taşıyan EPEC suşlarına tipik EPEC denir ve bu suşlar enterositlere lokal aderens göstererek bağlanır. Atipik EPEC suşları ise EAF plazmidleri taşımazlar dolayısıyla Bfd’leri yoktur ve bunlar daha az patojendir. Bfp halat benzeri demet şeklinde agrege olmakta ve bakterini reversibl otoagregasyonuna yol açmaktadır. Bu özellikleriyle Bfp’nin infeksiyonun başlangıcındaki aderensi yönlendirdiğine ve daha sonra bakterinin barsak yüzeyine dağılmasına yol açtığına inanılmaktadır. EPEC’in başlıca adezin faktörleri Bfp, intimin ve T3SS’inde yer alan EspA proteindir. EspA, EPEC’e ait T3SS’te yer alan olağan dışı bir translokasyon proteindir. Bilindiği gibi T3SS sisteminde konak hücreye bakteri proteinlerinin oluşturduğu bir oluk oluşmaktadır. İşte bu EspA filamantöz yapısıyla enjektörün iğnesi gibi görev görür ve bakteriyi konak hücreye bağlar. Tir, EspA’nın oluşturduğu oluktan geçerek, EspB ve Espd’nin oluşturduğu delikten konak hücre membranı içine girer ve bakterinin intimin adezini için reseptör görevi görür. İntimin Tir’le bağlanması

sonucu gelişen bazı olaylarla konak hücre iskeletinde aktin nükleasyonu ve flaman oluşumu mekanizmaları harekete geçerek bakterinin bağlandığı yerde kupa benzeri bir taban oluşturur, bu da bakterinin hücreye sıkıca yapışmasını sağlar. Yani EPEC kendi taşıdığı reseptörü konak hücre membranı içine enjekte edip yerleştirerek ona bağlanır ve konak hücre modifikasyonu için kullanır (Willke 2008).

### 2.2.2. Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC)

Enterotoksijenik *E.coli* grubu, ilk olarak domuz yavrularında görülen ve ölümlerin şekillendiği ishallerden izole edilmiştir (Nataro ve Kaper 1998). ETEC gelişmekte olan ülkelerde dehidratasyona yol açan bebek ishallerinin ve yolcu ishalinin en önemli nedenidir. ETEC gelişmekte olan ülkelerde ishal ataklarının yaklaşık % 20-30'undan sorumludur. Gelişmiş ülkelerde daha az rastlanır. ABD ve İsviçre'de yapılan çalışmalarda akut ishal ataklarındaki oranı sırasıyla %1.4 ve %4.2 olarak bulunmuştur. Gelişmekte olan ülkelerde çocuklarda yılda 2-3 ishal atağına yol açar ve bu çocuklardaki ishal ataklarının yaklaşık % 25'inden sorumludur (Arslan 2008).

ETEC suşları ince barsak mukozasına kolonizasyon faktör antijenleri (colonization factor antigens: CFA) denilen adezinler aracılığı ile bağlanır (ince barsak, aslında *E.coli*'nin fazla sayıda bulunduğu bir bölge değildir). Tarihsel olarak CFA veya *E.coli* yüzey antijenleri (*E.coli* surface antigens: CS) ismi verilen bu yapılar esas olarak bakteri piluslarından oluşur. Bu piluslar klasik şaperonun eşlik ettiği piluslardır ve daha ince, tüyümsü özellik gösterirler (Nataro ve Kaper 1998, Willke 2008).

ETEC suşlarının plazmidler tarafından kodlanan ısıya dirençli toksin (Heat Stable Toxin = ST) ve ısıya duyarlı toksin (Heat Labile Toxin = LT) olmak üzere iki önemli toksine sahiptir. Bu toksinlerden; ısıya duyarlı toksin (LT) protein yapısında olup 60 °C'de 30 dakika da inaktif olur. (Nataro ve Kaper 1998, Arslan 2008). Biyolojik ve antijenik olarak *Vibrio cholerae* toksiniyle yakından ilişkili bir toksindir (aminoasit dizilimi %80 homologdur ve aynı şekilde etkiye sahiptirler). Ancak ETEC ve *Vibrio cholera* arasında yakın bağlantı yoktur. Isı LT I ve II olmak üzere 2 türü vardır. Isıya dirençli toksin (ST) ise, toksik peptidaz ailesindendir. ST ise tamamen farklı olup daha küçük bir peptid molekülüdür ve memelilerdeki guanilin hormonuna benzerlik gösterir. 100°C'de 15 dk. dayanır ve suda erir. Aside ve proteolitik enzimlere dirençli, alkaliye duyarlıdır. Antijen özelliği zayıftır. ETEC suşlarının %75'inde yalnız veya LT ile birlikte olarak görülür. ETEC suşları ile ishal ve ST salınımı sıklıkla beraber bulunmuştur. Bu nedenle çeşitli çalışmalarda bir patojen faktör olarak gösterilmiştir.

Isı ST'nin yapısal olarak birbirinden farklı, STI ve STII olmak üzere 2 türü vardır. STI yerine STa, STII yerine STb de kullanılmaktadır (Willke 2008, Abut İşeri 2007).

### 2.2.3. Enteroinvasif *E.coli* (EIEC)

EİEC'nin ishal oluşturma mekanizmaları Shigella ile aynıdır. Bu suşlar genellikle hareketsizdir ve invazyonla inflamasyona ve dizanteri form ishale yol açar. EİEC Shigella'ya benzer şekilde T3SS'ni kodlayan büyük bir invazyon plazmidi taşır. EİEC epiteli, T3SS'i kullanarak invaze eder, fagozomdan kaçarak hücre stoplazmasında aktin kamçıları ile hareket ederek komşu hücreye ulaşır ve hücre içine girer (Wilke 2008). Kolon epitel hücrelerini istila ederek, bu epitel hücreleri içerisinde çoğalmakta ve epitel dokunun nekrozuna yol açarak kanlı diyareye sebep olmaktadır. EİEC türlerinin invazyon mekanizmasında, 120-140 MDa büyüklükte plazmidin etkili olduğu düşünülmektedir (Nataro ve Kaper 1998). EİEC grubunda O28ac, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164 serotipleri yer alır (Arslan 2008). Bu gruptaki suşlar genellikle laktoz negatif ya da laktoz geç pozitif ile hareketsiz olma gibi atipik özellikler taşırlar. Diğer enterovirulent tiplerden farklı olarak invaziv özellik taşırlar ve fekal lökositlere rastlanır. Mukoid ve kanlı bir dışkı görülür. Ateş yüksektir. Bu gruba giren bakterilerde enfektif doz düşüktür (Halkman ve ark. 2001, Nataro ve Kaper 1998).

### 2.2.4. Enteroagregatif *E.coli* (EAEC)

Hayvanlarda epidemiyolojik çalışmalar sonrasında ortaya çıkarılmıştır. Tropik ülke çocuklarında süreklilik gösteren diyarelere neden olmaktadır (Halkman ve ark. 2001). Gelişmekte olan ülkelerde özellikle çocuklarda akut ve persistan ishale neden olur. EAEC, AIDS ilişkili kronik ishal ve yolcu ishalinin etiyolojik ajanıdır (Huang ve ark. 2006). Enfeksiyon mekanizması kompleks olup tam olarak anlaşılamamakla birlikte, insan kolon mukozasına agregasyonla yapışarak mikrovillus kaybına ve hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir (Willke 2008, Nataro ve Kaper 1998).

EAEC'nin önerilen patogeneze modeli üç faz içerir: agregatif adherens fimbriya (AAF) ile intestinal mukozaya tutunma, müküs üretiminde artma ve toksin üretimi ve inflamasyon sonucunda mukozal hasar ve intestinal sekresyon (Arslan 2008). EAEC'nin agregatif aderens fimbriaları (AAF/I ve AAF/II) diye bilinen şaperon kullanan, plazmide bağımlı pilusları vardır. Bazı EAEC suşlarının sitotoksin salgıladığı gösterilmiştir. Bu toksine enteroagregatif sitotoksin (EAST) denir. Bu toksin de plazmid tarafından kodlanmaktadır. Bu toksinin hücrelerde yuvarlaklaşmaya, hücre kültürlerinde hücre kopmalarına, insan barsak modelinde

kriptlerde dilatasyon ve hücre harabiyetine yol açtığı gösterilmiştir (**Willke A 2008, Huang ve ark. 2006**).

EAEC'nin oluşturduğu ishal esas olarak sekretuvarıdır. EAEC'nin tipik hastalığı hafif ateş, kusma olmadan (veya nadir) sulu, müküslü, sekretuvar ishaldir. Hastaların 1/3'ünde gros kanlı ishal vardır. Sulu ishal haftalarca devam edebilir. EAEC bebeklerde büyüme geriliği ve gelişmekte olan ülkelerde malnütrisyona neden olabilir. EAEC barsak mukozasında karakteristik bir müköz film oluşturur ve villuslarda kısalma, hemorajik nekroz ve inflamatuvar cevap oluşturur (**Arslan 2008**).

### **2.2.5. Diffüz Adherent *E.coli* (DAEC)**

DAEC grubundaki suşlar ise Hep-2 hücrelerine diffuz olarak yapışan ancak EPEC benzeri mikrokoloniler oluşturmeyen diyarejenik *E. coli* grubunun bağımsız bir üyesidir (**Nataro ve Kaper 1998**), yine çocuklarda süreklilik gösteren diyareye neden olurlar. Hücreye adezyon yolu ile yapıştıkları gibi diffüze olabilirler. Bu tip *E.coli*'lerde iki ayrı adhesin geninin varlığı ve ayrıca son olarak intimin varlığı saptanmıştır (**Halkman ve ark. 2001, İzgür 2002**).

