



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM
DALI



**HAYVANSAL KAYNAKLI *Escherichia coli* İZOLATLARINDA
BAZI VİRULENS GENLERİNİN PCR ile SAPTANMASI**

Mohammed KHIDER ABD ALRAHIM AHMED

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2017

Mohammed KHIDER

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2017



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**HAYVANSAL KAYNAKLI *Escherichia coli* İZOLATLARINDA BAZI
VİRULENS GENLERİNİN PCR ile SAPTANMASI**

Mohammed KHIDER ABD ALRAHIM AHMED

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Döç. Dr. Esra BÜYÜKCANGAZ

Proje No- KUAP (V) – 2014/43

BURSA-2017

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum “Hayvansal Kaynaklı *Escherichia coli* İzolatlarında Bazı Virulens Genlerinin PCR ile Saptanması” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Mohammed

MOHAMMED KHIDER ABD ALRAHIM AHMED

11/08/2017

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Mohammed KHIDER ABD ALRAHIM AHMED tarafından hazırlanan 'HAYVANSAL KAYNAKLI *Escherichia coli* İZOLATLARINDA BAZI VİRULENS GENLERİNİN PCR ile SAPTANMASI konulu Doktora tezi 22/08/2017 günü, 10:00-12:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>		<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Doç. Dr. Esra BÜYÜKCANGAZ	Uludağ Üniversitesi/ Veteriner Fakültesi	
Üye	Prof. Dr. Ayşin ŞEN	Uludağ Üniversitesi/ Veteriner Fakültesi	
Üye	Doç. Dr. Murat CENGİZ	Uludağ Üniversitesi/ Veteriner Fakültesi	
Üye	Prof. Dr. Arzu FUNDA BAĞCIGİL	İstanbul Üniversitesi/ Veteriner Fakültesi	
Üye	Doç. Dr. Kemal METİNER	İstanbul Üniversitesi/ Veteriner Fakültesi	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

22/08/2017

Adı Soyadı: Mohammed KHIDER ABD ALRAHIM AHMED

Anabilim Dalı: Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: HAYVANSAL KAYNAKLI *Escherichia coli* İZOLATLARINDA BAZI VİRULENS GENLERİNİN PCR ile SAPTANMASI

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Doç. Dr. Esra BÜYÜKCANGAZ

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI	II
KABUL ONAY	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	XI
ABSTRACT	XII
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 <i>Escherichia coli</i>	4
2.1.1 Tarihçesi	4
2.1.2 Hastalığın Etiyolojisi	4
2.1.2.1 Taksonomisi	4
2.1.2.2 Antijenik Yapısı	5
2.1.2.2.1 Somatik “O” Antijenleri	5
2.1.2.2.2 Flagellar “H” Antijenleri	5
2.1.2.2.3 Kapsüller “K” Antijenleri	5
2.1.3 Virulens faktörleri	6
2.1.3.1 Shiga toksinler	6
2.1.3.2 Intimin	6
2.1.3.3 Enterotoksinler	7
2.1.3.4 Fimbrial (pilus) Antijenleri.....	7
2.1.4 Genogrupları ve Serotipleri	7
2.1.4.1 Shiga toksini üreten <i>E. coli</i> (STEC)	8
2.1.4.1.1 Enterohemorajik <i>E. coli</i> (EHEC).....	9

2.1.4.2 Enteropatojenik <i>E. coli</i> (EPEC).....	9
2.1.4.3 Enterotoksijenik <i>E. coli</i> (ETEC).....	10
2.1.4.4 Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EaggEC).....	11
2.1.4.5 Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	11
2.1.4.6 Cytotoksik Nekrotizan Faktör (CNF)	12
2.1.4.7 Ekstraintestinal patojen <i>E. coli</i> (ExPEC).....	12
2.1.4.8 Diffüz Adherent <i>E. coli</i> (DAEC).....	13
2.1.5 Epizootiyolojisi.....	15
2.1.6 Klinik Belirtiler	20
2.1.7 Patogenezi.....	21
2.1.8 Patotiplendirilmesi.....	23
2.1.9 Teşhisi.....	27
2.1.10 Antimikrobial Direnç.....	27
2.1.10.1 Florokinolonlara karşı gelişen direnç (FQR)	30
2.1.10.2 Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlara karşı gelişen direnç.....	31
2.1.11 Kontrol Önlemleri	32
3 GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1 Gereç.....	33
3.1.1 Örnekleme	33
3.1.2 Tez çalışmasında kullanılan Referans Suşlar.....	44
3.1.3 Bakteriyolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyaller	44
3.1.3.1 Besiyerleri	44
3.1.3.1.1 Tryptose Soya Agar (TSA).....	44
3.1.3.1.2 Tryptone Soya Broth (TSB)	45
3.1.3.1.3 Kanlı Agar (KA).....	45

3.1.3.1.4 MacConkey (MC) Agar.....	45
3.1.3.1.5 Eosine Methylene Blue (EMB) Agar	45
3.1.3.1.6 Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar.....	45
3.1.3.2 Cihaz ve Gereçler	46
3.1.3.2.1 Binokuler Mikroskop Olympus® CH20BIMF200	46
3.1.3.2.2 Buzdolabı Arçelik® Çift Kapaklı No-frost.....	46
3.1.3.2.3 Derin Dondurucu	46
3.1.3.2.4 İnkübatör (37 °C) (Nüve EN 500)	46
3.1.3.2.5 Gram boyama seti.....	46
3.1.3.2.6 Hassas terazi	46
3.1.3.2.7 Oksidaz test şeriti	46
3.1.3.2.8 Otoklav	46
3.1.3.2.9 pH kağıdı	46
3.1.3.2.10 Steril pastör pipeti	47
3.1.3.2.11 Steril tek kullanımlık pipet	47
3.1.3.2.12 Vorteks	47
3.1.3.2.13 Wellcollex <i>E. coli</i> O157:H7	47
3.1.4 Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Materyaller.....	47
3.1.4.1 Besiyerleri	47
3.1.4.1.1 Tris - Acetate- EDTA (TAE) Buffer	47
3.1.4.1.2 Agaroz Jel.....	47
3.1.4.2 Cihaz ve Gereçler	48
3.1.4.2.1 Biyogüvenlik kabini	48
3.1.4.2.2 Deiyonize ve Ultra Saf su Sistemi	48
3.1.4.2.3 DNA ladder (markır) ve DNA loading dye (yükleme tamponu)	48

3.1.4.2.4 Gradient Thermal Cyler PCR Cihazı	48
3.1.4.2.5 Horizontal Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı	49
3.1.4.2.6 Isıtıcı Bloklar	49
3.1.4.2.7 Jel Görüntüleme ve Dökümantasyon Sistemi	49
3.1.4.2.8 Laminar Flow Cabinet	49
3.1.4.2.9 Mikro Santrifüj	50
3.1.4.2.10 Mikrodalga Fırın	50
3.1.4.2.11 Otomatik Pipetler	50
3.1.4.2.12 Parafilm	50
3.1.4.2.13 PCR mikrotüpleri	50
3.1.4.2.14 PCR Karışımı	50
3.1.4.2.15 PCR Soğutucu Sistem, Buzlu Rack	51
3.1.4.2.16 Primerler	51
3.1.4.2.17 Spektrofotometre	52
3.2 Yöntem	52
3.2.1 Bakteriyolojik İnceleme	52
3.2.1.1 <i>E. coli</i> izolatlarının Tazelenmesi ve Saflaştırılması	52
3.2.2 <i>E. coli</i> O157:H7 saptanması	52
3.2.2.1 Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar'a ekim	52
3.2.2.2 Wellcollex <i>E. coli</i> O157:H7	52
3.2.3 Multipleks PCR	53
3.2.3.1 DNA İzolasyonu	53
3.2.3.2 DNA Konsantrasyonu ve Saflığı Ölçümü	53
3.2.3.3 PCR Parametreleri	53
3.2.3.3.1 Multipleks PCR protokolü	53

3.2.3.3.2 Agaroz Jel Hazırlanması ve Dökülmesi.....	55
3.2.3.3.3 Amplifikasyonu yapılan DNA'ların agaroz jele yüklenmesi.....	56
3.2.3.3.4 Amplifikasyonu yapılan DNA'ların Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi.....	56
3.2.3.3.5 Patotiplendirme	56
4 BULGULAR	57
4.1 <i>E. coli</i> O157:H7.....	57
4.1.1 Sefixsim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar Ekim sonuçları.	57
4.1.2 Wellcollex <i>E. coli</i> O157:H7 Sonuçları	58
4.2 Multipleks PCR Sonuçları	60
4.2.1 Sığırlardan elde edilen <i>E. coli</i> izolatlarının multipleks PCR sonuçları.....	62
4.2.2 Koyunlardan elde edilen <i>E. coli</i> izolatlarının multipleks PCR sonuçları.....	64
4.2.3 Keçilerden elde edilen <i>E. coli</i> izolatlarının multipleks PCR sonuçları	66
4.2.4 Köpeklerden elde edilen <i>E. coli</i> izolatlarının multipleks PCR sonuçları	67
4.2.5. Kedilerden elde edilen <i>E. coli</i> izolatlarının multipleks PCR sonuçları.....	68
4.2.6 Atlardan elde edilen <i>E. coli</i> izolatlarının multipleks PCR sonuçları.....	69
4.2.7 Virulens genleri dağılımı dikkate alınarak izolatların patotiplendirilme sonucu	69
5 TARTIŞMA ve SONUÇ	70
5.1 Tartışma.....	70
5.2 Sonuç.....	80
6 KAYNAKLAR.....	81
7 TABLOLAR LİSTESİ	101
8 ŞEKİLLER LİSTESİ	103
9 SİMGELER ve KISALTMALAR.....	104
10 EKLER	108
11 TEŞEKKÜR.....	109

12 ÖZGEÇMİŞ	110
13 İTHAF	111



ÖZET

Bu çalışmanın amacı, evcil hayvan orjinli *E. coli* izolatlarında PCR yöntemi ile *Stx1*, *Stx2*, *eae*, *STa*, *F41* ve *K99*'u kodlayan virulens genlerinin varlığını belirlemektir. Bu çalışmada 2010-2015 yılları arasında başta Bursa ili ve çevresi olmak üzere farklı bölgelerden, sığır, koyun, keçi, at, kedi ve köpeklere ait toplam 233 adet *E. coli* izolatu incelendi. Sonuç olarak, sığırlardan izole edilen 111 adet *E. coli* izolatu %5,4 oranında *Stx1*, *eae* ve *Stx2* genlerini, %0,9 oranında *Stx1* ve *eae* genlerini birarada ve %0,9 oranında da yalnızca *STa* ve *eae* genini taşıyordu. Toplam 25 adet koyun kökenli *E. coli* izolatu, %12 oranında *Stx1* ve *Stx2* genlerini birarada, %16 oranında *Stx1* genini ve %12 oranında *Stx2* ve %12 oranında *STa* genini taşıyordu. Keçi kökenli toplam 45 adet *E. coli* izolatu ise %4,4 oranında *Stx1* ve *Stx2* genlerini birarada, %22,2 oranında *Stx1*, %6,7 oranında ise *Stx2* genini taşıyordu. Toplam 35 adet köpek kökenli *E. coli* izolatu ise %11,4 oranında *eae* genini taşıyordu. İncelenen örneklerin hiçbirisi *F41* ve *K99* genlerini taşımamaktaydı. *E. coli* O157:H7 serotipinin varlığını araştırmak amacıyla süpheli izolatlar Rapid Latex Agglutination Wellcollex *E. coli* (Remel®) Testi ile araştırıldı ve izolatlarda *E. coli* O157:H7 serotipi saptanmadı. Sığır, koyun ve keçilerde diarejenik *E. coli* varlığının göstergesi olan virulens genlerinin oranları sırası ile; Shiga toksijenik *E. coli* (STEC) %6,3, %40 ve %33,3; Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) %0,9, %12 ve %0 olarak saptandı. At ve kedilerde ise diarejenik *E. coli* saptanmadı. Sığır ve köpeklerde Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) sırasıyla %0,9 ve %11,4 olarak saptanırken koyun, keçi, at ve kedilerde EPEC saptanmadı.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*; Multipleks PCR; Virulens genleri

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the presence of virulence genes encoding *Stx1*, *Stx2*, *eae*, *STa*, *F41* and *K99* with PCR protocol from domestic animal *E. coli* isolates. In this study, a total of 233 *E. coli* isolates recovered from cattle, sheep, goat, horse, cat and dog between 2010-2015 from Bursa and surrounding provinces. As a result, among 111 cattle isolates, 5.4% carried *Stx1*, *eae* and *Stx2* in combination, 0.9% carried *Stx1* and *eae*, 0.9% carried *STa*, and 0.9% carried *eae* gene. Out of 25 sheep isolates, 16% carried *Stx1*, 12% carried *Stx2*, 12% carried *Stx1* and *Stx2* and 12% carried *STa*. Out of 45 goat isolates, 22.2% carried *Stx1*, 6.7% carried *Stx2* and 4.4% carried *Stx1* and *Stx2* in combination. Out of 35 dog isolates, 11.4% carried *eae*. None of the tested samples were positive for *F41* or *K99* genes. To confirm the presence of *E. coli* O157:H7 serotype, suspected isolates were investigated by using rapid latex agglutination test Wellcollex *E. coli* (Remel®) and all isolates were negative. Virulence genes specific for diarrheagenic *E. coli* were detected in the following percentages of the cattle, sheep and goat: Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in 6.3%, 40% and 33.3%; enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) in 0.9%, 12% and 0% respectively. Diarrheagenic *E. coli* was not detected in horse and cat. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) was detected only in cattle and dogs 0.9%, 11.4% respectively, and not detected in sheep, goats, and cats.