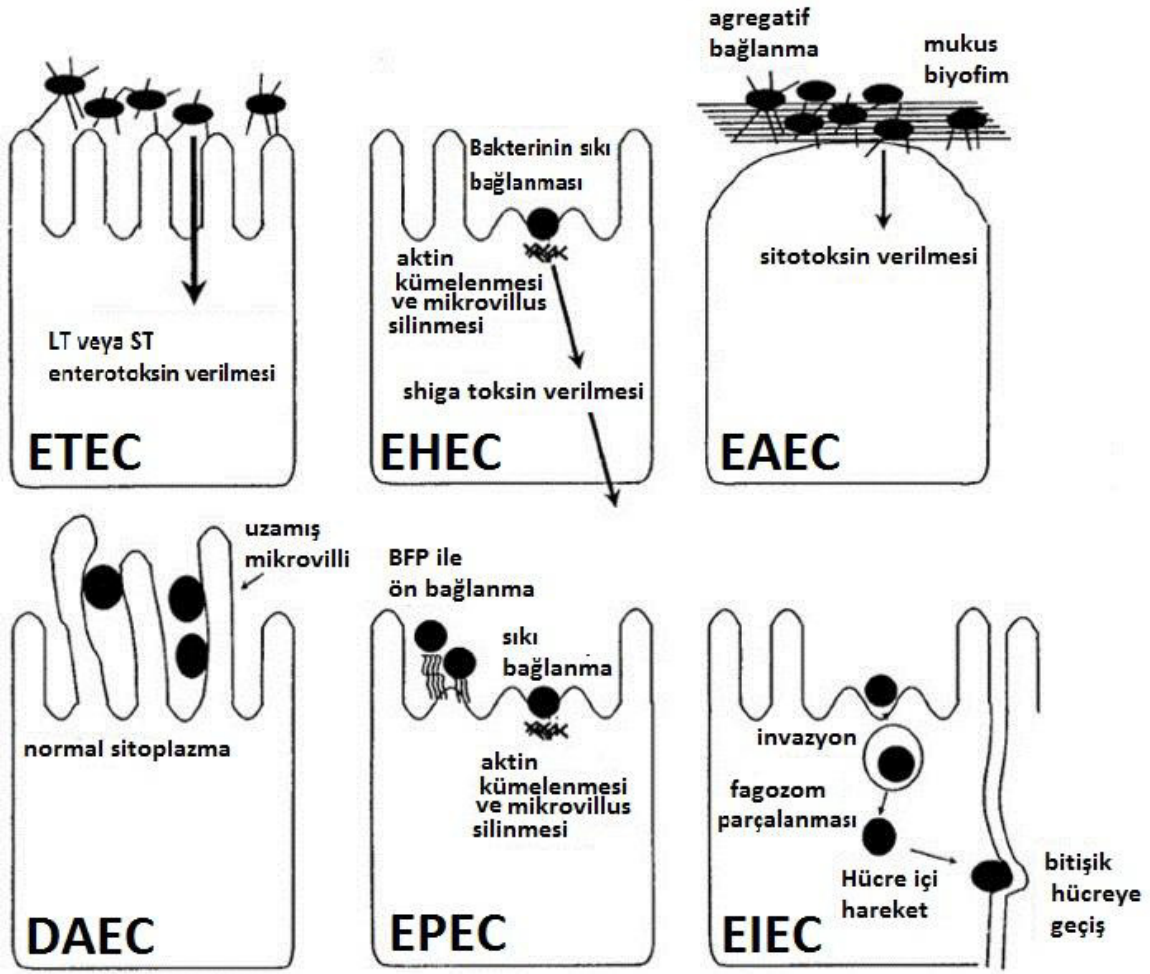
### **2.2.6. Enterohemorajik *E.coli* (EHEC)**

EHEC suşları, enterohemolizin ve sitotoksin (verotoksin ya da sigatoksin) üretirler ve bu sitotoksinlerle mikrovilluslarda tutunma ve bozma (A/E) lezyonları olarak adlandırılan lezyonlara sebep olurlar (**Caprioli ve ark. 2005, Öngen 2008**). EHEC olarak tanımlanan grubu başlıca *E. coli* O157:H7 serotipi oluşturur. Bu grupta bulunan diğer serotipler O26:H11, O26:H32, O26:H-, O55:H7, O111:H8, O111:H-, O113:H21, O117:H14 dir (**Nataro ve Kaper 1998, Halkman ve ark. 2001**). *E. coli* O157:H7 serotipi, insanlarda Hemolitik Üremik Sendrom (HUS), Trombotik Trombositopenik Purpura (TTP) ve Hemorajik Kolitis (HC) olmak üzere üç temel sendroma neden olmaktadır (**Willke 2008**).

Enterohemorajik *E.coli* suşları verotoksin üretme yeteneklerinden dolayı verotoksijenik *E.coli* (VTEC) olarak da adlandırılmaktadır. Hastalık belirtileri *Shigella dysenteriae* Tip I'in neden olduğu belirtilerle aynı olduğundan Shiga benzeri toksin oluşturan *E.coli* (SLTEC) olarak ta adlandırılır (**Caprioli ve ark. 2005**). Şiga toksinler (Stx), EHEC'nin anahtar virülans faktörü olarak kabul edilir. İki ana toksin tipi vardır; Stx1 ve Stx2. Bazı EHEC suşları yalnızca Stx1, bazıları yalnızca Stx2 üretirken çoğu suşlar her ikisini de yapabilir. Çok sayıda toksin varyantı yapabilen EHEC suşları vardır. Stx1 esas olarak şiga toksin ile benzerdir, (Şigella dizanteri serotip 1'in protein sentezini inhibe eden ekzotoksini) buna rağmen STx2 ve varyantları farklılıklar göstermektedir (**Arslan 2008**).

EHEC suşlarının patojenitesinde hem Shiga toksinleri hem de tutunma ve bozma mekanizmaları rol oynar. Yani Shiga toksini (verotoksinde denir) salgılayan *E.coli*'nin (STEC) yapışma ve bozma mekanizmasını sağlayan LEE (enterosit bozma lokusu) genleri de varsa bu suşlara EHEC (örn:O157:H7) denir. Dolayısıyla EHEC olmayan sadece Shiga toksini salgılayan STEC suşları da vardır. EHEC suşları aynı zamanda EHEC hemolizini de salgılar. EHEC insanlara genellikle biftek gibi az pişmiş etlerle bulaşır, çünkü bu bakteri sığırlar ve diğer geviş getiren hayvanların sindirim kanalı doğal florasında bulunur. EHEC suşlarının infeksiyöz dozu düşük olup, 100 bakteriden azdır. ishal yanında hemolitik üremik sendrom (HUS) ve ölüme yol açabilir. Etkisi hem Shiga toksin 1 ve 2 hem de tutunma ve bozma mekanizması ile gerçekleşir. Bu toksinler patojenite adacıkları tarafından kodlanır. Shiga toksini A-B grubundadır, yani bir A alt birimi ve pentamer yapıda B alt birimi vardır. Duyarlı hücre reseptörüne bağlanarak endositozla hücre içine alınır. A alt birimi aktive olarak hücre ribozomunda protein sentezini durdurarak hücre ölümüne yol açar. Sindirim kanalı epitel hücrelerinden geçerek bağırsak, böbrek ve diğer organların kılcal endotellerini tahrip eder ve bunun sonucunda intravasküler koagülasyon ve sonunda da trombositopeni, mikroanjyopatik hemolitik anemi ve böbrek yetmezliği yani HUS'a yol açar (**Willke 2008**).

EHEC alt grubunda yer alan bakteriler zoonotik patojenlerdir. Hayvanlarda nadiren hastalığa neden olmaktadır. Sığırlar ve diğer ruminantlar EHEC suşlarının başlıca rezervuarlarıdır ve et, çiğ süt ve süt ürünleri, su ve ruminant gübreleri ile bulaşık meyve veya sebzelerin tüketimi ile salgınlar oluşmaktadır. EHEC ayrıca koyun, keçi, manda ve geyiklerde de tespit edilmiştir. Domuz ve kanatlı hayvanlar EHEC kaynağı olarak değerlendirilmemektedir (**Caprioli ve ark 2005**).



Şekil 2.1. Diyarejenik *E. coli*'lerin patojenite şeması (Nataro ve Kaper 1998)

### 2.3. *Escherichia coli* O157:H7

*Escherichia coli* serotipleri içerisinde zoonoz olması nedeni en önemli yere sahip serotip *E. coli* O157:H7 dir. İlk kez 1975 yılında California'da ağır kanamalı diyare geçiren bir kadın hastadan izole edildiği belirtilmiştir (Fernandez 2008). İnsan patojeni olarak kesin idendifikasyonu ise, 1982 yılında Centers for Disease Control ve Prevention (CDC)' A.B.D.'nin Oregon ve Michigan eyaletlerinde şiddetli kanlı ishal ile seyreden salgınlarda gerçekleştirilmiştir (Armstrong ve ark. 1996).

#### 2.4. *Escherichia coli* O157: H7'nin Biyokimyasal Özellikleri

*Escherichia coli* O157:H7 serotipi diğer *E. coli* 'lerden; 44,5 °C ve üzerinde gelişmemesi, sorbitolü fermente edememesi,  $\beta$ -glucuronidase enzimine sahip olmaması, buna karşı *eae* genine sahip olması, 60 mDa plazmid taşıması ve enterohemolizin üretimi ile ayrılır. *E. coli* 'lerin %95 'i sorbitolü 24 saat içinde fermente ederken *E. coli* O157:H7 sorbitolü 48 saat içinde fermente edememektedir. SLTEC O157 suşları arasında sorbitol pozitif olanlara da rastlanılmaktadır. *E. coli* O157:H<sup>-</sup> suşları sorbitol pozitifdir (**Halkman ve ark. 2001**).

Yine *E. coli* 'lerin %97 'si  $\beta$ -glucuronidase enzimi içerirken *E. coli* O157:H7 serotipi  $\beta$ -glucuronidase negatiftir. Yeni bir tip hemolisin olarak kabul edilen enterohemolisin, verotoksin pozitif *E. coli* O157:H7 ve *E. coli* O157:H<sup>-</sup> serotipleri tarafından üretilirken, bu özellik diğer *E. coli* 'lerde yoktur. Enterohemolisin sadece eritrositleri yıkanmış kanlı agar petrilerinde belirlenebilir. Bu şekilde 33 adet verotoksik *E. coli* O157:H7 ya da *E. coli* O157:H<sup>-</sup> izolatının 32 adedinin enterohemolisin ürettiği gösterilmiştir. Bunların dışında *E. coli* O157:H7 serotipi diğer *E. coli* 'lere göre safra tuzlarına daha az dayanıklıdır. Antijenik yapısı diğer *E. coli* 'ler ile kesin bir ayırım sağlar (**Halkman ve ark. 2001**)

*E. coli* 'nin florojenik MUG belirteci *uidA* geni tarafından kodlanan  $\beta$ -glucuronidase enziminin aktivitesine bağlıdır. EHEC *E. coli* O157:H7 'de de bu genin varlığı gösterilmiş olmakla beraber, yapılan sekans analizleri bu serotipte *uidA* geninde bir kaç baz mutasyonu olduğunu göstermiştir. Bu nedenle *E. coli* O157:H7 serotipinde diğer *E. coli* 'lerde tipik olan MUG reaksiyonu negatiftir (**Willke 2008 , Halkman ve ark. 2001**).

*Escherichia coli* O157:H7'nin diğer *E. coli* 'ler için geliştirilmiş pek çok biyokimyasal teste benzer reaksiyonlar verdiği bildirilmektedir. Buna göre; *E. coli* O157:H7 için de *E. coli* 'lerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan indol ve MR testi pozitif; VP, sitrat testleri ve üreaz aktivitesi ise negatif olarak değerlendirilmektedir (**Ratnam ve ark. 1988**).

Ayrıca sukroz, arabinoz, trehaloz, mannitol, laktoz, maltoz, ramnoz, ksiloz, rafinoz ve dulsitol fermentasyonları, glukozdan gaz ve asit oluşturma yeteneği ile lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz testleri pozitif; salisin, eskülin, arjinin dihidrolaz, adonitol, inositol, potasyum siyanür (KCN) ve sellobiyoz reaksiyonları ise negatif olarak bildirilmektedir (**Ratnam ve ark. 1988**).

Bunun yanı sıra, özellikle, son yıllarda atipik biyokimyasal reaksiyonlar gösteren *E. coli* O157:H7 izolasyonu dikkati çekmektedir. Buna göre; ramnoz, sukroz, laktoz fermentasyonu

ile glukozdan gaz oluşturma yeteneği, lizin dekarboksilaz, ornitin dekarboksilaz ve indol testlerinin negatif; üre hidrolizi ve sorbitol fermentasyonunun ise pozitif olduğu belirtilmiştir (Ratnam ve ark. 1988, Karch ve Bielaszewska 2001). Ratnam ve ark. (1988)'na göre *E. coli* O157:H7 serotipinin çeşitli biyokimyasal özellikleri **Tablo 2.1**'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1.** *E.coli* O157:H7 serotipinin biyokimyasal özellikleri (Ratnam ve ark. 1988)

| Biyokimyasal testler   | <i>E.coli</i> O157:H7 |
|------------------------|-----------------------|
| Glikoz fermentasyonu   | Asit ve gaz           |
| Laktoz fermentasyonu   | Asit ve gaz           |
| Mannitol fermentasyonu | Asit ve gaz           |
| Sakkaroz fermentasyonu | Asit ve gaz           |
| Sorbitol fermentasyonu | Negatif               |
| İndol                  | Pozitif               |
| Üre                    | Negatif               |
| Hareket                | Pozitif               |
| Hidrojen sülfür        | Negatif               |
| Lizin dekarboksilaz    | Pozitif               |
| Metil Red              | Pozitif               |
| Voges Proskau          | Negatif               |

Çeşitli araştırmalar, gıda kaynaklı hemorajik kolitis vakalarından izole edilen *E. coli* O157:H7'nin, asite oldukça dirençli olduğunu ve bunun da midenin kuvvetli asit ortamından rahatlıkla geçmesinde rol aldığını göstermektedir. pH'sı 1-2 olan insan midesinde yaklaşık üç saat süren sindirim sırasında canlı kalabilmesi ve buradan bağırsaklara geçmesi de bu görüşü desteklemektedir (Halkman ve ark. 2001).

Asitlik ve tuza olan direncinin aksine *E. coli* O157:H7 serotipinin yüksek sıcaklıklara *Salmonella* türlerinden daha fazla duyarlı olduğu, donma sıcaklıklarına ise kayda değer ölçüde dirençli olduğu belirtilmektedir (Padhye ve Doyle 1992).

## 2.5. *Escherichia coli* O157:H7'nin Patojenitesi ve Virulens Faktörleri

Bilim adamları enterik patojenlerde yaptıkları kromozomal incelemelerde, farklı DNA segmentlerinin fonksiyonel virülens faktörlerini kodladığını saptamışlardır ve bunları patojenite adası (pathogenity island, Pais) olarak adlandırmışlardır. Bu genlerin büyük çoğunlukla başka mikroorganizmalardan kazanılmış olarak ortaya çıktığı bildirmişlerdir. *E.*

*coli* O157:H7'de 35 kilobaz (kb) büyüklüğünde olan ve enterosit silme lokusu (locus of enterocyte effacement, LEE) adı verilen bir patojenite adası bulunmuştur (**Park ve ark. 1999**).

*Escherichia coli* O157:H7 serotipi, infeksiyonların patogeneğinde rol oynayan shiga like toksin, enterohemolizin, intimin bağlanma faktörü, pO157 plazmidi, tip III sekresyon sistemi aracılığıyla salınan proteinler ve lipopolisakkarit gibi önemli virulens faktörlerine sahiptir (**Park ve ark. 1999, Robinson ve McKillip 2010**).

### 2.5.1. Shiga like toksin

*Escherichia coli* O157:H7'nin patojenitesi tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte verotoksin (VT) veya shiga-like toksin olarak adlandırılan toksinlerin önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu toksinler önce Afrika yeşil maymunun böbreğinde elde edilen vero doku hücrelerine sitotoksik etki yaptığından dolayı verotoksin olarak isimlendirilmiştir. Ancak daha sonra Shigella dysenteriae tip 1 tarafından oluşturulan shiga toksin ile %99 gibi çok büyük bir benzerlik göstermesinden dolayı shiga like toksin olarak adlandırılmıştır. Enterohemorajik *E. coli*'lerin en önemli virulens faktörüdür. Shigatoksinler, bakteriyofajlar tarafından sentezlenerek stx1 ve stx2 olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Tüm klinik izolatların bir veya iki toksin ürettikleri saptanmıştır. Stx2 grubu, stx1 ve *S. dysenteriae* shigatoksin tip 1 ile % 55-57 homolog sekansa sahiptir. Stx1 ise *S. dysenteriae* shigatoksin tip 1'den bir 21 amino asit farklıdır ve antijenik olarak bu toksinden ayırt edilemez. Epidemiyolojik veriler Stx-2'nin Stx-1'e göre Hemolitik Üremik Sendrom için daha önemli olduğunu göstermektedir SLT 1 stabil yapıda bir toksin olmasına rağmen SLT 2 değişken olup farklı sekans varyantları içermektedir (**Nataro ve Kaper 1998, Park ve ark. 1999**)

Verotoksinlerin memeliler üzerindeki etki mekanizması moleküler düzeyde tam olarak anlaşılamamıştır. Toksinler 70.000 dalton protein içeren basit yapıda bir A alt birim ve pentamer yapıda bir B alt biriminden oluşur. B alt birimi hücrelerde glikolipid reseptörüne bağlanarak içeri girdikten sonra A alt biriminin enzimatik olarak A1 fragmentine indirgendiği bu fragmentin daha sonra 60S ribozomlarına bağlanarak protein sentezini inhibe ettiği ve hücre ölümüne yol açtığı tahmin edilmektedir. A alt birimi 28S ribozomal RNA (rRNA)'daki protein sentezini inhibe eden bir aminoglikosidazdır. Shigatoksin ailesinde bütün üyelerin A ve B alt üniteleri korunmuştur (**Kuntz ve Kuntz 1999, Park ve ark. 1999, Nataro ve Kaper 1998**).

B alt birimi ise, konakçı böbrek korteksinde bolca bulunan ve shigatoksin reseptörü olan glikolipid globotriyoskleramide (Gb<sub>3</sub>), toksinin bağlanmasından sorumludur. Toksin kan damarlarının çeperlerindeki endotel hücrelere etki eder. Kalın bağırsak damarlarına bu şekilde zarar vermesi yüzünden kanlı ishal meydana gelir. Toksin kanla sindirim sistemini çevreleyen damarlardan daha öteye yayıldığı zaman küçük damarlar içeren çeşitli organlara zarar verebilir. Böbrek glomerulusunun epiteli, taşıdığı Gb<sub>3</sub> reseptörleri yüzünden özellikle toksine duyarlıdır ve onun zarar görmesi böbreğin filtreleme işlevini ortadan kaldırır, sonuç olarak hemolitik üremik sendrom görülür (**Kuntz ve Kuntz 1999, Nataro ve Kaper 1998**).

### 2.5.2. LEE ( locus of enterocyte effacement), İntimin

İntimin, EPEC yada *E. coli* O157:H7 gibi bağlanma ve silinme (A/E) lezyonlarına neden olan patojenler tarafından üretilir ve “enterosit silinme lokusu” olarak isimlendirilen 43-kb’lık patojenite adasında yer alan eae (*E.coli* bağlanma ve silinme) geni tarafından kodlanan 94-97 kDa’luk bir dış membran proteinidir. Bir adhezin olarak intiminin rolü anlaşılır olmasına rağmen bağlanma ve silinme lezyonları yönünden ökaryotik hücrelerle etkileşimi tam olarak aydınlatılamamıştır (**Park ve ark. 1999**). LEE, 41 farklı genin organize olduğu başlıca üç birimden oluşmaktadır. Bunlardan birincisi efektör molekülleri üreten tip III sekresyon sistemi, ikincisi tip III sekresyon sisteminde görev alan proteinler (EspA ve EspB gibi) üçüncüsü ise intimin ve konakçı hücresinin plazma membranına yerleşen ve yer değiştiren intimin reseptörüdür (translocated intimin receptor, Tir) (**Youn ve ark. 2010**). İntiminin C-terminal ucundaki reseptöre bağlanan kısım serotiplere göre değişiklik gösterebilir. Bu nedenle intimin taşıyan EPEC ince bağırsak patojeni iken, EHEC kalın bağırsak patojenidir (**Caprioli ve ark. 2005, Nataro ve Kaper 1998**).

### 2.5.3. pO157

Hemen hemen tüm *E.coli* O157:H7 serotipleri tarafından taşınan bu plazmidler pO157 olarak adlandırılır ve 93,6-104 kb büyüklüğünde olup, bu plazmidlerin 3,4 kb civarında fragmenti ise enterohemolizini kodlamaktadır. EHEC infeksiyonlarının patogeneziindeki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, in vivo ve in vitro yapılan çalışmalarda epitel hücrelerine bağlanmada rol oynadığı bildirilmiştir (**Nataro ve Kaper 1998**). Konakçı hücrelere bakterinin bağlanma gücünü artırmak için fimbriaların desteğini sağlamaktadır (**Robinson ve McKillip 2010**).

### 2.5.4. Salgılanan bakteriyel proteinler ve Tip III sekresyon sistemi

Konakçı ve bakteri etkileşiminde salgılanan bakteriyel proteinler önemli rol oynarlar. Örneğin EPEC ve *E. coli* O157:H7, Tip III sekresyon sistemi aracılığıyla salınan Esps (*E.coli* secreted-

proteins) gibi bazı immunreaktif proteinler salgılamaktadırlar. Bu immunreaktif proteinlerin tipik A/E lezyonlarının şekillenmesi için gerekli sinyal transdüksiyonunda rol aldığı belirtilmektedir. Tip III sekresyon sistemi bu proteinlerin stoplazmadan direkt olarak hücre yüzeyine taşınmasında görev almaktadır (**Park ve ark. 1999**).

#### 2.5.5. Somatik antijen

*E.coli* O157:H7, Gram negatif bakterilerdeki tipik lipopolisakkarit yüzey yapısına sahiptir. “O” antijeni ya da somatik antijen olarak da bilinen lipopolisakkarit, lipid O ve A polisakkaritinden oluşmaktadır. Serotipin antijenik determinantı olarak kabul edilen O polisakkariti *E.coli* O157:H7 serotipinin konakçı epitel hücrelerine adezyonunda önemli role sahiptir (**Park ve ark. 1999**).