Keywords: *Escherichia coli*; Multiplex PCR; Virulence genes

1 GİRİŞ

Escherichia coli (*E. coli*), doğada ve çoğunlukla insanların ve hayvanların kolon mikrofloralarında bulunan bir mikroorganizmadır. *E. coli* patojen türleri bazı virulens genleri taşırlar ve insanlar ile hayvanlarda gastroenteritis, üriner sistem infeksiyonları peritonitis, mastitis, uterus yangısı, meningitis ve pleuritis gibi ekstraintestinal doku ve organlara invaze olarak çeşitli infeksiyonlara neden olurlar (Gyles 2007 ve Suojala ve ark., 2013). İnsanlara patojen suşların bulaştırılmasında çoğunlukla sığır ve koyun gibi evcil hayvanlar, martı gibi yabani kanatlılar önemli rol oynamaktadır. Etken insanlara, çeşitli evcil ve yabani hayvanların dışkıları ile direkt temas veya kontamine gıdaların (iyi pişirilmemiş et ve pastörize edilmemiş süt ürünleri) tüketilmesi sonucu bulaşabilmektedir. Hastalıklı veya taşıyıcı hayvanlarla temas halindeki insanların zoonoz riski altında olmaları sebebiyle epidemiyolojik olarak hastalığa ait bölgesel risk haritasının belirlenmesi önemlidir (Boynukara ve ark., 2004 ve Witold ve Carolyn 2011). *E. coli* nedeniyle oluşan hastalık salgınları her sene binlerce kişiyi etkileyebilmekte, (CDC 2016; Kaper ve Karmali, 2008 ve WHO 2016) ve insanlarda gıda zehirlenmesinde enterit tablosu oluşturabildiği gibi bazen de ölüme sebep olabilmektedir (Hall ve ark., 2005). Uzun yıllardır çeşitli *E. coli* patotiplerinden kaynaklanan salgınlar yaşanmaktadır. Salgınlara neden olan başlıca *E. coli* patotipleri, STEC O26, O104, O121, O145 ve O157 olarak tanımlanmıştır (CDC 2017). Bunun yanı sıra, *E. coli* O157:H7 serotipi, zoonoz nitelik taşımaktadır, gıda kaynaklı patojenlerin en önemlilerinden biridir ve 200'den fazla alt tipi bulunan Sitotoksijenik *E. coli* (STEC) patotipindedir ve Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) serotipindedir (Dursun ve Kaya, 2010 ve Witold ve Carolyn, 2011). Etken insanlarda ve evcil hayvanlardaki Hemorajik Üremik Sendromu (HUS) vakalarının %70 ila %80'inden ve gastroenteritislerin %40 ila %50'sinden sorumludur. Hemorajik kolitlerden izole edilen sorbitolü fermente eden ve O157:H7 olmayan serovarlar ise, O26:H11/H, O91:H14/H21, O121:H19, O104:H4 olarak olarak tanımlanırlar (Bauerfeind ve ark., 2016).

Sığır, koyun ve keçiler başta olmak üzere evcil ve yabani ruminantlar, STEC suşlarının taşıyıcısı ve saçıcısıdır. Ruminantlardaki STEC suşları ile karışabilen zoonoz nitelikteki EHEC suşlarının diagnostik laboratuvarlarda ayrımının yapıp tanısının konulabilmesi büyük önem taşımaktadır. STEC'in, ruminantların %50'sinden fazlasında bulunduğu saptanmıştır, bunun yanı sıra domuz, at, köpek, kedi ile evcil ve vahşi kuşlarda da taşıyıcılık tanımlanmıştır. Bu hayvanların O157:NM ve Enteroagregative O104:H4 gibi serovarların rezervuarı olup olmadıkları henüz bilinmemektedir (Bauerfeind ve ark., 2016). Buzağı ishalleri veya neonatal septisemiden sorumlu *E. coli* suşları, Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) olarak adlandırılır ve özellikle K99 suşu yaşamın ilk birkaç haftasındaki buzağı ölümlerinden sorumludur (Foster ve Smith, 2009). Buzağı septisemisi, sığır yetiştirilicisinde büyük ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır, her ülke ve bölgede rastlamak mümkündür (Aydın ve Paracikoğlu, 2006). Türkiye'de ishalleri buzağılarda yapılan çalışmalarda *E. coli* oranları %10 ila 92 gibi geniş bir aralıkta bulunmuştur (Çabalar ve ark., 2001).

Koyun ve keçiler de STEC taşıyıcısı oldukları kadar, diğer patotipleri de taşıyabilmektedirler. Dünyada ve Türkiye'de yapılan çalışmalarda küçükbaş ruminantlarda EPEC prevalansının %7,7 ila %26,7 arasında değiştiği bildirilmektedir (Cortes ve ark., 2005; De La Fuente ve ark., 2002; Krause ve ark., 2005 ve Wani ve ark., 2006). Koyunlarda ETEC prevalansı ise %9 ila %18,5 arasında değiştiği bildirilmiştir (Bandyopadhyay ve ark., 2011; Manzoor ve ark., 2015 ve Turkyılmaz ve ark., 2013). Türkiye'de küçükbaş ruminantların önemli bir protein kaynağı olması sebebiyle, halk sağlığı ile ilişkili olabilecek zoonozların araştırılması büyük önem taşımaktadır.

Atlarda *E. coli* virulens genlerinin dağılımına ilişkin literatür bilgisi sınırlıdır. Liberatore ve ark. (2007)'nin atlarda *E. coli* virulens genlerinin varlığını araştırmış ve örneklerin hiçbirinde virulens genine rastlamamıştır. Bir başka çalışmada ise atlardan non-sorbitol fermente *E. coli* izole edilmiş, bunun yanında gastroenteritisli taylarda *Stx1*, *Stx2* ve *eae* genlerine rastlamışlardır (Holland ve ark., 1996). Hasta ve sağlıklı

ergin atlar ve taylarda virulens genlerinin varlığının değerlendirilmesi açısından epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır.

E. coli kedi ve köpek gibi pet hayvanlarından, sahiplerine veya onlarla yakın temaslarda bulunan insanlara fekal-oral, solunum yoluyla, ısırık ya da tırmalama veya vektörler yardımıyla zoonotik özellikteki bakterilerin iletimi söz konusudur. Etken, evcil petlerde intestinal hastalıklara ve septisemi, sistit, pyelonefrit, metrit, pyometra gibi ekstra intestinal infeksiyonlara neden olabilmektedir (Wasterlund ve ark., 1988). Birçok çalışma, insanlar, köpekler ve kediler arasında klonal olarak ilişkili fekal, Üropatojenik *E. coli* (UPEC) ve Sitotoksijenik *E. coli* (STEC) infeksiyonlarının bulaşabildiğini göstermektedir (Khakhria ve ark., 1990 ve Trevena ve ark., 1996). Evcil kedilerden ise insan kaynaklı Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) suşları bildirilmiştir (Johnson ve ark., 2001). Köpeklerde üriner sistem infeksiyonlarına neden olan *E. coli* suşları (HUS) ile insandaki ExPEC, genetik olarak benzerdir ve taşıdıkları virulens genleri aynı karaktere sahiptir. Çevrede bulunan fekal atıkların, insan dışkılarında bulunan ExPEC suşları ile yakın ilişkide bulunduğu gözlenmiştir. Doğrudan transferin kanıtı henüz belgelenmiş olmamasına rağmen bu veriler köpek dışkılarının insanlar tarafından birçok patotipin edinimi için önemli bir rezervuar olabileceğini göstermektedir. Jerse ve ark. (1990) köpek ve kedilerden *eae* geni izole etmişlerdir. Bu genin fenotipin Attaching/ Effacing (A/E) ile bağlantılı olduğu bildirilmektedir (Holland ve ark.,1999).

Hayvanlarda patojen olan ve zoonoz nitelik taşıyan *E. coli*'ler, virulens faktörlerini taşıyan genleri kodlarlar. Bu tez projesinin amacı, multipleks PCR yöntemi ile hayvansal kaynaklı *E. coli*'de virulensten sorumlu bazı genlerin varlığını tespit etmektir. Hayvanlardaki *E. coli* alt tipleri ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Tez çalışması ile sığır, koyun, keçi, at, köpek, kedi gibi farklı hayvanlardan elde edilen izolatların virulens ve toksin geni taşıyıcılıkları incelenmiştir. Seçilen virulens genlerini taşıyan *E. coli* izolatlarının patotiplendirilmesi neticesinde epidemiyolojik açıdan evcil hayvanlar arasında yaygınlığının saptanması hedeflenmiştir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 *Escherichia coli*

2.1.1 Tarihçesi

Escherichia coli (*E. coli*) ilk olarak Alman bakteriyolog Dr. Theodor Escherich tarafından 1885 yılında diyareli bir çocuğun dışkılarından izole edilmiştir. O dönemde *Bacterium coli commune* olarak isimlendirilen etkene, *Escherichia coli* adı 1919 yılında Escherich'in adına ithafen verilmiştir (Shulman ve ark., 2007).

2.1.2 Hastalığın Etiyolojisi

2.1.2.1 Taksonomisi

E. coli, Bacteria aleminin, Proteobacteria bölümü, Gamma proteobacteria sınıfı, Enterobacteriales takımı, Enterobacteriaceae ailesi, Escherichia cinsi içerisinde yer alır. Gram negatif, düzgün çomak tarzında, peritrik flagellaya sahip olması nedeniyle hareketli olan *E. coli*, fakültatif anaerob özelliktedir. Hareketsiz olan suşları da vardır. *E. coli*, nutrient agar ve kanlı agar gibi genel besiyerleri ve MacConkey (MC) agar, Eosine Methylen Blue (EMB) agar gibi selektif ve differansiyel besiyerlerinde 37°C'de 24 saat içerisinde gözle görülebilir büyükte, düzgün kenarlı, S-tipli koloniler meydana getirir (Scheutz ve Strockbine, 2001). Optimal üreme ısısı 37°C olmasına rağmen (20-40)°C'de, optimal pH'sı (7-7,2) olmasına rağmen pH (5-8)'de de üreyebilmektedir (Orskov 1984). Etken laktozu fermente etmesi sebebiyle MC agarda pembe renkli koloniler, EMB agarda metalik röfle görünümünde koloniler oluşturur. Patojen olan bazı suşlar kanlı agarda hemoliz oluşturma yeteneğindedir. Ekstra-intestinal *E. coli*'nin patogenezisinde hemolizinin eritrositleri parçalayarak etkenlerin demir ihtiyacını sağlamasında önemli bir virulens özelliği olduğu düşünülmektedir (Scheutz ve Strockbine, 2001). Buyyonda kısa bir süre içerisinde hafif bir bulanıklık oluşturarak ürer. *E. coli*, genellikle, bazı karbonhidratları (laktoz, mannitol, glukoz) asit ve gaz oluşturarak fermente eder. İndol ve Metil Red (MR) testleri pozitifdir. Üre, H₂S ve Voges Porskauer (VP) testlerinde genellikle negatif olan *E. coli*, sitrattan da yararlanmaz. *E. coli*'nin fiziksel ve kimyasal etkenlere

duyarlılık durumları diğer Gram negatif bakterilerine benzer (Jorgensen ve ark., 2015 ve Quinn ve ark., 2000).

2.1.2.2 Antijenik Yapısı

E. coli'nin antijenik yapısı oldukça komplike olup, özellikle patojen suşlarda bu yapılar önem taşımaktadır (Aydın ve ark., 2006).

2.1.2.2.1 Somatik “O” Antijenleri

Somatik “O” antijenleri lipopolisakkarit özelliğinde olup, ısıya dirençli yüzey antijenleridir, *E. coli*'nin sero gruplandırılmasında önem taşırlar ve aglütinasyon testi ile ortaya konulabilirler (Aydın ve ark., 2006). Bu yüzey antijenleri ile hazırlanan spesifik “O” antiserumları kullanılarak makroaglütinasyon ve mikroaglütinasyon testleri ile patojeniteleri ortaya konulur. Bugüne kadar 186 adet O antijeni (Guo ve ark., 2008) ve en az 53 adet serotipi belirlenmiştir (Gyles 2007).

2.1.2.2.2 Flagellar “H” Antijenleri

Flagellar “H” antijenlerini çalışmak için suşlar hareketi artıran koşullar altında üretilmelidir. “H” antijenleri *E. coli* izolatlarının antijenik identifikasyonlarında sık kullanılmazlar ve patojenite ile ilişkili değildirler ve 100°C’de ısı ile yıkımlanabilen proteinlerdir (Aydın ve ark., 2006).

2.1.2.2.3 Kapsüler “K” Antijenleri

Kapsüler “K” antijenleri, Polisakkarit (N-asetil neuraminik asit) özelliğinde olan bu antijenik yapı, kapsül taşıyan *E. coli* suşlarında O somatik antijeninin üzerinde bulunur. Kapsüler “K” antijenleri %2 oranında polimerik asitler içeren şekerlerdir ve bunlar virulensle ilişkilidirler. Bu antijenlerin çoğu uygun bir şekilde sulandırılan serum kullanılarak lam aglütinasyon ile belirlenebilir (Aydın ve ark., 2006).

2.1.3 Virulens faktörleri

2.1.3.1 Shiga toksinler

Shiga toksinler duyarlı ökaryotik hücrelerde protein sentezini inhibe eden yaklaşık 70 kDa'lık bir bakteri proteini grubudur (Melton-Celsa 2014). Shiga toksin 1 (*Stx1*), *Shigella dysenteriae* türü 1 tarafından üretilen *Stx* ile %98 homologken, Shiga toksin 2 (*Stx2*), *Stx1* ile yaklaşık %60 homologdur ve antijenik olarak farklıdır (Paton ve Paton, 1998 ve Nataro ve Kaper, 1998).

2.1.3.2 Intimin

Intimin, tüm EHEC suşları ve ilgili A/E patojenler tarafından üretilen 94 ila 97 kDa'lık bir dış membran adezyon ve *eae* geni tarafından kodlanmaktadır. İlk olarak EPEC O127:H6'de tespit edilmiştir (Stevens ve Frankel, 2013).

Tablo 1: Patojenik *E. coli* alt gruplarıyla ilişkili bazı özellikler ve semptomlar (Feng ve Monday, 2000)

Özellikler / Belirtiler	ETEC	EPEC	EHEC	EIEC
Toksin	LT/ST ^a	-	Shiga veya Vero toksin (<i>Stx</i> or VT)	-
İnvaziv	-	-	-	+
Intimin	-	+	+	-
Enterohemolysin	-	-	+	-
Dışkı	Sulu	Sulu, Kanlı	Sulu, Çok kanlı	Mukoid, Kanlı
Ateş	Düşük	+	-	+
Fekal lökosit	-	-	-	+
Barsak tutulumu	İnce	İnce	kolon	kolon, Alt İnce
Seroloji	Çeşitli	O26, O111 ve diğerleri	O157:H7, O26, O111 ve diğerleri	Çeşitli
Id^b	Yüksek	Yüksek	Düşük	Yüksek

^aLT, Isıya dayanıksız toksin; ST, Isıya dayanıklı toksin

^bId, İnfektif doz

2.1.3.3 Enterotoksinler

Enterotoksinler, 60°C'de 30dk da inaktive olan Isıya dayanıksız (LT) ve 100°C'ye 15 dk dirençli olan ısıya dayanıklı (ST) olmak üzere başlıca iki tip enterotoksin bildirilmiştir (Aydın ve ark., 2006).

2.1.3.4 Fimbrial (pilus) Antijenleri

Fimbrial "F" antijenleri hücrelere bağlanmada önemlidirler ve bakterilerin üreme ortamlarına bağlı olarak sentezlenirler (Aydın ve ark., 2006). Adhezyon fimbrialar, domuzlarda ve buzağılarda *K88* veya *K99*, *987P* veya *F41* veya *F107* ve *2134P* gibi yüzey antijenleri olarak ayırdedilebilir. Sırasıyla *F4*, *F5*, *F6*, *F41* veya *FlBab* ve *FlBac* olarak da adlandırılır. Bunların çeşitli moleküler ağırlıkları (15 ila 25 kDa) vardır (Rippinger ve ark., 1995) .