#### 2.5.6. Enterohemolizin

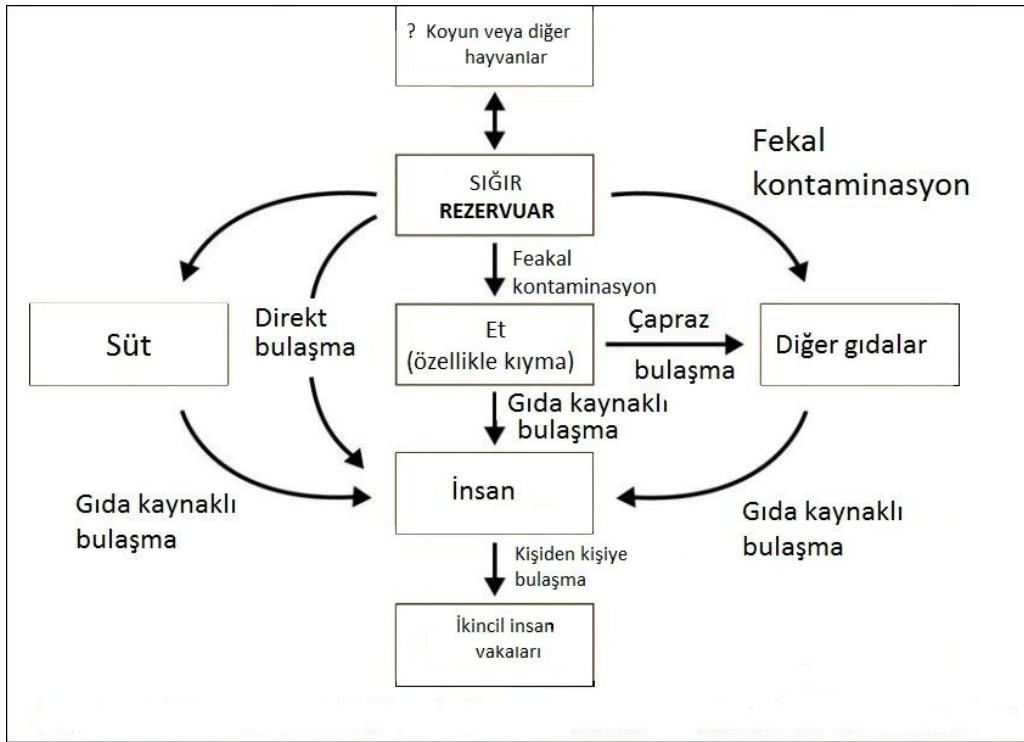
*E. coli* O157:H7 suşlarında enterohemolizini kodlayan genler plazmitte yer almaktadır. Bu toksini kodlayan gen *ehxA* geni olup, invaziv *E. coli*’ler tarafından çeşitli tiplerde ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) hemolizinler üretilmektedir. *E. coli*  $\alpha$  hemolizin, enterohemolizinlerin aksine insan eritrositlerine karşı aktiviteye sahiptir. Ancak üretilen hemolizinlerden bir tanesi EHEC’e spesifiktir. Eritrositlere olan etkileriyle tespit edilen ve EHEC suşlarıyla ilişkisi ortaya konan bu hemolizinelere enterohemolizin (EHEC-Ehly veya Ehx) adı verilmiştir. Enterohemolizin üropatojenik *E. coli*, *Mannheimia haemolytica* ve diğer insan ve hayvan patojenlerine ait toksinlerin üyesi olduğu RTX (repeats in toxin) toksin ailesinde bulunur (**Nataro ve Kaper 1998**).

Enterohemolizin, O157:H7’lerin tamamına yakınında ve O157 olmayan STEC suşlarının çoğunda da bulunmaktadır. Enterohemolizinin rolü kesin olarak bilinmemekle birlikte, bu virülens faktörüne sahip *E. coli* O157:H7 suşları, in vivo eritrositleri lize eder. Açığa çıkan “hemoglobin ve hem” ise bakterinin demir kaynağını sağlayarak bakteri üremesini de artırır. İlâveten toksin, eritrositlerin lizisi ile beraber sığır lökositlerini de lize ederken insan lökositlerini lize etmez (**Nataro ve Kaper 1998**).

#### 2.6. *Escherichia coli* O157:H7’nin Kaynağı ve Epidemiyolojisi

*Escherichia coli* O157:H7 serotipinin kaynağı üzerinde farklı görüşler bulunmaktadır. *E. coli* O157:H7 serotipi köpek, kuş, koyun, geyik ve insanda görülmekle beraber, sığır primer rezervuar olarak kabul edilmektedir. İnsanlarda bu etkenin neden olduğu şiddetli enterokolitis ile seyreden pek çok salgın bildirilmiştir. Bu salgınlar genellikle kontamine et, süt ve süt ürünlerinin

tüketimi ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda sığır dışkıları ile kontamine su, toprak, pastörize edilmeyen elma suları, meyve ve sebzeler salgınlar için önemli kaynakları oluşturmaktadır. Salgınlar sırasında etkenin insandan insana geçebilmesi, sporadik olguların önemini artırmaktadır (Youn ve ark 2010, Welinder-Olsson and Kaijser 2005). İnsanların hayvanlarla özellikle sığır orijinli kaynaklarla teması da etkenin bulaşmasında rol oynamaktadır (Kiranmayi ve ark. 2010). Araştırmaların çoğu sığırlarda gerçekleştirildiğinden, diğer potansiyel rezervuar hayvanların özellikle kanatlıların rolü hakkındaki bilgiler yetersiz kalmaktadır.



Şekil 2.2. *Escherichia coli* O157:H7'nin bulaşma şekilleri ve rezervuarları

## 2.7. *Escherichia coli* O157:H7'nin İnsanlarda Yaptığı Hastalıklar

*Escherichia coli* O157:H7'nin yapmış olduğu hastalıklar tipik ve oldukça sert geçen hemorajik kolitis, HUS ve trombotik trombositopenik purpura (TTP) olmak üzere 3 şekilde görülür (Kiranmayi ve ark. 2010).

**2.7.1. Hemorajik kolitis (HC)** aniden ortaya çıkan bir hastalık olup kolonik mukozal ödeme bağlı olarak bu hastalarda şiddetli kramplı karın ağrıları, kanlı dışkı gözlenir. Hastalarda ateş ya hiç yoktur yada az gözlenir. Baryumlu lavman ve kolonoskopi ile hastalarda sağ taraflı kolonik yangı saptanır (Kiranmayi ve ark. 2010).

**2.7.2. Hemorajik Üremik Sendrom (HUS)** özellikle çok gençlerde böbrek yetersizliği, mikroangiopatik hemolitik anemi ve trombositopeni ile karakterize edilen ve üçlü bir sendrom olarak ortaya çıkar. Akut fazlarda görülen ölümün sebebi; böbrek yetmezliği, şiddetli hipertansiyon, myokardit veya nörolojik hastalıklardır. Gelişmekte olan ülkelerde bu hastalıkla ilgili ölüm oranı giderek artmakta, gelişen ülkelerde ise %2 ila 10 arasında görülmektedir (**Kiranmayi ve ark. 2010**).

**2.7.3. Trombotik Trombositopenik Purpura (TTP)** TTP’de ise klinik ve patolojik özellikleri HUS’a benzemekle birlikte temel özelliği merkezi sinir sistemi bozukluğudur. Hastalıkta böbrek yetmezliği şiddetli olmamakla beraber nörolojik sebeplerle %50 oranında ölümler görülmektedir (**Kiranmayi ve ark. 2010**).

## **2.8. *E. coli* O157:H7’nin Teşhis Yöntemleri**

*E. coli* O157:H7 serotipinin çeşitli gıdalar, fekal numuneler ve diğer klinik ve çevre örneklerinde aranması ve teşhisine yönelik çeşitli kategorilere ayrılmış farklı yöntemler kullanılmaktadır.

Bu yöntemler; serotipin biyokimyasal özelliklerine dayanan izolasyon metodları ve şigatoksinlerin neden olduğu sitotoksik etkilere dayanan biyolojik testler, şigatoksinlere, O157 ve H7 antijenlerine karşı monoklonal ve poliklonal antikorların kullanıldığı immunokimyasal yöntemler ve nükleik asitler üzerine dayanan yöntemleri içeren gelişmiş teknikler şeklinde dört ana başlık altında toplanabilir (**Park ve ark. 1999**).

### **2.8.1. Kültürel-Biyokimyasal yöntemler**

*E. coli* O157:H7 belirlenmesinde klasik olarak tanımlanan yöntemler biyokimyasal testler üzerine kurulmuştur ve rutin test laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna göre çeşitli gıdalar, fekal numuneler ve diğer klinik ve çevre örneklerinde *E. coli* O157:H7’nin varlığının gösterilmesi sırasıyla; selektif bir sıvı besiyerinde ön zenginleştirme, selektif-diferansiyel katı besiyerine ekim, şüpheli kolonilerin biyokimyasal testler ve O157 antiserumu ile lam ya da tüp aglutinasyon testi yapılarak veya lateks aglutinasyon testi ile *E. coli* O157 olarak belirlenmesi ve son olarak da izolatu H7 antijeni içerip içermediğinin belirlenmesi şeklindedir (**Park ve ark. 1999, Coia 1998**).

Örneklerden *E. coli* O157 izolasyonunda, novobiosin yada akriflavin içeren modifiye *E. coli* buyyon yada modifiye tryptic soy buyyonlarda 37 °C’de 24 saat zenginleştirme işlemi ortamdaki diğer yarışmacı bakterilere karşı *E. coli* izolasyon şansını artırmaktadır. Ayrıca

sefiksım tellürit ilave edilen (Sorbitol Mac Conkey Agar) SMAC gibi selektif besiyerleri ise sorbitolü fermente etmeyen nonfermentatif *E. coli* O157 serotipinin saptanmasını kolaylaştırmaktadır. Çünkü nonfermentatif koloniler renksiz koloniler oluştururken fermentatif koloniler pembe renkli koloniler oluşturmaktadır (**Kiranmayi ve ark. 2010**).

SMAC dışında, CHROMagar O157, phenol red sorbitol (PRS) + MUG (4-methylumbelliferyl-D-glucronide) agar, hemorrhagic colitis (HC) agar, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) agar, BCM O157 agar, , modifiye edilmiş eozin metilen blue (mEMB) agar, Fluorocult *E. coli* O157 agar gibi etkeni saptamaya yönelik olarak pek çok seçici besiyeri geliştirilmiştir. Bu besiyerleri etkenin biyokimyasal aktivitesi, kromojenik aktivitesi v.s gibi özellikler temel alınarak hazırlanmış besiyerleridir (**Halkman ve ark 2001**).

Ayrıca pek çok çalışmada klinik, gıda ve çevre örneklerinden *E. coli* O157 izolasyonu için immunomanyetik separasyon yönteminin başarılı şekilde kullanıldığı bildirilmiştir (**Coia 1998**).