2.1.4 Genogrupları ve Serotipleri

1885 yılında keşfedilen kommensal *E. coli*, insan bağırsak mikrobiyotasının baskın fakültatif anaerobudur (Lai ve ark., 2013). *E. coli* hem insanlarda hem de hayvanlarda idrar yolu infeksiyonları (HUS), menenjit ve septisemi de dahil çeşitli infeksiyonlara neden olmaktadır (Jafari ve ark., 2012). *E. coli*, fekal floranın %1 gibi çok az bir kısmını oluştursa da insan kolonlarında predominant fakültatif anaerob olarak bulunmakta ve simbiyotik olarak yaşamaktadır (Callaway ve ark., 2009 ve Nataro ve Kaper, 1998). Etken, 1950 yılına kadar insan ve hayvanların bağırsak sisteminde normal florada bulunan ve patojen olmayan bir mikroorganizma olarak kabul edilmiştir (Münnich ve Lübke-Becker, 2004). Başlangıçta bağırsaklarda zararsız bir bakteri olarak görülen *E. coli*' nin transformasyona uğradığını ve bazı suşlarının artık insan ve hayvanlarda hastalığa neden olan patojenler olduğu bildirilmiştir (Nataro ve Kaper, 1998). Diarrahgenic *E. coli* (DEC), özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki çocuklarda, çeşitli gastrointestinal hastalıklara neden olan önemli bağırsak patojenidir (Koneman ve ark., 2006). *E. coli*, tüm idrar yolu infeksiyonlarının %50 ila %90'ından izole edilen önemli bir üriner patojendir (Claudia ve ark., 2009).

Diarrhagenic *E. coli* (DE), yaygın olarak Patojenik *E. coli* (PE) olarak bilinir ve patojenik olmayan *E. coli*'den, kromozom veya plasmidde kümeler halinde bulunan virulens faktörlerinin varlığı ile ayrılırlar. DNA içeriğindeki büyük değişime ve farklı virulens belirleyicilerinin genomik yer dağılımındaki (Insertion sekans) farka göre, patojen *E. coli*, genellikle Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC) Verotoksijenik *E. coli* (VTEC) olarak da adlandırılırlar; kanlı diyare ve hemorajik kolit neden olabilme yetenekleri nedeniyle Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) adı verilen serotipini içerirler, Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enteroinvasiv *E. coli* (EIEC), Enteroagregatif *E. coli* (EAEC) ve Diffüze yapışık *E. coli* (DAEC) olarak türlere ayrılırlar (Gyles ve Fairbrother, 2010; Kaper ve ark., 2004 ve Mainil ve Daube, 2005). Tablo (2)

Tablo 2: İnsanlarda diyarejenik *E. coli* suşlarının klasifikasyonu (Kuntz ve Kuntz, 1999)

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

* HC: Hemorajik Kolit

** HUS: Hemolitik Üremik Sendrom

*** TTP: Thrombotic Thrombocytopenic Purpura

2.1.4.1 Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC)

STEC iki ana grup Shiga toksin (*Stx*)'den oluşur. Shiga toksin (*Stx*) üreten suşlar klasik enteropatojendirler ve ishale neden olurlar (Melton-Celsa 2014). STEC suşlarının neden olduğu hastalıklar tüm dünyada bildirilmiştir (Beutin 2006). Bu suşlar insanlara dışkı ile kontamine gıda veya suların tüketimi, hayvanlarla doğrudan veya dolaylı temas ya da insanların birbirleriyle teması ile bulaşmaktadır (Willshaw

ve ark., 2001). STEC çok çeşitli serotipleri barındırır, özellikle gıda kaynaklı salgınlarda görülen klinik infeksiyonların büyük çoğunluğu, O157: H7, O157: H-, O26, O103, O111, O113 ve O145 serotipleri ve serogrupları ile ilişkilidir (Jorgensen ve ark., 2015).

2.1.4.1.1 Enterohemorajik *E. coli* (EHEC)

EHEC suşları, ilk olarak Kuzey Amerika'da ve Avrupa'da 1982 yılında, insanlarda, dizanteri benzeri bir hastalık olan Hemolitik Colitis (HC) olaylarının patlamasıyla ortaya çıkmıştır (Levine 1987). Etken, kolonun epitelyal hücrelerinde çoğalıp, orayı istila ederken burada A/E (Attaching/Effacing) etkisi yapar, buna ilaveten Shiga toksin (*Stx1* ve *Stx2*) üretir. Dizanteri benzeri hastalık, HC, HUS meydana getirir. Shiga toksin üreten EHEC suşlarının gastroenteritise neden olduğu rapor edilmiştir (Stevens ve Frankel, 2013). *E. coli* O157:H7 serotipi zoonotik ve gıda kaynaklı patojenlerin en önemlilerinden biridir (Dursun ve Kaya, 2010 ve Witold ve Carolyn, 2011). O157:H7 serotipine ait STEC suşları, en sık insan infeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (Karmali ve ark., 1989). İnsanlarda oldukça şiddetli tabloya yol açan EHEC'nin O157:H7 suşu özellikle son yıllarda adından sıklıkla bahsedilen gıda kaynaklı bir patojen olarak bilinmektedir (Erol 2007). EHEC, insanlarda şiddetli karın ağrısı ile beraber ishal, HC, HUS ve trombotik trombositopenik purpuraya (TTP) neden olabildiği için tüm dünyada önemli bir halk sağlığı problemi olarak ortaya çıkmaktadır (Dunn 2003 ve Fairbrother ve Nadeau, 2006). Zoonotik EHEC hem O157:H7 suşlarını hem de O157 olmayan suşları ihtiva etmektedir (Fairbrother ve Nadeau, 2006). *E. coli* O157:H7 serotipi diğer *E. coli*'lerden; 42°C ve üzerinde ürememesi, sorbitolü fermente edememesi, florojenik ürünün oluşumuna yol açan 4-methylumbelliferone glukuronide'i (MUG) hidrolize eden β-glikorunidaz enzimlerine sahip olmaması ve enterohemolizin üretme özelliği ile ayrılır (Dontorou ve ark., 2003).

2.1.4.2 Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)

Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) suşları, ilk olarak Neter tarafından 1959 yılında serotiplendirilmiştir (Levine 1987). EPEC suşları bağırsak hücrelerinde A/E

lezyonları oluşturma kabiliyetine sahip olan ve shiga benzeri toksin kodlayan genlere sahip olmayan diyarejenik *E. coli*'yi barındıran *eae* olarak tanımlanmaktadır (Moxley ve Smith, 2010; Shahrani ve ark., 2014). EPEC, sınırlı sayıda serogruplara (başlıca O14, O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128 ve O142) aittir (Kuhnert ve ark., 2000). Etkenin infantil farelerde ishale neden olduğu görülmüştür (Levine 1987). EPEC suşları, epitel hücrelerine A/E lezyonlarına sebep olan enterik patojenlerin tümünü kapsar (Jerse ve ark., 1990). Tutunma ve bozma [Attaching ve Effacing (AE)] terimi, *E. coli* tarafından üretilen bir bağırsak lezyonunu tanımlamak için ilk olarak Moon ve ark. (1983) tarafından kullanılmıştır. EPEC'in epitel hücrelerine yapışmasına intimin adı verilen bir dış membran proteini aracılık etmektedir. Bu geni kodlayan intimin (*eae*), ilk olarak Jerse ve ark. (1990) tarafından tanımlanmıştır. Ek olarak, intiminin in-vivo olarak da virulens faktörü olduğu gösterilmiştir (Donnenberg ve ark., 1993). EPEC diyaresinde tutunma ve bozma faktörü plazmidinin rolü belirgindir. EPEC suşları, ETEC ve EIEC'lerden farklı olarak invazyon yapmazlar. LT, ST toksin üretmezler (Levine 1987). EPEC, bakterinin intestinal hücrelere lokalize olmasını sağlayan ve EPEC yapışma faktörü [EPEC adherence factor (EAF)] diye de anılan plazmid kodlayan proteini içermektedir (Tobe ve ark., 1999). EAF üretimi Hep-2 hücre testi ve *eae* geni varlığı ise PCR testiyle belirlenebilir (Nataro ve Kaper, 1998).

2.1.4.3 Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)

Isıya dayanıksız (LT) ve/veya ısıya dayanıklı (ST) (Shaheen ve ark., 2003) enterotoksin varlığı ETEC patotipi olarak tanımlanmıştır (So ve ark., 1978). ETEC suşları moleküler tanı teknikleri ile tanımlanabilen ilk patojen mikroorganizmalar arasında yerini almıştır (Moseley ve ark., 1982). Dışkı ve çevresel örneklerde DNA problemlerinin, LT ve ST kodlayan genlerin tespitinde yararlı olduğu görülmüştür (Cantey ve Blake, 1977). Wolk ve ark. (1992) ETEC suşlarının O serogrubuna ait olduklarını, bunların predominant olarak K99 fimbrial antijene (F5) sahip olduğunu ve fimbrial antijenlerin sadece dışkıdan izole edilen *E. coli*'de bulduklarını, bu etkenlerin ishal ve septisemiye neden olduklarını belirtmişlerdir. Levine (1987) yılında yapmış olduğu bir araştırmada, adhere olabilen ETEC suşlarının fimbrialarının

6-7 nm çapında olduğu ve plazmidler tarafından kodlanıp, ST ve LT toksin üretimini indüklediği rapor etmiştir. Patojen türlerin özgülüğü ETEC fimbriasının türüne bağlı olarak oluşturulur. Örneğin ETEC suşlarından *K99* türü, dana, kuzu ve domuzlar için patojense de *K88* türü sadece domuzlarda hastalık yapabilir (Nataro ve Kaper, 1998). ETEC’de ishal olan taylardan izole edilen fimbria *K99*, *F41* ve *K88*’i içermektedir (Holland ve ark., 1996). *K99* pozitif ETEC yetişkin atlardan elde edilen bağırsak villuslarının sınır membranlarına yapışmazken, *K88* pozitif ETEC suşları yapışmaktadır (Tzipori ve ark., 1984). Diğer taraftan, buzağılarda adherans *K99* ve/veya *F41* fimbriası ETEC suşlarının ileuma invazyonunda daha etkilidir (Krogh 1983). Buzağılardaki ETEC suşları ısıya dayanıklı sitotoksin (*Stx*) üretirken, bu antijen bağırsak lümeni içine hiper düzeyde sıvı salgılanmasına neden olur (Butler ve Clarke, 1994).

2.1.4.4 Enteroaggregative *E. coli* (EaggEC)

Enteroaggregative *E. coli* (EaggEC) suşlarının ilk olarak Hindistan’da infantil ishal sebep oldukları Nandy ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (Levine 1987). Bu araştırmacılar EaggEC suşların, EPEC suşlarından farklı olduklarını ancak bazı serogrupların (O86, O11, O125, O127) EPEC ve EaggEC suşlarıyla ortak olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu suşların mannoz rezistant hemaglutinasyon aktivitesi gösterdiklerini, insan ve diğer türlerdeki eritrositleri aglutine ettiklerini rapor etmişlerdir. EaggEC suşlarının adherens özelliği plazmidler tarafından kodlanır (Nandy ve ark., 1994). EaggEC’lerin, HeLa ve Hep 2 hücre kültürlerine adhezyon özelliğine sahip olduğu rapor edilmiştir (Hart ve ark., 1987).

2.1.4.5 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) suşları ilk olarak 1971 yılında Du Pont ve arkadaşları tarafından keşfedilmişlerdir (Levine 1987). Bu suşlar kolonun epitelyal hücrelerinde invaze olup çoğalır, invazyon enterik hücrelerin ölümü ile sonuçlanır. Kolon mukozasının yıkımı sonucunda yangı görülür ve böylece basiller dizanteriye benzer semptomlar oluşur (Levine 1987). EIEC suşları, EPEC ve ETEC suşlarından farklı serotiptedirler. Bu suşlar, *Shigella* spp. ile benzerlik göstermektedirler. Bu

benzerlik özellikleri sebebiyle hücre kültürlerine invaze olur ve patojenik karakter kazanırlar. EIEC'nin patojenitesi kolonik dokuyu istila etme ve yok etme yeteneğine doğrudan bağlıdır. HeLa veya Hep-2 doku kültür hücreleri, PCR veya invaziv gen problemleri kullanılarak yüksek moleküler ağırlıklı plasmid ile kodlanmış invazyon fenotipi bulunabilmektedir (Nataro ve Kaper, 1998). EIEC, *Shigella* spp'yi yakından andırır ve insanlarda dizanteri formunda ishale yol açar (Moreno ve ark., 2010). İtalya'da EIEC O96: H19 kaynaklı salgının (Escher ve ark., 2014) yanında ABD'de EIEC'nin neden olduğu 3 farklı salgın rapor edilmiştir (Nataro ve Kaper, 1998).

2.1.4.6 Cytotoksik Nekrotizan Faktör (CNF)

CNF protein yapıda olup, CNF 1 ve CNF 2 olmak üzere ikiye ayrılırlar. CNF1 üreten suşlar ilk olarak enteritisli bebeklerde ve daha sonra ekstraintestinal infeksiyonlara sahip insanlarda saptanmıştır (Blanco ve ark., 1994). CNF2 üreten suşlar ishalleri hayvanlardan izole edilmiştir (Orden ve ark., 1999). Bu toksinler Vero ve HeLa hücre kültürlerinde multinükleasyon ve büyüme (uzama) vb gibi etkiler yaparlar. Tavşan dokularında nekroze neden olurlar (Blanco ve ark., 1990). İnsan, domuz ve sığırlarda; diyare, üriner doku infeksiyonları (UTI), septisemi, kuzu-buzağı septisemisi ve ishal neden olmaktadır (De Rycke ve ark., 1987). CNF1 ve CNF2 toksinleri, etken hücreyle birleşmiş haldeyken üretilirler. Bakteriyel kültürlerde, ekstraselüler sıvılarda bulunmazlar (Blomberg ve ark., 1993). CNF pozitif suşlar pnemoniye, metritise, mastitis ile koyunlarda aborta sebep olurlar (Pohl ve ark., 1993).

2.1.4.7 Ekstraintestinal patojen *E. coli* (ExPEC)

Ekstraintestinal patojen *E. coli* (ExPEC)'lerde özellikle K1 antijeninin saptanmasında birçok virulens faktörü belirlenmiştir (Kaper ve ark., 2004). ExPEC esas olarak Üropatojenik *E. coli* (UPEC) ve Neonatal Menenjit *E. coli* (NMEC) olarak sınıflandırılmıştır. UPEC, insanlarda üriner sistem infeksiyonlarının en sık nedenini oluşturmaktadır (Johnson 1991). *E. coli* ayrıca köpeklerde ve kedilerde idrar yolu infeksiyonlarına neden olur ve bu hayvanlardan alınan klinik izolatların insan kökenli UPEC ile bazı ortak özellikleri paylaştığı bildirilmiştir (Peeters 1994). NMEC ise,

yenidoğan bebeklerde menenjit ve sepsise neden olmaktadır (Nataro ve Levine, 1994).

2.1.4.8 Diffüz Adherent *E. coli* (DAEC)

Difüz Adherent *E. coli*, çocuklarda süreklilik gösteren diyarelere neden olur. Hücreye adhezyon yolu ile yapışmalarını takiben diffüze olurlar (Kaper ve ark., 2004).