**Immunomanyetik separasyon (IMS):** Immunomanyetik Seperasyon tekniği gıda maddelerinde ve diğer örneklerde mikroorganizmaların aranmasında kullanılan hızlı, yüksek duyarlılığa sahip ve uygulanması basit bir yöntemdir. Bu yöntemin prensibi spesifik immünokimyasal ajanlar (monoklonal, poliklonal ve rekombinant antikorlar ) ile kaplanmış manyetize olabilir boncuklar kullanılarak istenen mikroorganizmaların belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Örneklerin ön zenginleştirilmesini takiben separasyon işlemi yapılmaktadır. Separasyon işleminde kullanılan paramanyetik boncuklara *E.coli* O157'ye spesifik antikorlar tutturulmuş olup eğer zenginleştirme sonucu elde edilen kültürde etken varsa bu boncuklara antikorlar vasıtasıyla tutunmaktadır. Bu boncuklar karışık bir süspansiyon içinden bile spesifik olarak aranan mikroorganizmayı yakalayabilmektedir (**Halkman ve ark. 2001, Coia 1998**). Bu yöntem pek çok araştırmacı tarafından güvenilir ve duyarlı bulunmuş ve doğrulama için doğrudan izolasyon sağlaması nedeni ile diğer gelişmiş analiz yöntemlerine göre avantajlı olarak tanımlanmıştır (**Coia 1998**).

### 2.8.2. Serolojik Yöntemler

*E. coli* O157 suşlarının serolojik yöntemlerle belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan test, lateks aglutinasyon testidir. SMAC agarda üretilen sorbitol negatif koloniler, lateks testine tabi tutularak kısa sürede identifikasyona gidilebilir. Bununla birlikte, fekal örneklerde de bulunabilen *Escherichia hermannii* sorbitol negatif olup, *E. coli* O157 antiserumu ile aglutine olabilmekte ve böylece bu iki etken arasındaki serolojik benzerlik yanlış identifikasyon sonuçlarına neden olmaktadır (**Halkman ve ark. 2001**).

Bu yöntemlere son zamanlarda yeni serolojik metotlar özellikle immunoassay, radioimmunoassay (RIA), fluorescent immunoassay (FIA), enzim immunoassay (EIA), immun peroksidaz testleri de katılarak etkenlerin belirlenmesinde daha güvenli ve erken sonuçlar alınmaktadır. Bunlar arasında, ELISA, koloni immunblot analizleri, direkt immunofloresan filtre ve immun yakalama teknikleri *E. coli* O157:H7 analizlerinde kullanılmaktadır. Bu amaçla O ve H antijenlerine karşı monoklonal ve poliklonal antiserumlar geliştirilmiştir (**Park. ve ark. 1999, Halkman 2001, Tison 1990**).

### 2.8.3. Moleküler Yöntemler

Geleneksel tanı yöntemleri günümüzde halen birçok patojen mikroorganizmanın saptanmasında vazgeçilmez yöntemler olmalarına rağmen bazı durumlarda yetersiz kalabilmektedirler. Gelişen moleküler teşhis ve tiplendirme yöntemleri *E. coli* O157 ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (**Paton ve Paton 1998, Khan ve ark. 2002, Fagan ve ark. 1999**). Moleküler tanı yöntemleri; tanı yanında cins veya tür düzeyinde tanımlanması, epidemiyolojik tiplendirme, virulans faktörlerinin belirlenmesi, direnç genlerinin araştırılması, mutasyon incelemeleri, sınıflandırma ve filogenetik analizlerde kullanılmaktadır.

*E. coli* O157:H7'de önemli olduğu bilinen virülens özelliklerini kodlayan genler spesifik primerler kullanılarak PCR ile ya da DNA hibridizasyon teknikleri ile başarılı bir şekilde belirlenmektedir. DNA problemleri için *Stx* yada *eae* gene spesifik problemler kullanılabilmektedir (**Park ve ark. 1999, Andral ve ark. 2004**). PCR ile O157 (*rfbE*) ve H7 (*fliC*)'yi kodlayan genler teşhis edilerek serotip olarak etken doğrulanabilmektedir. Etkene ait virülens genlerinin teşhisinde *pfO157*, *stx1*, *stx2*, *eae* ve *ehxA* gen bölgelerine spesifik primerlerin kullanıldığı PCR metotları geliştirilmiştir. Ayrıca Multipleks PCR, birden çok gen bölgesini çok sayıda primer çifti kullanarak bir defada saptanmasını sağlayabilmektedir (**Fagan ve ark. 1999**). Real-time PCR da teşhiste sıklıkla kullanılmaktadır (**Fitzmaurice ve ark. 2004**).

### Genotiplendirme:

Özellikle salgınlarda, suşların alt tiplerini saptamak, infeksiyonun epidemiyolojisini, koruma ve kontrol programlarını belirlemek ve etkenin populasyon genetiğini ortaya koymak önemlidir. Genotipik tiplendirme yöntemleri içerisinde ise Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), ribotiplendirme ve ilaveten PCR tabanlı tiplendirme yöntemleri ve DNA sekanslama tabanlı tiplendirme yöntemi olarak iki ana başlık altında toplanır. PCR tabanlı tiplendirme yöntemleri; Amplified fragment length polymorphism (AFLP), Random amplified

polymorphic DNA (RAPD), PCR-restriction fragment length polymorphism, (PCR-RFLP) ve repetitive element PCR (Rep-PCR)'den oluşurken, DNA sekanslaması temeline dayanan tiplendirme metodu içerisinde ise multilokus sekans tiplendirme (MLST) yer almaktadır.

PFGE, moleküler tiplendirme yöntemlerinin altın standardı olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde, sıvı veya katı besiyerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısıklı agarozla karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir. Agaroz içine karıştırılan bakteri hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak DNA izolasyonu yapılmaktadır. PFGE'de bozulmamış DNA gerekli olduğundan, PFGE'de yüksek kalitede DNA'nın elde edilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle tekniğin uygulanması sırasında gerekli sıcak ve soğuk ortamlara dikkat edilmesi gerekmektedir (**Durmaz 2001**). PFGE, STEC O157:H7 saha izolatlarının epidemiyolojisini belirlemede en yaygın kullanılan alt tiplendirme yöntemidir (**Watabe ve ark. 2008**).

## **2.9. *Escherichia coli* O157:H7 Enfeksiyonunun Kontrolü ve Önleme Yolları**

Zoonotik bir ajan olması sebebiyle özellikle gıda üretim zincirinin her basamağında yüksek standartlarda hijyen koşullarının sağlanması gerekmektedir ve özellikle gıda üretim ve satış yerlerinde kros-kontaminasyonu engelleyici önlemlerin alınması bu enfeksiyonun ortaya çıkmasını büyük ölçüde önleyebileceği düşünülmektedir. Etken hayvanlarda, özellikle sığırlarda barsaklarda kolonize olduğu için eradike etmek mümkün olamamaktadır. Sığırlarda barsak kolonizasyonunu en aza indirmek amacıyla kompetitif mikroflora olarak probiyotikler denenmiş, EHEC O157 için aktive bakteriyofajlar kullanılmış ancak bu çalışmalar ya başarısızlıkla sonuçlanmış ya da tutarsız sonuçlar elde edilmiştir. Son zamanlarda sığırlar tarafından *E. coli* O157'nin saçılımını azaltmak amacıyla deneysel olarak, deri altı uygulanan ve tip II sekresyon proteinlerini (başlıca EspA, EspB, EspD, Tir) içeren aşılar geliştirilmeye çalışılmıştır (**Caprioli ve ark. 2005**). Ancak aşı çalışmalarında başarı sağlanamamıştır ve daha etkili aşı çalışmalarının yapılması gerekmektedir (**Fernandez 2008**). Bununla birlikte, diğer infeksiyöz hastalıklarda olduğu gibi çiftliklerde bu etkenin yayılımını azaltmak için en iyi yol iyi hijyen ve yönetim anlayışını benimsemektir (**Caprioli ve ark. 2005**). Kesimhanelerde karkasların dışkı ile bulaşmasının önlenmesi ya da minimize edilmesine ilişkin olarak özellikle HACCP uygulamalarına dikkat edilmelidir (**Fernandez 2008**).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

**Broyler Barsakları:** Özel bir işletmeye ait kanatlı hayvan kesimhanesinden her üç ayda bir 100 adet olmak üzere toplam 400 adet barsak (duodenum ve kloaka arası) numunesi alındı.

**Kesimhaneden Örnek Toplanması:** Kayseri ve çevre ilçelerindeki yetiştirilen broylerlerin kesildiği özel bir kesimhanenin farklı bölümlerinden ( haşlama tank suyu, duvar ve iç organ çıkarılma ünitesi vb.) her üç ayda bir 20 adet olmak üzere toplam 80 adet numune toplandı.

**Yumurtacı Tavuklardan Dışkı Numunelerinin Toplanması:** Kayseri'deki yumurtacı tavuk kümeslerinden, altlıklardaki dışkı örneklerinden her üç ayda bir 100 adet olmak üzere toplam 400 adet dışkı örneği alındı.

**Broyler Tavuk Eti Numunelerinin Toplanması:** Özel bir işletmeye ait kanatlı hayvan kesimhanesinde kesilen tavuklardan Kayseri şehir merkezinden satışa sunulan broyler karkaslarından her üç ayda bir 100'er adet olmak üzere toplam 400 adet broyler tavuk eti örneği alındı.(örnekler tüm karkas, kanat, göğüs, but şeklinde alınmıştır).

Çalışmada kullanılan materyallerin alındıkları dönemler ve sayıları **Tablo 3.1.**'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan materyallerin kaynağı, alındıkları dönemler ve sayıları

|                                                   | Mart, Nisan, Mayıs<br>2010 | Haziran, Temmuz, Ağustos<br>2010 | Eylül, Ekim, Kasım<br>2010 | Aralık 2010, Ocak-Şubat<br>2011 | Toplam      |
|---------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------|
| Broyler Barsak örnekleri                          | 100                        | 100                              | 100                        | 100                             | 400         |
| Kanatlı Kesimhanesi swap örnekleri                | 20                         | 20                               | 20                         | 20                              | 80          |
| Yumurtacı Tavuk dışkı örnekleri                   | 100                        | 100                              | 100                        | 100                             | 400         |
| Broyler Tavuk Eti (tüm karkas, kanat, göğüs, but) | 100                        | 100                              | 100                        | 100                             | 400         |
| <b>Toplam</b>                                     | <b>320</b>                 | <b>320</b>                       | <b>320</b>                 | <b>320</b>                      | <b>1280</b> |

**Standart suş:** Fenotipik testler, moleküler analiz, serogruplandırma ve immunomanyetik seperasyon aşamalarında kontrol amacıyla kullanılan *Escherichia coli* O157:H7 standart suş ERÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalı kültür koleksiyonundan temin edildi.

**Primerler:** İzole edilen *E.coli* O157 şüpheli izolatların sahip olduğu verotoksin, intimin ve hemolizin gen bölgelerinin moleküler analizinde kullanılan olan primer dizileri **Tablo 3. 2.**'de belirtilmiştir **Paton ve Paton (1998)**.

**Tablo 3. 2.** *E.coli* O157 şüpheli izolatların doğrulanması ve toksin genlerinin saptanması için kullanılan primerler

| Primer dizileri (5' - 3')                                        | Literatür                    | Gen bölgesi | Virulens geni   |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------|-----------------|
| O157PF8 CGTGATGATGTTGAGTTG<br>O157PR8 AGATTGGTTGGCATTACTG        | <b>Maurer ve ark. (1999)</b> | rfbO157     | LPS O157        |
| Stx1-F F ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC<br>Stx1-R AGAACGCCCACTGAGATCATC | <b>Paton ve Paton (1998)</b> | Stx1        | Verocytotoxin1  |
| Stx2-F GGCAGTGTCTGAACTGCTCC<br>Stx2-R TCGCCAGTTATCTGACATTCTG     | <b>Paton ve Paton (1998)</b> | Stx2        | Verocytotoxin 2 |
| eaeAF GACCCGGCACAAGCATAAGC<br>eaeAR CCACCTGCAGCAACAAGAGG         | <b>Paton ve Paton (1998)</b> | eaeA        | İntimin         |
| hlyAF GCATCATCAAGCGTACGTTCC<br>hlyAR AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT      | <b>Paton ve Paton (1998)</b> | hly         | Enterohemolysin |

**Besiyerleri ve supplementler:** Çalışma için aşağıda belirtilen Besiyerleri ve supplementler kullanılmıştır

**Novobiocin supplement (LabM X150, UK)**

**EC (*E.coli*) Medium (LabM 171,UK)**

**Sorbitol Mc Conkey Agar (Merck 1.09207 Almanya)**

**CT Supplement (Cefixime Tellurite) (Merck 1.09202 Almanya)**

**CHROMagar™ O157 (EE222, Paris, Fransa)**

**Dynabeads Anti *E.coli* O157 (Invitrogen, 710.04 Dynal AS, Oslo Norvay)**

***E. coli* O157 lateks test kiti**

### 3.2. METOT

#### 3.2.1. Broyler tavuk etlerinden *E.coli* O157 izolasyonu

Çalışma kapsamında incelenen broyler tavuk etlerine ait numunelerden aseptik koşullarda 25 gr tartılarak içerisinde 225 ml, novobiocin (20 mg/L) içeren *E.coli* broth ile steril stomacher

poşeti içinde homojenize edildi ve homojenize edilen karışım 37°C’de 16-18 saat aerobik ortamda inkübasyona bırakıldı (Jo ve ark 2004 ).

### **3.2.2.Broyler tavuklara ait barsak içeriğinden *E.coli* O157 izolasyonu**

Bu amaçla kanatlı kesimhanesinde kesilen 6 haftalık broyler tavuklara ait intestinal sisteminden alınan dışkı örneği kullanıldı. Barsağın farklı bölgelerinden (sekum, kolon ve kloaka) 10-20 gr dışkı alınarak novobiosinli (20 mg/L) *E.coli* broth içerisinde 1/10 oranında sulandırıldı ve stomayer poşeti içersinde 1 dakika homojenize edilerek 50 ml’lik ağzı vida kapaklı steril tüplere aktarıldı. Tüpler 37 °C’de 6-7 saat süre ile su banyosu içerisinde inkübe edildikten sonra karışımdan 5 ml alınarak kağıt havlu veya filtreden geçirilerek süzüldü ve elde edilen filtrat immunomanyetik separasyon için kullanıldı (Heuvelink ve ark.1999).

### **3.2.3. Kanatlı kesimhanesinden alınan svaplardan *E.coli* O157 serotipinin izolasyonu**

Bu amaçla kanatlı mezbahanesinin farklı bölümlerinden (haşlama tank suyu, duvar ve iç organ çıkarılma ünitesi) steril svaplar ile örnekler alındı. Kesimhanenin her 10 m<sup>2</sup>’sinden bir adet svap alındı. Alınan svaplar önce 10 ml novobiosinli GN broth içersinde ön zenginleştirme işlemine tabii tutuldular ve daha sonra immunomanyetik seperasyon işlemi yapıldı (Gün ve ark. 2003).

### **3.2.4. İmmunomanyetik Separasyon Yöntemi**

Bu yöntemde numuneler novobiosinli *E.coli* broth’da ön zenginleştirme işlemine tabii tutulduktan sonra Dynabeads anti-*E.coli* O157 kullanılarak immunomanyetik separasyona tabii tutuldular. İmmunomanyetik seperasyon işlemi üretici firmanın direktifleri doğrultusunda yapıldı. İmmunomanyetik separasyon işleminden elde edilen ürünler cefixime tellurite (CT) supplement’li Sorbitol McConkey Agar (SMAC) ve Chrom agara ekilerek, 37°C’de 18-24 saat inkübe edildiler.

İnkübasyon süresi sonunda, cefixime tellurite (CT) supplement’li Sorbitol McConkey Agar (SMAC)’da üreyen nonfermentatif koloniler ve CHROM agarda üreyen leylak renkli koloniler değerlendirmeye alındı (Jo ve ark. 2004).

### **3.2.5.Biyokimyasal testler**

Sorbitol McConkey Agar (SMAC) ve CHROM agar’da üreyen kolonilerin *E.coli* yönünden doğrulanması için Gram boyama ve biyokimyasal testlerden yararlanıldı (Arda 2011)

#### **Gram Boyama**

İzolatlar Gram boyama ile boyanarak immersiyon objektifinde incelendi ve preparatta gözlenen Gram negatif çomaklar pozitif olarak değerlendirildi (Arda 2011).

### **Biyokimyasal Testler**

Sorbitol McConkey Agar (SMAC) ve Chrom agar'da üreyen nonfermentatif kolonilerin identifikasyonunda; indol, metil red (MR), voges proskauer (VP), sitrat, oksidaz,  $\beta$ -glukuronidaz, lizin dekarboksilaz, hidrojen sülfür ( $H_2S$ ), glukoz, laktoz ve sakkoroz fermentasyonu testlerinden yararlanıldı (Arda 2011)

#### **İndol Testi**

Test için, Tryptone Water (Merck 1. 10859) sıvı besiyeri kullanıldı. İzolatın 18 saatlik kültüründen besiyerine inokülasyon yapılarak 37 °C'de 24-48 saat inkübe edildi. Süre sonunda 0,5 ml Kovacs' indol ayırıcı (Merck 1. 09293) ilave edildi. Tüpün üst kısmında kalıcı kırmızı halkanın oluşması pozitif (+), sarı-kahverengi halka ise negatif (-) olarak değerlendirildi

#### **Metil red ( MR ) Testi**

Testte MR / VP Medium (Oxoid CM43) kullanıldı. İzolatın taze kültüründen içinde 5 ml sıvı besiyeri bulunan tüplere inokülasyon yapıldı ve 37 °C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben üzerine birkaç damla metil red indikatörü damlatıldı. Besiyerinde belirgin kırmızı renk oluşumu pozitif, sarıturuncu rengin oluşması ise negatif olarak değerlendirildi.

#### **Voges Proskauer (VP) Testi**

Bu amaçla MR / VP Medium (Oxoid CM43) kullanıldı. İzole edilen bakterinin taze kültüründen içinde 5 ml sıvı besiyeri bulunan tüplere inoküle edildi ve 37 °C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda üzerine 1 ml %40'lık potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi ve 3 ml %5'lik  $\alpha$ -naftol çözeltisi ilave edildikten sonra iyice karıştırılarak 2-5 dakika içinde oluşan pembe renk pozitif, sarı renk oluşumu ise negatif olarak değerlendirildi.

#### **Sitrat Testi**

Testte, Simmons Citrate Agar (Oxoid CM155) kullanıldı. Şüpheli izolatın taze kültüründen iğne uçlu öze ile alınan koloniler dibe daldırma ve yüzeye çizme yapılarak 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası mavi renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

#### **Oksidaz Testi**

Test için, Identification Sticks Oxidase (Oxoid BR64A) hazır test çubukları kullanıldı. Çubuğun N-dimetil-p-fenilendiamin-okzalit, askorbik asit ve  $\alpha$ -naftol solusyonu ile kaplanmış uç kısmı şüpheli koloniye dokunduruldu ve 30 saniye içinde mavi-mor renk oluşması pozitif, renk değişikliğinin şekillenmemesi ise negatif olarak değerlendirildi.

#### **$\beta$ -glukuronidaz Testi**

Test için izolatın taze kültüründen MUG supplement (Oxoid BR071E) katkılı Violet Red Bile Agar (VRB, Merck 1.01406)'a öze ile çizim yapıp 35°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon

sonrası karanlık bir odada UV lambası ile floresan kontrolü yapıldı. Floresan ışımaya veren koloniler  $\beta$ -glukuronidaz reaksiyonu (MUG) pozitif, ışımaya vermeyenler ise negatif olarak değerlendirildi.

### **Triple Sugar Iron Agar Testi**

Test için, Triple Sugar Iron Agar (TSI, Oxoid CM277) kullanıldı. Şüpheli izolatın taze kültüründen yatık agara daldırma ve yüzeye çizme şeklinde ekim yapılarak tüpler 35°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda tüpün dip kısmında sarı (glikoz kullanımı), yüzeyde kırmızı renk oluşmaması (laktoz ve sakarozun kullanılması) pozitif, tüpün dip kısmında siyah renk oluşmaması (H<sub>2</sub>S, hidrojen sülfür), besiyerinde gaz deliklerinin ve/veya hava kabarcıklarının oluşmaması ve/veya besiyerinin dip kısmından yukarı doğru itilmemesi negatif olarak değerlendirildi.

### **Lisin Dekarboksilaz Testi**

Test, Lisin Iron Agar (LIA, Oxoid CM277) kullanılarak gerçekleştirildi. İğne uçlu öze ile bakterinin taze kültüründen yatık agara daldırma ve yüzeye çizme şeklinde ekim yapıldı ve tüpler 37°C'de 24- 48 saat inkübe edildi. Süre sonunda tüpün dip kısmında viyole renk oluşumu lizin dekarboksilaz pozitif, siyah renk oluşumu hidrojen sülfür pozitif, sarı renk oluşumu ise lizin dekarboksilaz negatif olarak değerlendirildi.

### **3.2.6.Serolojik identifikasyon**

Elde edilen izolatların doğrulanması amacıyla serolojik identifikasyondan yararlanıldı. Test pozitif kontrol eşliğinde *E. coli* O157 lateks test kiti kullanılarak yapıldı. Testte aglutinasyon veren izolatlar virülens faktörlerinin ve O157 serotipinin moleküler olarak doğrulanması amacıyla gliserinli buyyon (%15) içerisinde -80 °C'de muhafaza edildiler.

### **3.2.7. Moleküler Analiz**

İzolatların *E.coli* O157 olarak doğrulanması ve sahip oldukları toksin genlerinin saptanması amacıyla multiplex polymerase chain reaction (mPCR) kullanıldı. Testle ilgili protokol aşağıda belirtilmiştir.

### **DNA ekstraksiyonu**

Numunelerden izole edilen ve lateks kiti ile pozitif reaksiyon veren *E.coli* O157 serotipine ait izolatların DNA'ları, bakteri kültürlerinden DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak yapıldı. Ekstraksiyon, kit üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi.