Tablo 3: *E. coli* patotipleri ve tipik virulens faktörlerinin dağılımı (Kuhnert ve ark., 2000)

Virulens faktörü	ETEC	EPEC	STEC/EHEC	EIEC	EAEC	UPEC	NMEC
Toksinler	Shiga toxin1 (<i>stx1</i>)		++				
	Shiga toxin2 (<i>stx2</i>)		++				
	Heat-labile toxin I (<i>LTI</i>)	++					
	Heat-labile toxin II (<i>LTI</i>)	+ ^a					
	Heat-stable toxin I (<i>STa</i>)	++					
	Heat-stable toxin II (<i>STb</i>)	+ ^a					
	Low-MW Isıya dayanıklı toksin (EAST1)	+	+	++		+	
	α -Hemolysin (Hly)			++ ^b			++
	EHEC hemolysin (Ehx)			+ ^c			
	Cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1)						+
Adhesyonlar	P fimbriae					++	
	S fimbriae					++	+
	FIC fimbriae					++	
	Colonization factor antigen I (CFA/I)	+					
	Colonization factor antigen II (CFA/II;CS3)	++					
	Bundle-forming pilus (<i>Bfp</i>)		++				
	Aggregative adherence fimbriae I (AAF/I)					++	
	Intimin (<i>eae</i>)		++	++			
Envazyonlar	Envazyon plazmid antijeni (<i>Ipa</i>)			++			
Iron acquisition	Aerobactin			+		++	+
Kapsül	K1 Kapsül antijeni					+	++
	K5 Kapsül antijeni					+	

+ Bazen saptanan, ++ Normalde saptanan.

^a En çok hayvanlarda

^b Domuz izolatlarında. ^c Genelde EHEC alt-patotipinin suşları

2.1.5 Epizootiyolojisi

E. coli O157:H7'nin çeşitli ülkelerde ağır hastalık tabloları ve ölümlerle karakterize olaylara neden olduğu bildirilmiştir (Lim ve ark., 2010). Altı kıtadaki en az 30 ülkede, insanlarda *E. coli* O157:H7 infeksiyonu rapor edilmiştir (Doyle ve ark., 2006). Amerika Birleşik Devletlerin (ABD)'de 1992-1993 yıllarında oluşan ve yüzlerce insanın hastalanmasına ve 4 kişinin ölümüne neden olan *E. coli* O157:H7 salgınlarının sığır eti kıymasından hazırlanan iyi pişirilmemiş hamburger köftelerinden kaynaklandığı belirlenmiştir (Sofos 1999). Shiga toksijenik *E. coli* (STEC) O157:H'nin ABD'de yılda 73,000 hastalığa neden olduğu ve O157 olmayan STEC serotiplerin en az 37,000 hastalığa neden olduğu tespit edilmiştir (Mead ve ark., 1999). 2015-2016 yılları arasında, ABD'de STEC O26'nın neden olduğu iki farklı salgın incelenmiştir. İlk salgında 55 kişi 11 eyalette ikincisinde ise, 5 kişi 3 eyalette rapor edilmiştir (CDC 2016). Avrupa Birliği (AB)'nde 2005 yılında STEC insidansı 100,000 kişide 1,2 vaka olarak saptanmıştır (Norrung ve Buncic, 2008). Ayrıca, Avrupa'da, O157 olmayan STEC serotipleri, O157:H7 STEC'li infeksiyonlardan daha yaygındır (Blanco ve ark., 2004). 2011 yılında, hemorajik kolitin (HC) bilinen en büyük salgını Almanya'da gerçekleşmiş; 3,800 kişi salgından etkilenmiş, bunlardan 8'nde HUS gelişmiş ve 54'ü ise ölümlerle sonuçlanmıştır. Salgından sorumlu serotipin O104:H4 olduğu ve shiga toksin 2a taşıyan EAEC patotipi olduğu belirlenmiştir (Miko ve ark., 2013). Türkiye'de en sık görülen gıda zehirlenmeleri *E. coli*'nin neden olduğu zehirlenmelerdir (Erol 2007). Türkiye'de patojen *E. coli* infeksiyonlarının gerçek insidansı bilinmemektedir (Erdoğan ve ark., 2008). Bireysel vaka raporları literatürde bildirilmiştir (Eklund ve ark., 2001 ve Smith-Palmer ve ark., 2005) ki bazı araştırmacılar, *E. coli* O157:H7 insidansını insanlarda %0 ila %4 arasında değişen oranlarda belirtmişlerdir (Aydoğan ve ark., 2001; Hasçelik ve ark., 1991; Kaleli ve ark., 1999; Tolun ve ark., 2001 ve Yıldız ve ark., 2005).

STEC, evcil hayvanlarda hastalıklara genellikle neden olmamakla birlikte insanlarda sulu ishal, hemorajik kolit (HC) ve/veya hemolitik üremik sendroma (HUS) neden olmaktadır (Fairbrother ve Nadeau, 2006). Ruminantlar, vasküler *Stx*

reseptörlerinin bulunmaması nedeniyle *Stx*'lere duyarlı değildir (Pruimboom-Brees ve ark., 2000). Sığırlar, EHEC ve STEC türleri için ana rezervuar olarak kabul edilmektedir (Blanco ve ark., 2001 ve Chapman ve ark., 2001). Koyun ve keçi gibi diğer gıda tüketiminde kullanılan hayvanlar da bulaşmada önemli olabilirler (Battisti ve ark., 2006; Blanco ve ark., 2003 ve Chapman ve ark., 2001). STEC sığır, koyun, keçi, domuz, kedi, köpek, at ve hatta martı gibi çeşitli hayvanların dışkı florasında bulunabilir (Beutin ve ark., 1993; Beutin ve ark., 1995; Chapman ve ark., 1997; Chalmers ve ark., 1997 ve Makino ve ark., 2000). İnsan infeksiyonu bulaşması açısından en önemli hayvan türleri sığırlardır, ancak sığırlarda STEC O157:H7 prevalansı önemli ölçüde ülkeden ülkeye değişir. Sığırlarda yapılan bir araştırmada Finlandiya'da hayvanlarda %1,3 oranında STEC O157:H7 saptanmıştır (Lahti ve ark., 2001). Başka çalışmalarda bu oran Almanya'da %10,8 (Montenegro ve ark., 1990), ve İngiltere'de %15,7 (Chalmers ve ark., 1997) olarak bulunmuştur. STEC suşları genellikle sağlıklı hayvanlardan izole edilmiştir, ancak asemptomatik kolonizasyonun ardından genç hayvanlarda ishalin inisiyal epizod ile ilişkili olabileceği ve hayvanlardan STEC O157:H7 izolasyon oranlarının O157:H7 serotipleri olmayanlara oranla çok daha düşük olduğu saptanmıştır (Nataro ve Kaper, 1998). Thomas ve ark. (2009) İrlanda'da sığır deri, dışkı ve karkas numunelerinde en çok bulunan izolatanın STEC O157 (*eae* bulunan) olduğunu belirtmiştir. Öte yandan, Kinga ve ark. (2009) Polonya'da kesilen 140 adet sığırın deri ve karkaslarından sırasıyla 6 ve 5 adet STEC suşu izole edildiğini, biri hariç tüm deri izolatlarında *eae* geni bulunduğunu, karkas izolatlarından sadece ikisinde bu virulens belirleyicisi genin tespit edildiğini, deri izolatlarının dördü ile karkas izolatlarının ikisinde enterohemolizin geni bulunduğunu, izolatların çoğunda *Stx2c* ile beraber *Stx2* geni bulunurken hiçbir STEC suşunda *Stx1* belirleyicisi tespit edilemediğini rapor etmişlerdir. Şili'de sığırlardan STEC genetik karakterizasyonu çalışmasında Borie ve ark. (1997) hayvanların %34,5'inin STEC taşıdığını ve *Stx1* geni taşıyan hayvanların oranının %60,4 olduğunu tespit etmişlerdir. İran'da yapılan bir çalışmada, 49 adet dışkı örneğinden, 15 adedinin STEC (%31) ve 13 adedinin EPEC (%27) olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca STEC izolatları arasında 2 adet *Stx1*, 8 adet *Stx2*, 3 adet *Stx1*, *Stx2* ve 2 adet *Stx1*, *Stx2*, *eae* olduğu saptanmıştır (Abbasi ve ark., 2014). Kagambega ve ark. (2012) Burkina Faso'da yaptıkları bir

çalışmada, diarragenic *E. coli* (DEC) varlığını gösteren virulens genlerinin oranını sığır dışkı örneklerinde %48 olarak tespit etmiştir. Aynı çalışmada STEC %37, EPEC %8 ve ETEC %4 olarak tespit edilmiştir. Sığırlarda STEC varlığı ile ilgili ülkeler bazında bazı epidemiyolojik raporlar yayınlanmıştır, buna göre hayvanlarda STEC yönünden pozitiflik oranları Japonya'da %19,4 (Nakazawa ve Kai, 1994), Avustralya'da %16,7 (Cobbold ve Desmarchelier, 2000) olarak raporlanmıştır.

Koyunlarda STEC infeksiyonlarının epidemiyolojisi üzerine önemli araştırmalar yapılmıştır; ancak keçiler ile ilgili epidemiyolojik çalışma sınırlı sayıdadır (La Ragione ve ark., 2009). Sağlıklı ruminantlarda 1996 ve 1998 yılları arasında yapılan bazı çalışmalarda STEC yaygınlığı mPCR tekniği ile incelenmiş, STEC varlığı saptanan *E. coli* izolatlarının adedi sığırlarda 131 (%18,0) koyunlarda 9 (%32,1) ve keçilerde 70 (%75,3) olarak saptanmıştır (Zschock ve ark., 2000). Bangladeş'te, kesime giden küçük ruminantların yaklaşık %10'u STEC O157 pozitifdir (Islam ve ark., 2008). Güney Almanya'daki küçük şehir çiftliklerinde zoonotik ajanların yaygınlığını araştıran bir çalışmada, test edilen koyunların %100'ü ve keçilerin %89,3'ü STEC için pozitif bulunmuştur (Schilling ve ark., 2012). Berlin'de sağlıklı hayvanların taranması, test edilen koyunların %66,6'sı ve keçilerin %56,1'i STEC taşıyıcıları olarak saptanmıştır (Beutin ve ark., 1993). Benzer bir sonuç olarak, İspanya'da sağlıklı keçilerin %47'si STEC için pozitif olarak tanımlanmıştır (Cortes ve ark., 2005). İspanya'da STEC O157 sürü prevelansının %8,7; bireysel prevelansın %7,8 olduğu bildirilmiştir (Oporto ve ark., 2008). İskoçya'da benzer şekilde düşük STEC O157 prevelansı (%5,8) bildirilmiştir (Solecki ve ark., 2009). İngiltere'de ve Hollanda'da düşük STEC O157 prevelansları bildirilmiş olup prevelans sırasıyla %0,1 ve %4,0 olarak saptanmıştır (Heuvelink ve ark., 1998 ve Milnes ve ark., 2008).

Brezilya'da koyunlarda yapılan bir çalışmada mezbaha ve çiftliklerden örnekler toplanmış ve incelenmiştir. Mezbaha örneklerinden 8 adet STEC ve 5 adet (EPEC) tanımlanmıştır. Diğer taraftan, çiftliklerden alınan 202 numune incelenmiş ve 44 adedinin STEC ve 8 adedinin EPEC izolatları olduğu belirlenmiştir (Maluta ve ark., 2014). Japonya'da Miyagi bölgesinde yapılan bir çalışmada STEC'in dışkıyla

saçılımı PCR ile incelenmiştir. Sonuç olarak *Stx1*, *Stx2* ve *Stx1+ Stx2*; %3,4 (4/116), %8,6 (10/116) ve %0,9 (1/116), genlerin varlığı sırasıyla belirtilen oranlarda tespit edilmiştir (Otawa ve ark., 2004). Yapılan bir çalışmada koyunlardan elde edilen *E. coli* izolatlarından %78,3'ü STEC olarak karakterize edilmiş, bunlardan %52,2'sinde *Stx1* geni, %33,3'ünde *Stx2* geni ve %14,5'inde her iki genin bulunduğu belirtilmiştir (Ferreira ve ark., 2015). Koyunlar Avustralya'da *E. coli*'nin saçılımında önemli bir konakçı olarak tanımlanmışlardır (Gyles 2007) ve ayrıca Norveç'te STEC O26'nın önemli bir rezervuarı olarak kabul edilmiştir (Brandal ve ark., 2012). STEC serolojik grupları O157 ve O26'ya ek olarak koyunlar, STEC'in 100'ün üzerindeki serotipleri için O115, O128 ve O130 da dahil olmak üzere 'rezervuar' olarak gösterilmektedir (Brandal ve ark., 2012 ve La Ragione ve ark., 2009). Vietnam'da keçi çiftliklerinin %100'ünde hayvanların STEC saçtığı bildirilmiştir ve sürüdeki saçılımın başka yerlerde bildirilenlerden önemli derecede daha yüksek olduğu saptanmıştır (%65) (Vu-Khac ve Cornick, 2008). Yine başka bir çalışmada, keçilerden elde edilen *E. coli* izolatlarının 26'sının (%48) *Stx1* geni için pozitif olduğu, 19'unun ise (%35) *eae* genine sahip olduğu saptanmıştır (Njoroge ve ark., 2013).

Küçük ruminantlarda STEC saçılımı yaş ve mevsime bağlı olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Daha küçük yaştaki hayvanlarda STEC'in prevalansı yaşlı hayvanlara göre daha düşüktür (Battisti ve ark., 2006 ve Cortes ve ark., 2005). ABD'de 6 ay boyunca yapılan bir çalışmada, yaz aylarında STEC prevalansının zirveye ulaştığını gösterilmiştir (Kudva ve ark., 1996). Ayrıca, İtalya'da yılın daha sıcak aylarında incelenen hayvanlarda STEC O157'nin daha yüksek prevalansının bulunduğu da gözlenmiştir (Franco ve ark., 2009).

Ruminantlarda patojen *E. coli*'ler Türkiye'de ise farklı bir dağılım izlemektedir. Türkiye'de evcil hayvanlardaki *E.coli* infeksiyonlarının virulens özellikleri yönünden yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bir çalışmada, *E. coli* virulens genlerinin varlığının tespiti amacıyla buzağılardan 120 adet izolat incelenmiş, 16 adedinin *eae* taşıdığı, 8 adedinin *Stx1* ve 5 adedinin de *Stx2* genlerinden yalnız birini veya birkaçını, taşıdığını saptamışlardır. Çalışmada *eae* veya *Stx* pozitif suşlardan

hiçbirinin O157:H7 olmadığı belirlenmiştir (Güler ve ark., 2008). Afyonkarahisar’da yapılan başka bir çalışmada ise inek ve buzağılardan alınan dışkı örneklerinden %3,1’inden *E. coli* O157:H7 serotipi izole edilmiştir. İzole edilen suşların %2,3’ü ineklerden, %2,6’sı sağlıklı buzağılardan, %10,6’sı ise ishalleri buzağılardan elde edilmiştir. STEC O157:H7 suşlarından elde edilen 14 adet DNA örneğinin 6 (%42,8)’sında *Stx1* ve *Stx2* geni pozitif bulunmuştur. Bu çalışma, inek ve buzağılardan izole edilen STEC O157:H7 serotipinin zoonotik önemi açısından bir risk faktörü olabileceğini göstermektedir (Kuyucuoğlu ve ark., 2011). Kars ve çevresinde yapılan bir çalışmada Aydın ve ark. (2001) neonatal ishalleri buzağılar araştırılmış, *E. coli* izolasyonu %92,1 oranında bulmuşlardır. Ancak ishal olgularında *E. coli* serotiplerinin ve özellikle O157 serotipinin varlığı ve oranları belirlenmemiştir. Aslantaş ve ark. (2006) Hatay ilinde klinik olarak sağlıklı sığırdan alınan numunelerin %13,6’sından *E. coli* O157 izole edildiğini bildirmiştir. *E. coli* O157 izole edilen numunelerin %85,7’sinde O157:H7 serotipi ve kalan %14,3’ünde ise O157:NM serotipi bulunmuştur. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi sonucunda %80,5 numunede *Stx2* geni saptanırken %3,9 numunede de hem *Stx1* hem de *Stx2* genleri tespit edilmiştir. Bu çalışmalara göre, Türkiye’deki sığırlar *E. coli* O157 için önemli rezervuarlardır ve potansiyel olarak ciddi insan hastalıklarına neden olabilirler (Aslantaş ve ark., 2006; Kuyucuoğlu ve ark., 2011). Güler ve ark. (2008) tarafından yapılan bir çalışmaya göre, hastalıklı buzağılardan %16’sı ETEC olarak tespit edilmiştir. ETEC suşlarının tümü, kombinasyon halinde *K99*, *F41* ve *STa* ETEC virulens faktörlerine sahiptir. Hastalıklı buzağılardan izole edilen 75 *E. coli*’nin 5’inde *eae* ve 2 adet *Stx2* geni bulunmaktaydı. Klinik olarak sağlıklı buzağuların dışkılarından 45 *E. coli* izolatu arasında birinde *K99+F41*, 11 *eae*, 8 *Stx1* ve 3 *Stx2* geni bulunmaktaydı. *STa* geni ise sağlıklı buzağılardan elde edilen *E. coli* izolatların hiçbirinde tespit edilmemiştir. Tüm intimin ve Shiga toksinlerinin pozitif izolatları, lateks aglütinasyon testi ile O157 için negatif olarak saptanmıştır.

Atlarda STEC taşıyıcılığının epidemiyolojisi üzerine yayınlanmış veriler sınırlıdır. Bazı araştırmacılar, atların STEC’in önemli bir rezervuarları olmadığını ve diğer hayvanlar için rezervuar olabileceğini belirtmektedir (Hancock ve ark., 1998; Lengacher ve ark., 2010 ve Pichner ve ark., 2005). Almanya’da taranan 400 at fekal

numunesinden sadece bir adedi STEC için pozitif ve izole edilen serotip O113:H21 olarak tanımlandı (Pichner ve ark., 2005). Benzer şekilde ABD'deki at popülasyonunda da düşük STEC prevalansı tespit edilmiştir. Ohio'daki 242 fekal at numunesinden sadece bir adedi STEC O157: H7 pozitif (Lengacher ve ark., 2010). Hancock ve ark. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada atların %1'inde (n = 90) O157: H7 için pozitiflik bildirilmiştir.

Pet hayvanlarında *E. coli* prevalansı seyrek olarak bildirilmiştir. İran'da Zahraei Salehi ve ark. (2011) görünüşte sağlıklı 100 köpek arasında %10 fekal patojen *E. coli* prevalansı bildirirken, Koochakzadeh ve ark. (2014) tek tırnaklılardan ve köpeklerden elde edilen 79 adet fekal *E. coli* izolatı arasında %36,6 patojen *E. coli* prevalansı olduğunu bildirmiştir. Bentacour ve ark. (2007) Arjantin'de 450 köpek arasında %15,5 fekal patojen *E. coli* prevalansı olduğunu bildirmişlerdir. Mısır'da ishal görülen 51 köpek arasında %66,6 patojen *E. coli* prevalansı olduğu raporlanmıştır (Younis ve ark., 2015). Türkiye'de pet hayvanlarındaki *E. coli* infeksiyonlarının virulens özellikleri yönünden yapılan çalışmalar sınırlıdır. Özkök (2001) tarafından yapılan bir çalışmaya göre, ishali 187 köpekten 102'si (%54.5) *E. coli* yönünden pozitif bulundu ve toplam 198 suş izole edildi, 61 adet suşun sitotoksik nekrotizan faktör (CNF) toksini sentezlediği saptandı.

2.1.6 Klinik Belirtiler

Kolibasillozisler klinik olarak dehidrasyon ve ishal ile karakterizedir. Ancak akut form gösteren ve ETEC suşlardan ileri gelen enterotoksemik kolibasillozis'de, yeni doğmuş buzağılar 2-6 saat içinde komaya girerek ölürlür. Septisemik form da bazen akut seyredebilir. Ancak sistemik bozuklukların yanısıra, çoğu olgularda, eklem şişlikleri ve topallık görülmektedir. Subakut kolibasillozis ise genellikle doğumdan sonraki ilk üç hafta içinde görülmektedir. Fena kokulu sık aralıklarla dışkılama ve dehidrasyon göze çarpar. Beden ısısı yüksektir. Halsizlik, iştahsızlık, bazı durumlarda topallık ve bazen de meningitise bağlı inkoordinasyon durumları görülür (Aydın ve Paracikoğlu, 2006).

EHEC, vakaların en fazla %10 kadarında HUS veya TTP gibi akut böbrek yetmezliği, merkezi sinir sistemi bozuklukları ve kan pıhtılaşma rahatsızlıklarına neden olmaktadır. Bu komplikasyonlar daha çok çocuklarda ve çok yaşlılarda gözlenmekte ve yüksek bir oranda ölüme neden olmaktadır (Burgess ve ark., 2009).

Gelişmekte olan ülkelerde çocuk ishallerinin ana nedenlerinden biri olan EPEC aşırı sulu ishal neden olmaktadır. EPEC salgınları kontamine su ve et ürünlerinin tüketimi ile şekillenir (Hicks ve ark., 1998). EPEC köpekler, kediler, kuzular, oğlak ve buzağular gibi genç hayvanlarda ishale neden olmaktadır (Beutin 1999; Goffaux ve ark., 2000 ve Nakazato ve ark., 2004). Holland ve ark. (1996), ishali tayların dışkılarından *E. coli* suşlarının *Stx1* ve *Stx2* genlerini (STEC/EHEC patotipleri ile ilişkili) ve *eae* (EPEC ve STEC/EHEC ile ilişkili)'yi barındırdığını göstermiştir (Holland ve ark., 1996). Brezilya'da köpek ve kedilerde en yaygın patotip EPEC (*eae+*)'dir (Puno-Sarmiento ve ark., 2013).

EPEC suşları yetişkinlerde ve çocuklarda, özellikle sıcak iklimlerde ve Turist ishali (Traveler's diarrhea) hastalığı için muhtemel bir neden olarak tespit edilmiştir. EPEC suşları, daha çok az gelişmiş ülkelerde infantil ishal neden olmaktadır. EPEC enfeksiyonları insanlarda su ve gıda kontaminasyonu sonucu oluşur, *Vibrio cholera* benzeri hastalık oluştururlar (Qadri ve ark., 2005).

2.1.7 Patogenezi

Shiga toksin, STEC patojenezinde önemli bir faktördür (Arthur ve ark., 2002 ve Acheson 2000). Bu güçlü sitotoksin sadece hücrelerde protein sentezini inhibe etmekle kalmaz, aynı zamanda programlanmış hücre ölümünün (apoptozis) litik özelliklerini de indükler (Kaper ve ark., 2004). Her iki toksin de HeLa ve Vero doku kültürü hücrelerinde sitotoksik etki göstermektedirler ve bu yüzden Verotoksigenik *E. coli* (VTEC); verotoksin 1 (VT1) ve verotoksin 2 (VT2) olarak isimlendirilmişlerdir (Kim ve ark., 2005). STEC izolatları, Enterocyte Effacement Lokusu (LEE) patojenite adası içeren ve içermeyen gruplara ayrılabilir (Kaper ve ark., 2004). Tip III sekresyon sistemi LEE tarafından kodlanır ve, konak hücreye virulens faktörlerini entegre eder; bu durum Tutunma ve bozma [Attaching ve Effacing (AE)] lezyonları oluşumu ile

sonuçlanır (Mc Daniel ve ark., 1995). Attaching (Tutunma) bakterilerin enterosite yakın bir şekilde bağlanıp bağlanmadığını; Effacement (Bozma) ise, mikrovillusların fırçası kenarlarındaki lokalize göçünü tarif etmektedir. İnfekte konakçıda hemorajik kolit (HC) sık görüldüğü için, LEE pozitif STEC'ler infekte olmuş sahiplerinde kanamalı kolitin sık ortaya çıkması nedeniyle genellikle Enterohemorajik *E.coli* (EHEC) olarak adlandırılırlar.

E. coli O157:H7'nin patojenitesinde etkili virulens faktörleri; Shiga toksin *Stx1* ve *Stx2*, intimin ve plasmid kaplı enterohemolizindir. Shigatoksinler HC ve HUS'un patogenezinde başlıca etkili faktördür (Garcia-Sanchez ve ark., 2007). *E. coli* O157:H7'nin Shigatoksini insan kolon ve duodenumu için sitotoksiktir. Toksin bağırsakta sıvı birikimine ve kript epitellerinin yıkımı ile kolonik lezyonlara sebep olur. İntimin intestinal kanala tutunmayı kolaylaştırmaktadır (Robinson ve ark., 2006). Toksin üretimine ek olarak virulensle ilgili bir diğer faktör de intimin (*eae*) adı verilen proteindir. Bu protein, STEC O157:H7'nin bağırsak epitel hücrelerine bağlanmasından sorumludur ve intestinal mukozada A/E lezyonlarına neden olmaktadır (Dean-Nystrom ve ark., 1997). İntimin (*eae*) kromozomal geni tarafından kodlanmaktadır ve *eae* geni taşıyan *E. coli* O157:H7 serotipleri özellikle HC ve HUS'ta şiddetli ishal ile yakın olarak ilişkilendirilmektedir (Beutin ve ark., 1995). Tüm shigatoksin ve intimin dışında *E. coli* O157:H7 enterohemolizin (*Ehly*) adı verilen bir virulens faktörüne daha sahiptir. *EhxA* geni tarafından kodlanan enterohemolizin, aynı zamanda enterohemorajik *E. coli* hemolizini olarak da adlandırılmaktadır. Bununla birlikte birçok *E. coli* O157 suşu bu geni taşımaktadır. *Ehly*, *Stx* ile sinerjik etki yaptığı, demir kazanımı ve bakteri çoğalmasını sağlayan eritrositleri lize ettiği düşünülmektedir (Dunn 2003). *E. coli* O157'nin patojenitesi *Stx1* ve *Stx2* ve intimin (*eaeA*) dahil olmak üzere bir dizi virulens faktörleri ile ilişkilidir (Lim ve ark., 2010).

EPEC suşları, yüzeylerindeki fimbrial antijenler sayesinde ince barsak epitelindeki mikrovillilerde (brush- border membranlarda), A/E lezyonlarına neden olurlar fimbriaları sayesinde mukoza yüzeyindeki mukoza bağlanır ve enterositlere adhezyondan sonra mikrovilliler arasına penetre olup, hücre duvarının yırtılması

sonucunda actin polimerizasyonunu oluşturarak hücrel bir lezyon oluşturmaktadırlar (Mainil 1993). Intraselüler Ca^{++} seviyesinde artışa neden olup, dolayısıyla hücrelerin bozulması ve mukoza epitelinin kaybolmasıyla etki oluşur, bunun sonucunda da ishal meydana gelir. Adhezyon, villusların apikal yarımında gerçekleşmektedir (Hart ve ark., 1987).

ETEC suşları yüzeylerindeki fimbrial antijenler sayesinde ince bağırsakların, villus epitelinin, mukozanın epikal yüzeyine kolonize olur ve daha sonra toksin oluştururlar (Levine 1987). Bu etkenler villusların enterositozuna, su absorpsiyonuna ve elektrolit sekresyonuna neden olurlar (Mainil 1993). *K99* antijeni, hemaglutine edici özelliklere sahiptir ve bakterinin bağırsak mukozasına yapışması sağlar (Moon ve ark., 1977 ve De Graaf ve ark., 1981). ETEC suşlarının çoğu adhezyonlara sahiptir, bu yüzey proteinlerine (fimbria) denir ve *F4(K88)*, *F5(K99)*, *F6(987P)*, *F17*, *F18*, *F41*, *F42* ve *F165* alt türlerini kapsarlar (Dubreuil ve ark., 2016).

2.1.8 Patotiplendirilmesi

E. coli'nin patojenitesi ilk kez 1889 yılında Laurelle tarafından saptanmıştır (Laurelle 1889). *E. coli*'lerin patojenite özelliklerinin tespit edilmesi için bugüne kadar birçok test metodu geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Bu amaçla hücre kültürü ve deney hayvan testleri yaygın olarak kullanılmış ve bu konuda çok sayıda araştırma yapılmıştır. *E. coli*'nin patojenite özelliklerinin araştırılmasında kullanılan hücre kültürü ve deney hayvan testleri zaman alıcı, yorucu ve pahalı testlerdir. Bu testler bir laboratuvarında çok sayıda numunenin incelemesi amacıyla kullanılamaz. Ayrıca, hayvan deneyleri, etik unsurlar ve mevzuatlar nedeniyle nadiren uygulanan yöntemlerdir. Buna ek olarak, bir çok *E. coli* patojeni, tek bir adet konakçı türüne adapte olmuştur ve diğer konaklarda hastalığa neden olmaz, böylece etken hayvan modellerini çalışmak için uygun değildir (Kuhnert ve ark., 2000). Bu nedenle günümüzde in vitro modern testler yapılmakta ve *E. coli*'nin patojenite özellikleri daha kısa zamanda ve daha doğru bir şekilde belirlenebilmektedir. Fakat bu testlerin yapılabilmesi için de ekipman ve teknik eleman problemlerinin halledilmesi gerekmektedir. Bu testlerin başlıcaları şunlardır: poliklonal ELISA, monoklonal

ELISA, Nükleik asit hibridizasyon metodları ve colony immunoblotting metotlarıdır (Hofstra ve Huisin'r Veld, 1988).

E. coli suşları için en sık kullanılan fenotipik alt tiplendirme yöntemleri serotiplendirme, biyotiplendirme, faj tipilendirme ve multiloküs enzim elektroforezidir (Nielsen ve ark., 2000). Serotiplendirme, *E. coli*'nin tiplendirmesi için en popüler fenotip temelli alt tiplendirme yöntemidir (Foley ve ark., 2006).