### **Multipleks PCR**

Moleküler analiz için 2 PCR protokolü uygulandı. Bunlardan ilki serolojik olarak *E.coli* O157 olarak saptanan izolatların moleküler olarak doğrulanması amacıyla kullanılan protokol olup, Maurer ve ark.(1999)'nın bildirdikleri yöntem uygulanmıştır. Burada *E.coli* O157

yönünden pozitifliğin kabul edildiği bant büyüklüğü yaklaşık 420 bp olarak bildirilmiştir. İkinci protokol ise *E.coli* O157 serotipine ait verotoksin, intimin ve hemolizin gen bölgelerine spesifik primerlerin kullanıldığı mPCR olup bu yöntem **Paton ve Paton (1998)** tarafından bildirildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

#### **PCR ürün analizi**

Amplikonlar % 2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu ve sonuçlar bilgisayarlı jel dokümantasyon sisteminde analiz edildi. Analiz sonucunda elde edilen görüntüler termal yazıcı ile resmedildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışma kapsamında *E.coli* O157 yönünden incelenen toplam 1280 adet örneğin CHROM agardaki koloni rengi (leylak renkli koloni oluşumu pozitif olarak değerlendirildi) göz önünde bulundurulduğunda 334 adedi bu kritere göre pozitif olarak değerlendirildi. Çalışmanın başlangıcındaki izolasyon aşamasında örnekler ön zenginleştirmeden sonraki basamakta hem SMAC agar ve hem de CHROM agara ekilerek çalışma bu iki besiyerinin birlikte kullanılmasıyla yürütülmüştür. Ancak bu iki besiyerindeki *E.coli* O157 yönünden şüpheli, koloniler değerlendirildiğinde CHROM agarın daha seçici olduğu gözlemlendiğinden dolayı çalışmaya sadece chrom agar kullanılarak devam edilmiştir. Bununla birlikte CHROM agarda üreyen şüpheli koloniler daha sonra SMAC agara ekilerek sorbitolü fermente etmeyen, nonfermentatif özellikte oldukları teyit edilmiştir.

Dört dönem için toplanan örneklerin CHROM agara ekimleri sonucunda üreyen kolonilerin yapısı ve rengi göz önünde bulundurulduğunda elde edilen pozitiflik sayısı ve izolat sayısı Tablo 3’de toplu olarak verilmiştir. Bu tabloda görüleceği üzere her örnekten ekim sonrası gözlenen leylak pembe renkli koloniler pozitif olarak değerlendirilmiş ve bir örnekten bu özelliğe sahip 3 koloni seçilerek pasajlanmış ve saf kültür halinde diğer testler için saklanmıştır. Tablo 3’de verilen pozitif örnek sayısı ile elde edilen izolat sayısının uyumlu olmadığı görülmektedir. Bunun sebebi, bazı pozitif örneklerde *E.coli* O157’ye özgü leylak pembe renkli koloni sayısının 1 veya 2 ile sınırlı kalmasındandır.

**Tablo 4.1.** Çalışmada kullanılan materyallerin alındığı dönemler, pozitif örnek sayısı ve elde edilen izolat sayısı.

| İncelenen örnek           | Alındığı Dönem                | İncelenen Örnek sayısı | <i>E.coli</i> O157 yönünden şüpheli koloniye sahip pozitif örnek sayısı | Elde edilen <i>E.coli</i> O157 şüpheli izolat sayısı | Lateks aglutinasyon testi ile <i>E.coli</i> O157 olarak doğrulanan izolat sayısı | PCR ile <i>E.coli</i> O157 olarak doğrulanan izolat sayısı |
|---------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Tavuk karkas              | (Mart-Nisan-Mayıs) 2010       | 100                    | 4                                                                       | 12                                                   | 0                                                                                | 0                                                          |
|                           | (Haziran-Temmuz-Ağustos) 2010 | 100                    | 12                                                                      | 36                                                   | 0                                                                                | 0                                                          |
|                           | (Eylül-Ekim-Kasım) 2010       | 100                    | 12                                                                      | 34                                                   | 0                                                                                | 0                                                          |
|                           | (Aralık 2010-Ocak-Şubat 2011) | 100                    | 9                                                                       | 27                                                   | 0                                                                                | 0                                                          |
| Yumurtacı tavuk dışkı     | (Mart-Nisan-Mayıs) 2010       | 100                    | 10                                                                      | 29                                                   | 0                                                                                | 0                                                          |
|                           | (Haziran-Temmuz-Ağustos) 2010 | 100                    | 9                                                                       | 26                                                   | 0                                                                                | 0                                                          |
|                           | (Eylül-Ekim-Kasım) 2010       | 100                    | 6                                                                       | 16                                                   | 0                                                                                | 0                                                          |
|                           | (Aralık 2010-Ocak-Şubat 2011) | 100                    | 11                                                                      | 32                                                   | 0                                                                                | 0                                                          |
| Broiler dışkı             | (Mart-Nisan-Mayıs) 2010       | 100                    | 3                                                                       | 9                                                    | 1                                                                                | 0                                                          |
|                           | (Haziran-Temmuz-Ağustos) 2010 | 100                    | 9                                                                       | 27                                                   | 1                                                                                | 0                                                          |
|                           | (Eylül-Ekim-Kasım) 2010       | 100                    | 12                                                                      | 34                                                   | 0                                                                                | 0                                                          |
|                           | (Aralık 2010-Ocak-Şubat 2011) | 100                    | 8                                                                       | 24                                                   | 0                                                                                | 0                                                          |
| Tavuk kesimhane örnekleri | (Mart-Nisan-Mayıs) 2010       | 20                     | 2                                                                       | 5                                                    | 1                                                                                | 0                                                          |
|                           | (Haziran-Temmuz-Ağustos) 2010 | 20                     | 6                                                                       | 16                                                   | 2                                                                                | 0                                                          |
|                           | (Eylül-Ekim-Kasım) 2010       | 20                     | 1                                                                       | 3                                                    | 2                                                                                | 0                                                          |
|                           | (Aralık 2010-Ocak-Şubat 2011) | 20                     | 2                                                                       | 4                                                    | 1                                                                                | 0                                                          |
| Toplam                    |                               | 1280                   | 116                                                                     | 334                                                  | 8                                                                                | 0                                                          |

#### **4.1.Biyokimyasal test sonuçları**

Dört dönem sonunda dört farklı kaynaktan elde edilen 1280 adet örneğin incelenmesi sonucu toplam 334 adet *E.coli* O157 şüpheli izolat biyokimyasal testler sonucunda *E.coli* olarak tanımlanmışlardır.

#### **4.2.Serolojik tanımlama**

Biyokimyasal testler ile tanımlanmış 334 izolatın lateks aglutinasyon testi ile yapılan serolojik kontrolünde toplam 8 adet izolat *E.coli* O157 olarak tanımlanmış oldu.

#### **4.3.Moleküler Analiz**

Serolojik kontrolde *E.coli* O157 olarak tanımlanmış 8 adet izolatın, *E.coli* O157'nin *rfbO157* gen bölgesine spesifik primerler ile yapılan PCR'de beklenen 420 bp büyüklüğündeki bantlar elde edilemedi ve izolatların tamamı bu bakteri yönünden negatif bulundu. Ayrıca bu izolatlar **Paton ve Paton (1998)** tarafından bildirilen yöntem ile toksin genleri yönünden de analiz edilmişler ancak tüm izolatlar bu toksinler yönünden de negatif bulunmuşlardır.

## 5. TARTIŞMA

Yurdumuzda ve diğer ülkelerde *E.coli* O157 serotipinin gerek kanatlı hayvanların sindirim sistemlerindeki varlığının saptanması ve gerekse kanatlı etlerindeki kontaminasyon durumlarına ilişkin çeşitli araştırmalar yürütülmüştür. Nitekim **Mercanoğlu ve Aytaç (2006)** Kasım 2001-Temmuz 2002 döneminde Ankara'daki farklı marketlerden 8 aylık bir süreçte topladıkları 57 adet tavuk eti örneğinin, klasik kültürel yöntem kullanıldığında 1 adet (% 1.8), immunomanyetik ayırma (İMA) yöntemi kullanıldığında ise 2 adet (% 3.5) örnekte *E. coli* O157 saptamışlardır. **Ünsal (2007)**, Temmuz-Aralık 2006 tarihleri arasında Erzurum ili ve ilçelerinde çeşitli kasap ve marketlerden temin edilen, 120 sığır, 105 tavuk ve 105 hindi eti numunesinde *E. coli* O157:H7 varlığına ilişkin yürüttüğü çalışmada, 105 tavuk eti numunesinin 3'ünde (%2,7) *E. coli* O157 bulunduğunu, bu izolatlardan 1 adedinin (%0,9) *E. coli* O157:H7 olduğunu tespit etmiştir. Araştırmacı çalışmada identifikasyon için klasik kültürel yöntem kullanmıştır. **Sekmen ve Kaya (2010)** İzmir, Manisa, Aydın, Denizli ve Uşak illerindeki broiler kümeslerinden aldıkları kloakal svab örneklerinde *E. coli* O157:H7'in varlığını konvansiyonel kültür metodu ile araştırmışlar ve 500 adet kloakal svab örneğinin 32 (% 6.40)'sinden *Escherichia coli* O157:H7 serotipi identifiye etmişlerdir. **Kalin ve ark.(2012)**, Elazığ'da yürüttükleri çalışmada 1000 adet broiler barsak içeriği, 1000 adet broiler karaciğeri, 1000 adet karkas swap ve 367 adet ishali insan dışkı örneğinden *E.coli* O157 serotipinin izolasyonuna ilişkin yürüttükleri çalışmada iç organlardan %0.1, barsak içeriğinden %0.4, insan ishal olgularından %2.7 oranında bu bakteriyi izole ettiklerini ancak tavuk karkaslarından herhangi bir izolasyon yapılamadığını bildirmişlerdir. Yine yurdumuzda **Baran ve Gülmez (2000)** Kars ilinde marketlerden satın alınan 50 adet tavuk eti örneğini *E.coli* O157:H7 yönünden incelemişler ve tüm örneklerin bu etken yönünden negatif olduğunu bildirmişlerdir. **Raji ve ark. (2006)** Tanzania'da tavuk kesimhanesinden aldıkları 120 adet tavuk barsak içeriğinde *E. coli* O157'nin varlığını araştırmışlar ve 11(%9.6) örneği bu etken yönünden pozitif olarak saptamışlardır. **Heuvelink ve ark. (1999)** inceledikleri 501 adet yumurtacı tavuklara ait dışkı örneğini *E.coli* O157 yönünden negatif bulmuşlardır. **Doyle ve Schoeni (1987)** inceledikleri 263 kanatlı eti örneğinin 4(%1.5)'ünü *E.coli* O157:H7 yönünden pozitif bulmuşlardır. **Tabatabaei ve ark. (2011)**, İran'da 28 broiler işletmesinden aldıkları 350 dışkı örneğinin 14(%4)'ünden shiga toxigenic *E.coli* (STEC) izole etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında bu izolasyonun İran'da ilk kez rapor edildiğini ve bu etkenlerin kümes ve kanatlı kesimhanelerinde çalışanlar için önemli olduğunu vurgulamışlardır. Kanatlı hayvanlar ve ürünlerinin bu mikroorganizmayı taşıyıcılıkları ile ilgili literatür incelendiğinde

eldeki bilgiler, anılan kaynakların bu etken için çok güçlü bir rezervuar olmadıklarını göstermektedir. Yine *E.coli* O157'nin çeşitli materyallerden ön zenginleştirme ile izolasyonu ve daha sonra identifikasyonda sadece fenotipik testler ile sonuca gidilmesi ve moleküler analizden yararlanılmamış olması sonuçların göreceli olarak yorumlanmasına da sebep olmaktadır. Yurdumuzda yürütülen 2 çalışmada (**Ünsal 2007, Sekmen ve Kaya 2010**) bu durum sözkonusu olup bu çalışmalarda moleküler yöntemle identifikasyon yoluna gidilmemiştir. Bunun yanında **Shepherd ve ark. (2010)** Amerika Birleşik Devletleri'nde yürüttükleri bir çalışmada kanatlı işletmelerinden toplanan dışkı örneklerinde *E.coli* O157:H7'yi bulamadıklarını rapor etmişlerdir.