Enterobacteriaceae familyasının genel özelliklerinde olduğu gibi, *E. coli*'ler birçok serotip içerirler. *E. coli* suşları arasındaki serolojik ilişkiler ilk kez 1921 yılında Dodgeon tarafından belirtilmiş, daha sonra Lowel *E. coli*'nin kapsül ve somatik olmak üzere iki çeşit antijeni olduğunu ileri sürmüş, 1943 yılında ise Kauffmann flagellar antijen olduğunu da göstermiştir. 1944'te Kauffmann, *E. coli*'lerin serolojik klasifikasyonu için günümüzde de modifiye edilerek kullanılmakta olan bir şema oluşturmuştur (Orskov 1984). Serotiplendirme esas olarak lipopolisakarit O antijenleri, flagellar H antijenleri ve kapsüller K antijenlerinin belirlenmesine dayanır (Bettelheim 1992). Dolayısıyla, serotip ve patotip arasındaki bu mevcut ilişki, yöntemi, *E. coli* ve diğer bakteri türlerini tiplendirmek için değerli bir metod haline getirir (Day ve ark., 1983 ve Johnson ve ark., 1983). Serotiplendirme, *E. coli*'nin klinik izolatlarının tanımlanması için kullanılan yaygın bir yöntemdir ve epidemiyolojide ve tıbbi teşhiste geniş bir kullanım alanına sahiptir (Orskov ve Orskov, 1984). *E. coli*'nin 170'den fazla serogrubu vardır. Her serogrubun içerisinde, bir ya da daha fazla serotip vardır. Bakteri yüzeyindeki moleküllere göre verilen numaralar spesifik *E. coli* serogrubu ve/veya serotipini işaret eder (Peacock ve ark., 2001). *E. coli*'nin hayvan türlerine göre değişik serotiplere sahip olduğu ve bu serotiplerin de farklı patojenik karakterler sergilediği bilinmektedir (Blanco ve ark., 1997).

E. coli patojenitesi kompleks multifaktöriyel bir mekanizma olup çoklu virulens faktörlerini kapsamaları ile patotipleri belirlenir. Virulens faktörleri olarak; attaching fonksiyon, konakçı hücre yüzeyi modifiye eden faktörler, invazyonlar ve çok farklı toksinler bulunmasının yanısıra toksinler ve virulens faktörleri eksternal sekresyon sistemleri ve hedef konakçı hücreleri tarafından yürütülür (Boerlin ve ark.,

1999 ve Casadevall ve Pirofski, 1999). Patojen *E. coli*'de bulunan ekstra genlerin çoğu ile çeşitli virulens faktörleri kodlanarak direkt *E. coli*'nin virulensi ve patotipi belirlenir (Kaper ve Obrien, 1998). Günümüzde kullanılan tanı yöntemleri ya spesifik toksinleri veya hedef genlerin saptanması esasına dayanır ve patotiplendirme bunun neticesinde yapılır (Kaper ve Obrien, 1998). *E. coli* patojenitesi, Shiga toksin1(*Stx1* geni tarafından kodlanmış), Shiga toksin2 (*Stx2* geni tarafından kodlanmış), intimin (*eaeA* geni tarafından kodlanmış), bundle forming pilus (*bfp* gen tarafından kodlanmış) ve enterohaemolysin (*Ehly* geni tarafından kodlanmış) dahil olmak üzere, bir dizi virulens özellikleri ile ilişkilidir (Beutin ve ark., 1995 ve Kang ve ark., 2004). Toksinler hemen hemen tüm patojenik *E. coli*'de bulunan en belirgin virulens faktörleridir. Ayrıca bazı toksinler spesifik patotipler ile kuvvetli bir ilişki sergilemektedir (Melton-Celsa ve Obrien, 1998).

E. coli virulensinde genetik kodlar hakkında geniş bilgi ağı olması nedeniyle, *E. coli*'nin saptanması ve tiplendirilmesinde genetik yöntemler giderek daha sık uygulanmaktadır. Bu yöntemler, yüksek rezolüsyon gösterirken, otomasyona da uygundur (Machado ve ark., 1998). Birçok genetik yöntem, spesifik (patojenezite) belirteçlerin saptanmasına dayanır, bazıları ribotipleme gibi epidemiyolojik işaretleyicileri kullanır (Machado ve ark., 1998). Daha spesifik olarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), *E. coli*'nin ekim yapılmadan önce numunedeki virulens genlerinin hızlı ve direkt tespit edilmesine olarak tanır (Kuhnert ve ark., 2000). Multiplex PCR testleri, birden fazla *E. coli* patotiplerini aynı anda tespit edebilmektedir (Nguyen ve ark., 2005). PCR tekniğinin gelişmiş hali, kalitatif ve kantitatif özellikteki Real-Time PCR'dır (Heid ve ark., 1996). DNA sekanslama, *E. coli*'nin kesin identifikasyonu için kullanılmaktadır (Kuhnert ve ark., 2000).

Multilokus sekans tiplendirme (MLST) bakterileri, yedi adet housekeeping genin 450-bp'lik iç fragmanlarının sekansları temelinde karakterize eden oldukça ayrımcı bir yöntemdir (Maiden ve ark., 1998). Her bir gen fragmanı için, farklı sekansları belirgin aleller olarak atanır ve her izolat, yedi housekeeping lokusu her birindeki alellikler tarafından tanımlanır (Alellik profil veya sekans tipi [ST]). Yedi lokusun her birinde birçok alel olması sebebiyle, izolatların rasgele aynı alellik

profillerine sahip olma olasılığı düşüktür, ve aynı alellik profiline sahip izolatlar aynı klonun üyeleri olarak belirlenebilir (Maiden ve ark., 1998 ve Spratt 1999). Sekans verileri, laboratuvarlar arasında kolayca karşılaştırılır ve MLST'in önemli bir avantajı, ise farklı araştırmalarda elde edilen sonuçların internet üzerinden karşılaştırılabilmesidir. Buna ek olarak, MLST tarafından elde edilen veriler, bakteri türlerinin evrimsel ve popülasyon biyolojisi hakkında temel soruları çözmek için kullanılabilir (Feil ve ark., 1999; Maiden ve ark., 1998 ve Spratt 1999).

Bakteri türlerini ayırt etmek, antibiyotik direnç potansiyelini belirlemek, virulens belirleyicilerini tespit etmek ve salgınların tespitinde patojen sürveyansı yapmak amacıyla tüm genom sekanslaması kullanılması stratejisi, uygun maliyetli olması yönünden hızla geliştirilmektedir. Bu teknolojinin klinik mikrobiyoloji ortamında uygulanması Didelot ve ark., (2012) tarafından tanımlanmıştır, 2011 yılında Almanya ve Fransa'da kanlı ishal neden olan *E. coli* O104:H4 varyantını hızla karakterize etmek amacıyla da başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Rasko ve ark., 2011).

Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu İyonizasyonu-Uçuş Süresi (MALDI-TOF) son yıllarda identifikasyon için birçok klinik laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Yöntem hızlıdır, konvensiyonel yöntemlere göre oldukça ucuzdur ve *E. coli*'nin tür identifikasyonunda yüksek spesifitededir (Clark ve ark., 2013; Dubois ve ark., 2012; He ve ark., 2010 ve Tan ve ark., 2012).

Araştırma ortamlarında kullanılan Ibis T5000 Biyosensör Sistemi (Abbott Molecular, Des Plains, IL), ise 6 saat içerisinde türler arasında ayırım yaparak 16S ve 23S rRNA genlerinin yanı sıra birkaç housekeeping genlerini kullanmaktadır. Ibis T5000 cihazı, identifikasyonda yüksek performanslı elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrisi ve baz bileşimi analizi için nükleik asit amplifikasyonunu birleştirir. Sistem, bilinen bakteriler, patojenik fungusların tüm ana grupları insanlar ve hayvanlarda hastalıklara neden olan önemli familyaların virulens faktörlerinin ve antibiyotik direnci belirteçlerinin saptanması dahil olmak üzere geniş bir patojen takımının identifikasyonu ve kantitatif olarak miktarının belirlenmesini sağlar (Ecker ve ark., 2008 ve Jorgensen ve ark., 2015).

2.1.9 Teşhisi

İntestinal kanalda bulunan *E. coli* ölümden sonra birkaç saat içinde dokulara yayılır, bu nedenle örneklemede numunelerin taze karkaslardan alınmasına dikkat edilmelidir. Kalp kanının, kemik iliğinin ve paraneşimatöz organların aseptik kültürleri *E. coli* septisemisinin tanısında yararlıdır. Organizma bağırsak içeriği, idrar, süt ve vajinal salgılardan kolayca izole edilir (Songer ve Post, 2005). *E. coli*, klinik örneklerden aerobik koşullar altında 37°C’de genel veya selektif besiyeride izole edilir. Dışkıdan *E. coli*, izolasyonunda, çoğunlukla Enterobacteriaceae’nin üyelerini selektif olarak üremesini sağlayan MC veya EMB agar’a ekim yapılmaktadır (Murray ve ark., 1995). Çoğu izolat (%90) MC agarda laktoz pozitifdir ve genellikle presipite olmuş safra zonu ile çevrelenmişlerdir (Songer ve Post, 2005). Kanlı agarda, 37°C’de 24 saat aerob inkübasyondan sonra *E. coli* kolonileri S formunda olabilir ve genellikle 2-3 mm çapında, konveks, nemli ve gri renklidir. Klasik tüp biyokimyasal testleri veya ticari kitler ile tanımlanabilir. IMVIC testleri (++--) dir. Spot indol ve MUG (4-methylumbelliferyl beta-D-glucuronidase) testleri hızlı tanımlama için yaygın olarak kullanılır. *E. coli* organizmalarının %99’u indol ve MUG pozitifdir (Songer ve Post, 2005).

Diyarejenik *E. coli* suşlarının tanımlanması, bu organizmaların normal floranın patojenik olmayan üyelerinden farklı olmasını gerektirir. Nükleik asit esaslı teknolojilerin geliştirilmesinde önemli ilerleme kaydedilmiştir. PCR primerleri, diyarejenik *E. coli*’nin tüm kategorileri için başarıyla geliştirilmiştir. PCR, *E. coli* suşlarının teşhis ve tanımlanmasında kullanılabilir. PCR’in avantajları arasında, hedef DNA template saptanmasında yüksek sensitivite, spesifite ve hızlılık bulunmaktadır (Nataro ve Kaper, 1998).

2.1.10 Antimikrobiyal Direnç

Antimikrobiyal direnç, insan ve veteriner hekimlikte son yıllarda gittikçe derinleşen sorunlardan biridir (DANMAP 2006; FDA 2008; Southwood 2006 ve WHO 2016). *E. coli* suşları antimikrobiyal direnç gelişimi açısından ayrı bir önemlilik arz etmektedir. Uzun yıllardır direnç çalışmalarına konu olan *E. coli*, taşıdığı

plazmidler, transpozonlar aracılığıyla direnç genlerini başka bakterilere aktarabilmekte ve böylece apatojenik türlerin, patojen ve antimikrobiyallere dirençli hale gelmesine neden olabilmektedir. Antimikrobiyal direnç sorunu günümüzde acil eylem planı gerektiren ve global düzeyde problemlere neden olabilen bir sağlık sorunudur. Gerek hayvan barınakları ve hastanelerinde gerekse insanlarda nasokomiyal infeksiyonların en önemlilerinden biri olan *E. coli*, dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir patojendir.

Dirençin genetik temelinde, hücresel genlerin mutasyonu, direnç genlerinin dışarıdan edinilmesi ve edinilen genlerin mutasyonu gibi bazı mekanizmalar bulunmaktadır. Gram negatif basiller, özellikle *E. coli*, ampisilinin uygulaması ile plazmid aracılı β -laktamazla direnci TEM (Güçlü bir beta-laktamaz inhibitör) geliştirmiştir (Leomil ve ark., 2003).

E. coli'de çoklu ilaç direnç genleri (MDR), yaygın olarak tanımlanmaktadır (Leomil ve ark., 2003). *E. coli* tarafından üretilen geniş spektrumlu β -laktamaz (ESBL) enzimleri, üçüncü nesil sefalosporinler (örneğin, sefotaksim, seftifour) de dahil olmak üzere geniş bir β -laktam direnci sağladığından bilim çevresinde endişe uyandırmaktadır. Son zamanlarda, bu bakteri insan sağlığı bakımından önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır (Pitout 2010). Yapılan bir çalışmada sağlıklı laktasyondaki sığırlarından elde edilen *E. coli* izolatlarının %40'ında çoklu ilaç direnci görülmüştür. Ayrıca çalışma sonucu sağlıklı laktasyondaki sığırlardan kommensal enterik *E. coli*'lerin tetrasikline ve diğer antimikrobiyal direnç belirleyicileri için önemli bir rezervuar olabileceği belirtilmektedir (Sawant ve ark., 2007). Sığır, domuz, kedi ve köpeklerden 16 farklı antimikrobiyal ajan için test edilen 581 klinik *E. coli* izolatından, sülfonamidler, tetrasiklin ve streptomisine karşı direnç meydana gelirken, domuzlardan elde edilen izolatlardaki direncin diğer hayvan türlerine göre daha fazla olduğu da dikkat çekici olarak bildirildi (Lanz ve ark., 2003). Başka bir çalışmada insan, domuz, tavuk, hindi, koyun, inek, keçi, kedi, köpek, at, kaz, ördek ve geyiğe ait 1263 *E. coli* izolatu antibakteriyel direnç yönünden incelendi ve %31'inin tetrasikline karşı dirençli olduğu belirlendi (Bryan ve ark., 2004). Medina ve ark. (2011) sığır, koyun, keçi, buzağı, kuzu ve çocuklardan izole edilen AEEC

suşlarının; toplamda tetrasiklin, streptomisin, eritromisin ve sülfametoksazole karşı direnç yüzdesinin %65 oranında olduğunu ayrıca, ampicilin, kloramfenikol, trimetoprim ve trimetoprim/sulfametoksazole karşı yüksek direnç (%30) oluştuğunu tespit etmişlerdir. Orden ve ark. (2000), buzağılardan izole edilen STEC'de çok düşük oranlarda MDR kaydetmişler, en yüksek derecede MDR'ın ise, toksijenik olmayan, non-fimbriated, *eae* negatif suşlarda görüldüğünü saptamışlardır. Bir başka çalışmada koyunlardan elde edilen 115 adet *E. coli* izolatının %83,3'ü test edilen antibiyotiklerin en az birine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir (Ferreira ve ark., 2015). Njoroge ve ark. 2013 ise keçilerden alınan 54 adet *E. coli* izolatında, ampicilin, amoksisilin-klavulanik asit, tetrasiklin, ceftriaxone ve kromamfenikole karşı direnç saptamıştır. At hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı en çok direnç, yine *E. coli* bildirilmiştir (Anderson ve ark., 2006 ve Panchaud ve ark., 2010). Atlarda, *E. coli* de dahil olmak üzere patojenik ve komensal bakterilerde çoklu ilaç direnci gözlenmiştir (Dunowska ve ark., 2006). At dışkısından elde edilen izolatlarda antimikrobiyal dirençli *E. coli* prevalansı (ESBL üreten *E. coli* de dahil olmak üzere) diğer bakterilerden daha yüksektir (Maddox ve ark., 2012). ESBL üreten *E. coli*, atlarda non-gastrointestinal infeksiyonların bir nedeni olarak bildirilmiştir (Vo ve ark., 2007).

Yapılan bazı çalışmalarda kedi ve köpeklerdeki *E. coli* suşlarında enrofloksasine %74, nalidiksik aside karşı ise %69,5 direnç bulunmuştur (Babacan ve ark., 2011). Avusturalya'da kedilerden ve köpeklerden alınan idrar örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarında enrofloksasine %95,7 oranında direnç tespit edilmiştir (Platell ve ark., 2011). *E. coli* birçok hayvan türünün sindirim sisteminde bulunabilen ve dışkı ile atıldığında taşıdığı direnç genleri sebebiyle antibiyotik direncinin yayılmasında oldukça önemi olan bir bakteridir. Bu bakterinin insan, köpek veya diğer hayvan türleri gibi herhangi bir canlının sindirim sisteminde bulunmasına bağlı olarak, sindirim sistemi tarafından alınan antibiyotiklere maruz kalmaları sonucu bu antibiyotiklere karşı direnç kazanabilirler (Platell ve ark., 2011). Dirençli bakteriler diğer bakteriler için de belirleyici bir rezervuar olarak hareket etme kabiliyetine sahiptir. Bununla birlikte sağlıklı köpeklerin ve diğer sağlıklı hayvanların dışkı örneklerinde antibiyotik dirençli *E. coli* bulunabilir. İngiltere'de yapılan bir çalışmada

köpeklerin antibiyotik dirençli *E. coli* taşıma oranı %29 olarak belirlenmiştir (Platell ve ark., 2011).

Hayvanlarda ve insanlarda çok çeşitli infeksiyonlara neden olan *E. coli*'lerde kinolon direnç gelişimine neden olan başlıca faktörler kromozomal mutasyonlar ve plazmidler ile aktarılan direnç genleridir. *E. coli* tip 131 (ST131) çoklu ilaç dirençli ekstraintestinal bir patojen olarak insanlarda ve son zamanlarda da insanlarla beraber yaşayan evcil hayvanlarda izole edilmiştir. ST131 izolatının insan ve evcil hayvanlardaki yaygınlığını belirlemek için Avustralya'daki teşhis laboratuvarlarından 214 florokinolon dirençli ekstraintestinal *E. coli* izolatları (205'i insanlardan 9 adedi evcil hayvanlardan) PCR tarafından kesin olmayarak ST131 olarak tanımlanmıştır. Yapılan PFGE analizlerinde insanlarla ilişkili hayvanlarda benzer ST131 izolatları olduğu görülmüştür (Platell ve ark., 2011).

Son 20 yılda *E. coli* O157:H7 populasyonunda antibiyotiklere karşı dirençte artış görülmüştür (Galland ve ark., 2001 ve Schroeder ve ark., 2002). Wilkerson ve arkadaşları 1997-2000 yılları arasında ABD'de insan ve sığırlardan elde edilen *E. coli* O157:H7 izolatları üzerinde 12 çeşit antibiyotiğe karşı direnç gelişimini belirlemek amaçlı bir çalışma yapmışlardır (Wilkerson ve ark., 2004). Çalışma sonucunda sığır izolatlarının %98'inin, insan izolatlarının ise %52'sinin tetrasikline dirençli oldukları belirlenmiştir. Streptomisin dirençliliği ise sığır izolatlarında %66 ve insan izolatlarında %45 ile ikinci sıradadır. Üçüncü sırada sığırdaki %9 ve insanda %27 ile ampisilin gelmektedir. Sığır izolatlarının %68'i ve insan izolatlarının ise %52'si birden fazla antibiyotiğe özellikle de tetrasiklin ve ampisiline karşı dirençlidir.

2.1.10.1 Florokinolonlara karşı gelişen direnç (FQR)

Kinolon grubu antibiyotikler, gerek hastane gerekse toplum kökenli infeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kabul gören ve buna paralel olarak kullanım sıklığı da giderek artan antimikrobiyal ajanlardır. Hayvanlarda ve insanlarda çok çeşitli infeksiyonlara neden olan *Escherichia coli*'de kinolon direnç gelişimine neden olan başlıca faktörler kromozomal mutasyonlar ve plazmidler ile aktarılan direnç genleridir. *E. coli* birçok hayvan türünün sindirim sisteminde bulunabilen ve dışkı ile

atıldığında taşıdığı direnç genleri sebebiyle antibiyotik direncinin yayılmasında oldukça önemi olan bir bakteridir. Sağlıklı hayvanların dışkı örneklerinde antibiyotik dirençli *E. coli* bulunabilir (Da Silva ve Mendonca, 2012 ve Roderova ve ark., 2016).

2.1.10.2 Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlara karşı gelişen direnç

β -laktamaz sentezi enterik Gram negatif bakteriler için en önemli antibiyotik direnç mekanizmasıdır. β -laktamazlar, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağı parçalayarak etki gösterirler. β -laktamaz genleri, bakteride kromozom'e plazmid veya transpozonlarda yerleşmiş genler üzerinde kodlanmaktadır. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi plazmid kaynaklı β -laktamazlar *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında yaygın bulunan enzimler olup, bunlar plazmidler aracılığıyla diğer bakterilere aktarılırlar (Dağlar ve Öngüt, 2012). Plazmid kaynaklı β -laktamazlar, başlangıçta penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilen enzimler iken sonraları bu enzimleri kodlayan genlerde ortaya çıkan mutasyonlar sonucu genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL) adı verilen, üçüncü kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize edebilen yeni β -laktamazlar olarak tanımlanmıştır (Sirot 1995). GSBL enzimleri esas olarak TEM ve SHV enzimlerinden köken alsalar da TEM ve SHV kökenli olmayan CTX-M, OXA-1, PER-1, PER-2 gibi yeni plazmid kaynaklı GSBL'ler de tanımlanmıştır. Bu yeni enzimler sefamisinler de dahil olmak üzere tüm sefalosporinlere karşı etkilidir (Jacoby 1994). GSBL'ler ülkemizde ve tüm dünyada yaygın olarak bulunur. Günümüzde 200'den fazla GSBL tanımlanmıştır (Jacoby ve Bush, 2016). GSBL'ler en sık hastane kökenli *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarında görülmekle birlikte diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde de saptanmaktadır (Mac Kenzie ve Gould, 1998).

GSBL enzimleri plazmid aracılığıyla kolay yayılmaları, salgınlara yol açabilmeleri, bu suşların etken olduğu infeksiyonlarda tedavi başarısızlığı ve mortalite artışı gibi ciddi klinik problemlerin ortaya çıkışı nedeniyle günümüz hastanelerinde önemli bir direnç mekanizması haline gelmiştir. Bu nedenle bu enzimlerin laboratuarda iyi tanımlanması tedavinin doğru yönlendirilmesi bakımından önem taşır (Dağlar ve Öngüt, 2012).

2.1.11 Kontrol Önlemleri

Buzağı septisemisinin etiyolojisinde en önemli neden gebe hayvanların gebeliklerinin son dönemlerinde ülkeden ülkeye veya başka bölgelere transportlardır. Annenin yeterli immun düzeye ulaşması için gereken zaman verilmeden yapılan bu nakiller ve doğum sonrası tüm yavrulara yeterli düzeyde kolostrum verilmelememesi gibi sebeplerden buzağı ölümleri yaşanmaktadır. Pasif immunizasyonla, yavrular çevrede yaygın ve özellikle kolibasilozise neden olan *E.coli* suşlarına karşı annede sentezlenen antikorları alabilirler. Ayrıca, çoğu ülkede hasta buzağılara *E. coli*'ye karşı hazırlanmış hiper immun serumlar pasif immunoterapi amacıyla verilmektedir. Aktif immunizasyon amacıyla da son yıllarda birçok aşı hazırlanmaktadır. Aşılama, probiyotikler ile tedavi, bakteriyofajların uygulanması ve diyetin modifikasyonu da dahil olmak üzere sığırların zoonotik STEC ile bağırsak kolonizasyonunu azaltmaya yönelik çeşitli stratejiler denenmiştir (Callaway ve ark., 2004). Gebe hayvanlara gebelikleri süresince çeşitli dönemlerde K99 antijeni taşıyan canlı veya inaktif *E. coli* aşıları yapılarak fetusun aktif immunizasyonu sağlanmaktadır. Ancak ticari olarak hazırlanmış *E. coli* bakterin aşılardan büyük bir yarar sağlanamamaktadır (Aydin ve Paracikoğlu, 2006).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Örneklem

Tez çalışmasında kullanılan 233 adet *E. coli* izolatu, 2014 yılında sona eren Tubitak COST-TOVAG 110O478 No'lu ve 'Escherichia coli'de Florokinolon Farmakodinamiğinin Araştırılması' adlı proje materyalinden, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma Uygulama Merkezinden ve Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na rutin mikrobiyolojik analiz amacıyla getirilen örneklerden elde edilmiştir. Tez çalışması kapsamında değerlendirilen *E. coli* izolatları sayıları, hayvan türleri ve orjinlerine göre Tablo (4) ve Tablo (5)'de verilmiştir.

Tablo 4: *E. coli* izole edilen hayvan türleri ve illere göre dağılımı

Şehir/Hayvan türü	Sığır	Koyun	Keçi	At	Kedi	Köpek	Toplam
Ankara	13	3	5	1	5	0	27
Bursa/Karacabey	41	0	0	0	0	0	41
Bursa/Nilüfer	8	0	0	0	0	0	8
Bursa/U.Ü.V.F.M	15	8	13	3	8	35	82
Bursa/U.Ü.A.U.M	0	13	27	0	0	0	40
Bursa/Yenişehir	33	0	0	0	0	0	33
Çanakkale	0	1	0	0	0	0	1
Balıkesir	1	0	0	0	0	0	1
Toplam	111	25	45	4	13	35	233

#U.Ü.V.F.M: Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı

* U.Ü.A.U.M: Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma Uygulama Merkezi

Tablo 5: *E. coli* izole edilen hayvanlara ait genel bilgiler

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
1	7	Ankara	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
2	18	Ankara	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
3	19	Ankara	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
4	20	Ankara	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
5	21	Ankara	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
6	22	Ankara	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
7	23	Ankara	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
8	24	Ankara	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
9	26	Ankara	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
10	27	Ankara	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
11	56	Ankara	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
12	12	Ankara	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
13	55	Ankara	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
14	143	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
15	145	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
16	146	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
17	147	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
18	148	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
19	151	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
20	152	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
21	153	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
22	154	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
23	155	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
24	156	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
25	157	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
26	158	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
27	159	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
28	160	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
29	161	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
30	162	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
31	163	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
32	164	Bursa/Karacabey	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
33	165	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
34	166	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
35	167	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
36	168	Bursa/Karacabey	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
37	169	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
38	170	Bursa/Karacabey	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
39	171	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
40	173	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
41	174	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
42	175	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
43	176	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
44	177	Bursa/Karacabey	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
45	178	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
46	179	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
47	180	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
48	181	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
49	183	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
50	186	Bursa/Karacabey	Sığır	Sağlıklı	Genç
51	187	Bursa/Karacabey	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
52	188	Bursa/Karacabey	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
53	189	Bursa/Karacabey	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
54	190	Bursa/Karacabey	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
55	191	Bursa/Nilüfer	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
56	192	Bursa/Nilüfer	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
57	196	Bursa/Nilüfer	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
58	197	Bursa/Nilüfer	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
59	200	Bursa/Nilüfer	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
60	205	Bursa/Nilüfer	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
61	206	Bursa/Nilüfer	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
62	208	Bursa/Nilüfer	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
63	315	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
64	322	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
65	323	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
66	331	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
67	332	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
68	333	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
69	334	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
70	504	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
71	508	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
72	510	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
73	511	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin
74	522	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Ergin

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
75	318	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
76	329	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
77	330	U.Ü.V.F.M	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
78	66	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
79	67	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
80	69	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
81	70	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
82	71	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
83	72	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
84	74	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
85	76	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
86	77	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
87	78	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
88	79	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
89	80	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
90	81	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
91	82	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
92	83	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
93	84	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
94	85	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
95	86	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
96	87	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
97	88	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
98	89	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
99	90	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
100	91	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
101	92	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
102	94	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
103	95	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
104	96	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
105	97	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
106	98	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
107	100	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
108	101	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
109	103	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
110	104	Bursa/Yenişehir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç
111	487	Balıkesir	Sığır	Gastroenteritisli	Genç

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
1	2	Ankara	Koyun	Gastroenteritisli	Ergin
2	39	Ankara	Koyun	Gastroenteritisli	Ergin
3	61	Ankara	Koyun	Gastroenteritisli	Ergin
4	319	U.Ü.V.F.M	Koyun	Gastroenteritisli	Ergin
5	328	U.Ü.V.F.M	Koyun	Gastroenteritisli	Ergin
6	372	U.Ü.V.F.M	Koyun	Gastroenteritisli	Ergin
7	376	U.Ü.V.F.M	Koyun	Gastroenteritisli	Ergin
8	386	U.Ü.V.F.M	Koyun	Gastroenteritisli	Ergin
9	314	U.Ü.V.F.M	Koyun	Gastroenteritisli	Genç
10	520	U.Ü.V.F.M.	Koyun	Gastroenteritisli	Genç
11	571	U.Ü.V.F.M	Koyun	Gastroenteritisli	Genç

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
12	210	U.Ü.A.U.M	Koyun	Sağlıklı	Ergin
13	212	U.Ü.A.U.M	Koyun	Sağlıklı	Ergin
14	214	U.Ü.A.U.M	Koyun	Sağlıklı	Ergin
15	217	U.Ü.A.U.M	Koyun	Sağlıklı	Ergin
16	219	U.Ü.A.U.M	Koyun	Sağlıklı	Ergin
17	221	U.Ü.A.U.M	Koyun	Sağlıklı	Ergin
18	222	U.Ü.A.U.M	Koyun	Sağlıklı	Ergin
19	223	U.Ü.A.U.M	Koyun	Sağlıklı	Ergin
20	225	U.Ü.A.U.M	Koyun	Sağlıklı	Ergin
21	227	U.Ü.A.U.M	Koyun	Sağlıklı	Ergin
22	230	U.Ü.A.U.M	Koyun	Sağlıklı	Ergin
23	231	U.Ü.A.U.M	Koyun	Sağlıklı	Ergin
24	234	U.Ü.A.U.M	Koyun	Sağlıklı	Ergin
25	370	Çanakkale	Koyun	Gastroenteritisli	Genç