**SONUÇ:** Elde edilen sonuçlar Kayseri yöresinde kanatlı hayvanların ve bunlara ait et örneklerinin *E.coli* O157 serotipini taşımadıklarını göstermekle beraber değişik lokalizasyonlarda daha fazla sayıda kanatlı orijinli örneğin bu bakteri yönünden incelenmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- ABUT I.L.**, Enterotoksijenik *Escherichia coli*. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007;27:768-773.
- ANDRAL B, ASPAN A, PÉRELLE S, FACH P.** PCR Detection of Virulence Genes and Molecular Epidemiology of STEC O157 Isolates from French Abattoirs. Vet Rec. 2004; 155 (12): 365-368.
- ARDA, M.** Temel Mikrobiyoloji. Medisan yayınevi. 4.baskı, 2011, Ankara.
- ARDA M, MİNBAY A, LELOĞLU N, AKAY Ö, İZGÜR M, DİKER SK, KAHRAMAN M, ILGAZ A.** Özel Mikrobiyoloji, Medisan Yayınevi 1997; No:26 Ankara.
- ARMSTRONG, G.L., HOLLINGSWORTH, J., MORRIS, J.G., JR.** Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157 : H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. Epidemiol Rev. 1996; 18: 29–51.
- ARSLAN D.** İshal oluşturan *Escherichia coli* infeksiyonları, epidemiyoloji, klinik, tedavi. Ankem Derg., 2008; 22(Ek 2):192-196.
- BARAN F., GÜLMEZ M.** The occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in the ground beef and chicken drum sticks. Internet J. food Safety V.2, 13-15. internetjfs.org. Erişim tarihi: 28.03.2012.
- BEHIRY I.K., ABADA E.A., AHMED E.A., LABEEB R.S.** Enteropathogenic *E. coli* associated with diarrhea in children in Chairo, Egypt. Scientific World J. 2011; 11: 2613–2619.
- CAPRIOLI A., MORABITO S., BRUGERE H., OSWALD E.** Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet. Res. 2005;36:289-311.
- COIA J.E.** Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. FEMS Immunology and Medical Microbiology 1998; 20: 1-9.
- DOYLE M.P., SCHOENI J.L. 1987.** Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. Appl. Environ. Microbiol. 53(10)2394-2396
- DURMAZ R.** Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi. Nobel Kitabevleri Ltd. Şti, Ankara 2001; 161-168.
- FAGAN PK, HORNITZKY MA, BETTELHEIM KA, DJORDJEVIC SP.** Detection of Shiga-like Toxin (stx1 and stx2), Intimin (eaeA), and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Hemolysin (EHEC hlyA) Genes in Animal Feces by Multiplex PCR. Appl Environ Microbiol. 1999;65 (2): 868-872.

**FERNANDEZ T.F.** *E. coli* O157:H7. Vet. World. 2008;1(3):83-87.

**FITZMAURICE J, GLENNON M, DUFFY G, SHERIDAN JJ, CARROLL C, MAHER M.** Application of Real-time PCR and RT-PCR Assays for the Detection and Quantitation of VT 1 and VT 2 Toxin Genes in *E. coli* O157:H7. Mol Cell Probes. 2004;18 (2): 123-132.

**GÜN H., YILMAZ A., TÜRKER S., TANLASI A., YILMAZ H.** Contamination of bovine carcasses and abattoir environment by *Escherichia coli* O157 in İstanbul. Int. J. Food Microbiol., 2003, 84: 339-344.

**HALKMAN AK, NOVEIR MR, DOĞAN HB.** *Escherichia coli* O157:H7 serotipi. Orkim Ltd Şti. Ankara 2001; 2-35.

**HEUVELINK A.E., ZWARTKRUIS-NAHUIS J.T.M., VAN DEN BIGGELAAR F.L.A.M., VAN LEEUWEN W.J., DE BOER E.** Isolation and Characterization of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 From Slaughter Pigs and Poultry. International Journal of Food Microbiology 1999, 52: 67–75.

**HUANG D.B., MOHANTY A., DUPONT H.L., OKHUYSEN P.C., CHIANG T.** A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. J. Med. Microbiol. 2006;55:1303-1311.

**İZGÜR M.** Fakültatif Anaerobik Gram Negatif Çomaklar. In: Özel Mikrobiyoloji. Ed: Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS. Medisan Yayınevi, Ankara 1999; pp 45-86.

**İZGÜR, M.** Koli Enfeksiyonları. In: Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Ed: M. İzgür, M. Akan: Medisan Yayınevi, Ankara. 2002; pp: 55-59.

**JO M.Y., KIM J.H., LIM J.H., KANG M.Y., KOH H.B., PARK Y.H., YOON D.Y., CHAE J.S., EO S.K., LEE J.H.** Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. Int J Food Microbiol. 2004; 15;95(1): 41-9.

**KALİN, R. ONGOR, H. CETİNKAYA, B.:** Isolation and Molecular Characterization of *Escherichia coli* O157 from Broiler and Human Samples. Foodborne Paht.Dis. 9(4): 2012

**KARCH H, BIELASZEWSKA M.** Sorbitol-fermenting shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H- strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. J. Clin. Microbiol., 2001; 39: 2043-2049.

**KHAN A., DAS C.S., RAMAMURTHY T., SIKDAR A., KHANAM S., YAMASAKI S., TAKEDA Y., BALAKRISH NAIK B.** Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources in Calcutta, India. J. Clin. Microbiol., 2002, 40(6): 2009-2015.

**KIRANMAYI C.B., KRISHNAIAH N., NAGA MALLIKA E.** *Escherichia coli* O157:H7 - An Emerging Pathogen in foods of Animal Origin. *Veterinary World*. 2010;3(8):382-389.

**KUNTZ TB, KUNTZ ST.** Enterohemorrhagic *E.coli* infection. *Prim Care Update OB/GYNS* 1999; 6: 192-196.

**MAURER, J.J., SCHMIDT, D., PETROSKO, P., SANCHEZ, S., BOLTON, L., LEE, M.D.** Development of Primers to O-Antigen Biosynthesis Genes for Specific Detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65:2954–2960

**MERCANOĞLU, B., AYTAÇ, S.A:** Ankara Piyasasında Satışa Sunulan Tavuk Etlerinde *Yersinia enterocolitica* ve *Escherichia coli* O157 Varlığının Araştırılması. Türkiye 9. Gıda Kongresi, sayfa 451-454, 24-26 Mayıs 2006, Bolu

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

**ÖNGEN B.** *Escherichia coli* ishallerinde laboratuvar tanısı *Aknem Derg.* 2008;22:197-210.

**PADHYE NV, DOYLE MP.** *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *J Food Protect* 1992; 55: 555-565.

**PARK S, WOROBO R, DURST R.** *Escherichia coli* O157:H7 As an Emerging Foodborne Pathogen: A Literature Review. *Crt. Rev. Food Sci Nutrition* 1999; 39(6): 481-502.

**PATON A.W. AND PATON J.C.** Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157* *J. Clin Microbiol.* 1998: 598–602.

**QUINN PJ, MARKEY BK, CARTER ME , DONNELLY WJ, LEONARD FC.** *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Iowa: Blackwell Publishing Professional 2002; p:106-113.

**RAJI, M.A., MINGA, U.M., MACHANG’U, R.S.** Prevalance and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 isolated from local chicken in Morogoro, Tanzania. *J. Anim. Vet. Advan.*, 2006, 5(11):952-958

**RATNAM S, MARCH SB, AHMED R, BEZANSON GS, KASATIYA S.** Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J. Clin. Microbiol.*, 1988; 26: 2006-2012.

**ROBINSON A.L., MCKILLIP J.L.** Biology of *Escherichia coli* O157:H7 in human health and food safety with emphasis on sublethal injury and detection. Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A. Mendez-Vilas (Ed.). 2010;1096-1105.

**SEKMEN, S.G.D., KAYA, O.:**Broiler Piliçlerden *Escherichia coli* O157:H7 serotipi-nin İdentifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg., 2010, 37 (1): 19-31

**SHEPHERD JR. M.W., LIANG, P., JIANG X., DOYLE M.P., ERICKSON, M.C.** Microbiological analysis of composts produced on South Carolina poultry farms. J. Appl. Microbiol., 2010, 108: 2067–2076

**TABATABAEI, M., MOKARIZADEH, A.FOAD-MARASHI, N.** Detection and molecular characterization of sorbitol negative shiga toxigenic *Escherichia coli* in chicken from northwest of Iran. Vet. Res. Forum. 2011, 2(3): 183-188

**TISON DL.** Culture Confirmation of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 by Direct Immunofluorescence. J. Clin. Microbiol., 1990; 28(3): 612-613.

**TÖRECİ K, "Escherichia türleri"** Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, 2002; cilt 2, ss 1564-1574.

**ÜNSAL, C.:** Erzurum Bölgesinde Satışa Sunulan Etlerde *E. coli* O157: H7'nin Varlığının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, ERZURUM-2007.

**WATABE M., HOGG G.M., MILLAR B.C., CROTHERS L., ROONEY P.J., LOUGHREY A., GOLDSMITH C.E. ET. AL.** Epidemiological study of *E. coli* O157:H7 isolated in Northern Ireland using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Ulster Med J 2008; 77 (3) 168-174.

**WASTESON Y.** Zoonotic *Escherichia coli*. Acta Vet. Scand. 2001;95:79-84.

**WELINDER-OLSSON C., KAIJER B.** Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Scand. J. Infec. Dis. 2005;37:405-416.

**WILLKE A.** *Escherichia coli* ishallerinde etiyoloji ve patogenezi. Ankem Derg., 2008; 22(Ek 2):188-191.

**YOUN L.J., YOON J.W., HOVDE C.J.** A Brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. J. Microbiol. Biotechnol. 2010;20:1-10.