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
1	3	Ankara	Keçi	Gastroenteritisli	Ergin
2	6	Ankara	Keçi	Gastroenteritisli	Ergin
3	34	Ankara	Keçi	Gastroenteritisli	Ergin
4	62	Ankara	Keçi	Gastroenteritisli	Ergin
5	11	Ankara	Keçi	Gastroenteritisli	Genç
6	247	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
7	248	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
8	249	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
9	250	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
10	253	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
11	254	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
12	255	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
13	256	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
14	263	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
15	267	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
16	269	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
17	270	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
18	273	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
19	274	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
20	279	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
21	280	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
22	282	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
23	283	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
24	284	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
25	285	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
26	286	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
27	287	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
28	288	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
29	291	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
30	292	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
31	297	U.Ü.A.U.M.	Keçi	Sağlıklı	Ergin
32	303	U.Ü.A.U.M	Keçi	Sağlıklı	Ergin
33	316	U.Ü.V.F.M	Keçi	Gastroenteritisli	Ergin
34	379	U.Ü.V.F.M	Keçi	Gastroenteritisli	Ergin

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
35	502	U.Ü.V.F.M	Keçi	Gastroenteritisli	Ergin
36	505	U.Ü.V.F.M	Keçi	Gastroenteritisli	Ergin
37	506	U.Ü.V.F.M	Keçi	Gastroenteritisli	Ergin
38	509	U.Ü.V.F.M	Keçi	Gastroenteritisli	Genç
39	514	U.Ü.V.F.M	Keçi	Gastroenteritisli	Genç
40	515	U.Ü.V.F.M	Keçi	Gastroenteritisli	Genç
41	516	U.Ü.V.F.M	Keçi	Gastroenteritisli	Genç
42	517	U.Ü.V.F.M	Keçi	Gastroenteritisli	Genç
43	518	U.Ü.V.F.M	Keçi	Gastroenteritisli	Genç
44	519	U.Ü.V.F.M	Keçi	Gastroenteritisli	Genç
45	521	U.Ü.V.F.M	Keçi	Gastroenteritisli	Genç

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
1	4	Ankara	At	Sağlıklı	Ergin
2	320	U.Ü.V.F.M	At	Sağlıklı	Ergin
3	321	U.Ü.V.F.M	At	Sağlıklı	Ergin
4	317	U.Ü.V.F.M	At	Sağlıklı	Ergin

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
1	9	Ankara	Kedi	Sağlıklı	Ergin
2	416	Ankara	Kedi	Sağlıklı	Ergin
3	417	Ankara	Kedi	Sağlıklı	Ergin
4	418	Ankara	Kedi	Sağlıklı	Ergin

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
5	425	Ankara	Kedi	Sağlıklı	Ergin
6	428	U.Ü.V.F.M	Kedi	Sağlıklı	Ergin
7	430	U.Ü.V.F.M	Kedi	Sağlıklı	Ergin
8	434	U.Ü.V.F.M	Kedi	Sağlıklı	Ergin
9	442	U.Ü.V.F.M	Kedi	Sağlıklı	Ergin
10	443	U.Ü.V.F.M	Kedi	Sağlıklı	Ergin
11	484	U.Ü.V.F.M	Kedi	Sağlıklı	Ergin
12	495	U.Ü.V.F.M	Kedi	Sağlıklı	Ergin
13	500	U.Ü.V.F.M	Kedi	Sağlıklı	Ergin

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
1	413	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
2	419	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
3	420	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
4	421	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
5	422	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
6	423	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
7	424	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
8	426	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
9	429	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
10	431	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
11	432	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
12	435	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
13	436	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
14	437	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin

Örnek No	İzolat No	Bölge	Orjin	Sağlık durumu	Yaş
15	438	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
16	439	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
17	441	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
18	444	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
19	445	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
20	446	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
21	447	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
22	448	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
23	449	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
24	462	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
25	465	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
26	469	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
27	474	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
28	478	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
29	480	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
30	483	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
31	488	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
32	490	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
33	492	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
34	496	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin
35	497	U.Ü.V.F.M	Köpek	Sağlıklı	Ergin

#U.Ü.V.F.M: Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı

* U.Ü.A.U.M: Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma Uygulama Merkezi

Tablo 6: *E. coli* izole edilen hayvanlara ait genel bilgiler

Hayvan türü	Yaş	Gastroenteritisi	Sağlıklı
Sığır (n:111)	Ergin 24	24	0
	Genç 87	54	33
Koyun (n:25)	Ergin 21	8	13
	Genç 4	4	0
Keçi (n:45)	Ergin 36	9	27
	Genç 9	9	0
Köpek (n:35)	Ergin 35	0	35
	Genç 0	0	0
At (n:4)	Ergin 4	0	4
	Genç 0	0	0
Kedi (n:13)	Ergin 13	0	13
	Genç 0	0	0
Total	233	160	73

3.1.2 Tez çalışmasında kullanılan Referans Suşlar

Tez çalışmasında testlerde pozitif ve negatif kontrol amacıyla Tablo (7)'da verilen referans suşlar kullanılmıştır.

Tablo 7: Referans Suşlar

No	Referans Suş ismi	Referans Suş No
1	<i>E. coli</i> (Negatif)	ATCC 25922
2	<i>E. coli</i> (<i>eae</i>)	ATCC 43887
3	<i>E. coli</i> (<i>Stx1+Stx2+eae</i>)	ATCC 35150
4	<i>E. coli</i> (<i>STa</i>)	E5763

3.1.3 Bakteriyolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyaller

3.1.3.1 Besiyerleri

3.1.3.1.1 Tryptose Soya Agar (TSA)

Tryptose Soya Agar (Oxoid - CM0131) usulüne uygun şekilde distile suda eritildi, 121°C'de, 1,1 atmosfer basıncında 15 dakika steril edildi. Soğuduktan sonra petrilere paylaştırıldı. Toplanan örneklerden izolatları saflaştırmak/ayırmak amacıyla

kullanıldı. Besiyeri ayrıca DNA izolasyonu öncesinde izolatların tazelenmesi işleminde kullanıldı.

3.1.3.1.2 Tryptone Soya Broth (TSB)

Tryptone Soya Broth (Oxoid - CM129) usulüne uygun şekilde distile suda eritildi. Tüplere paylaştırıldıktan sonra, 121°C’de, 1,1 atmosfer basıncında 15 dakika steril edildi. TSB, izole edilen *E. coli*’leri saklamak ve saf kültür yapmak amacıyla kullanıldı.

3.1.3.1.3 Kanlı Agar (KA)

Bu amaçla Cloumbia Blood Agar Base (Oxoid - CM0331) no’lu hazır kullanıldı. *E. coli* izolatlarını saflaştırmak/ayırmak amacıyla kullanıldı.

3.1.3.1.4 MacConkey (MC) Agar

MacConkey Agar (Merck - 1054650500) uygun şekilde distile suda eritildi, 121°C’de, 1,1 atmosfer basıncında 15 dakika steril edildi. Soğuduktan sonra petrilere paylaştırıldı. Besiyeri, izole edilen *E. coli*’leri ayırmak/saflaştırmak amacıyla kullanıldı.

3.1.3.1.5 Eosine Methylene Blue (EMB) Agar

Eosine Methilen Blue Agar (Oxoid - CM0069) uygun şekilde distile suda eritildi, 121°C’de, 1,1 atmosfer basıncında 15 dakika steril edildi. Soğuduktan sonra petrilere paylaştırıldı. Besiyeri, izole edilen *E. coli*’leri ayırmak/saflaştırmak amacıyla kullanıldı.

3.1.3.1.6 Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar

Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar (Oxoid - CM0813) üretici firmanın formülasyonuna göre hazırlandı. Buna göre besiyeri, 25,75 g/500 ml olacak şekilde distile su içinde çözünmesi sağlandı ve otoklavda 121°C’da 15 dakika sterilize edildi. 50°C’a soğuyunca üzerine 4 ml steril distile su ile sulandırılmış CT-Supplement (Oxoid - SR0172) ilave edilerek karıştırıldı ve steril petri kutularına döküldü.

Besiyeri, izole edilen *E. coli*'lerde *E. coli* O157:H7 serotipinin saptanması amacıyla kullanıldı.

3.1.3.2 Cihaz ve Gereçler

3.1.3.2.1 Binokuler Mikroskop Olympus® CH20BIMF200

3.1.3.2.2 Buzdolabı Arçelik® Çift Kapaklı No-frost

3.1.3.2.3 Derin Dondurucu

Arçelik® yatay derin dondurucu (- 80°C ve -20°C).

3.1.3.2.4 İnkübatör (37 °C) (Nüve EN 500)

Bakteri izolasyonu amacıyla Nüve EN 500 marka inkübatör 37°C'de kullanıldı.

3.1.3.2.5 Gram boyama seti

3.1.3.2.6 Hassas terazi

Sartorius AG® (ED224S, Germany) marka terazi bu çalışmada kullanılan besiyerlerinin hazırlanmasında kullanıldı.

3.1.3.2.7 Oksidaz test şeriti

Merck KgaA® (St. Louis, Missouri, US).

3.1.3.2.8 Otoklav

Nüve® (Ankara, Turkey, OT 4060). Besiyeriler, ultra saf su, ve cam malzemeler sterilizasyon amacıyla kullanıldı.

3.1.3.2.9 pH kağıdı

Merck KGA® (Darmstadt, Germany, Code No:1.09535.0001) marka pH kağıdı, hazırlanan reagentlerin optimal pH'larını hazırlamak amacıyla kullanıldı.

3.1.3.2.10 Steril pastör pipeti

VWR® (Radnor, Pennsylvania, US, 7ml-Catalog no: 612.1747)

3.1.3.2.11 Steril tek kullanımlık pipet

LP Italiana® (1ml- code: 160110, 2ml- code: 160210, 5ml- code: 160510, 10ml- code: 161010)

3.1.3.2.12 Vorteks

IKA® Lab Dancer marka vorteks (Staufen, Germany, Ident no: 0003365000), DNA ekstraksiyon sırasında ve PCR reagentlerinin karıştırılmasında kullanıldı.

3.1.3.2.13 Wellcollex *E. coli* O157:H7

Non- Sorbitol fermenter *E. coli* izolatlarında O157:H7'nin suşlarının tespiti amacıyla Wellcollex *E. coli* O157:H7 (Remel Europe Ltd®, Dartford, UK- katalog no: 30959601/ZC61) kullanıldı.

3.1.4 Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Materyaller

3.1.4.1 Besiyerleri

3.1.4.1.1 Tris - Acetate- EDTA (TAE) Buffer

Agaroz Jel hazırlanmasında ve DNA'ların jelde yürütülmesini sağlamak amacıyla 50X Tris-Acetate-EDTA (TAE) Buffer (PC0723-50X) kullanıldı. 1X TAE buffer hazırlanması amacıyla 20 ml TAE buffer, 980 ml deiyonize su içerisinde suspanse edildi. Çözelti 25°C'de pH 8,0'e ayarlandı ve stok solüsyonu olarak jel hazırlanmasında kullanıldı.

3.1.4.1.2 Agaroz Jel

Ticari Agaroz (BIO-ROC, UPL Diagnostic Mainz - Germany, Lot no: LF45150028) çalışmada DNA yüklenmesi amacıyla kullanıldı. Çalışmada DNA bantlarını görüntülemek amacıyla %1,4 oranında agaroz jel kullanıldı ve

hazırlanmasında 1X TAE kullanıldı. 1,4 gram agaroz jel, 100 ml 1X TAE içerisinde suspanse edildi. Hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırına koyuldu. Aralıklarla erlen mikrodalgadan çıkarılıp çalkalandı. Tamamen eriyene kadar çalkalanarak ısıtıldı. Çözelti biraz soğutuldu ve yavaşça treylere döküldü. Donması için 1 saat beklendi. DNA yüklenmesi ve DNA bantların görüntülemek amacıyla kullanıldı.

3.1.4.2 Cihaz ve Gereçler

3.1.4.2.1 Biyogüvenlik kabini

BİL-SER LAB.LTD® Class 2

3.1.4.2.2 Deiyonize ve Ultra Saf su Sistemi

MILLIPORE® marka cihaz (ELIX5, no: ZLXS5V05Y, MILIQ Synthesis A10, katalog no: ZMQ55VFT1, Fransa) deiyonize ve ultra saf su Sistemi olarak kullanıldı. Özellikle PCR ve moleküler deneyler için gerekli olan reagentlerin hazırlanmasında suyun kalitesi bütün sistemden alınacak sonuçları direkt olarak etkileyebileceği için son derece büyük öneme sahip bu sistem kullanılmıştır.

3.1.4.2.3 DNA ladder (markır) ve DNA loading dye (yükleme tamponu)

Amresco® Molecular Weight Marker 100 bp DNA Ladder (code: k180- 205 UL) paket içeriğinde bulunan 6X DNA loading dye, 1 X konsantrasyonunda ayarlandı ve örneklerin DNA'ları bu yüklem tamponu ile boyandı. Amresco Molecular Weight Marker 100 bp DNA Ladder 100-3000 bp'lik DNA fragmentleri arasındaki bölgeler için kullanıldı. Çalışılan DNA'ların molekül ağırlıkları, markırları ile karşılaştırıldı.

3.1.4.2.4 Gradient Thermal Cycler PCR Cihazı

PCR reaksiyonları, Gradient Thermal Cycler (Techne TC- 3000G, Bibby Scientific®, UK) PCR makinesinde gerçekleştirildi. 48 bloklu bu cihazı 8 sütununda sıcaklık optimizasyonu sağlanmakta ve 6 sırasında ise reagentleri ve primer konsantrasyonlarının optimizasyonu ayarlanabilmektedir. Annealing sıcaklıkları, 20

ve 80°C gradient özellikleri arasında optimize olabilmektedir. Her bir bloğun sıcaklık oranı saniyede 3,3°C hızlanmaktadır.

3.1.4.2.5 Horizontal Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı

Thermo Scientific® marka horizontal tank, jelin dökülmesinde kalıp olarak ve jelde DNA'ların yürütülmesinde kullanıldı. Elektroforez tankı, anot ve katot uçlarına gelen elektrik akımı ile DNA'ların jelde hareket etmesini sağlamaktadır. Thermo Scientific® marka güç kaynağı ise, tanka elektrik akımını sağlamaktadır. Elektroforez aşamasında, PCR protokolüne göre volt, miliamper ve süre değişiklikleri ayarlandı.

3.1.4.2.6 Isıtıcı Bloklar

Labent® (AccuBlok D1200, USA) marka cihaz kullanıldı. DNA ekstraksiyonu sırasında, reagentlerin uygun sıcaklığa getirilmesi ve bu sıcaklıkta gerekli beklemenin yapılması amacıyla kullanıldı.

3.1.4.2.7 Jel Görüntüleme ve Dökümantasyon Sistemi

Vilber Lourmat® (Marne-la-Vallee Cedex - France) Quantum 1100 marka Jel Görüntüleme ve Dökümantasyon sistemi, beyaz ışık ve UV ışığı altında nükleik asit ve proteinlerin görüntülenmesi, bakterilerin kolonilerinin sayılmasına imkan sağlayan bilgisayarlı bir sistemdir. Elektroforez sonrasında meydana gelen DNA bantlarının görüntülenmesi amacıyla kullanıldı ve 2 megapiksel bir CCD kamerası ile bilgisayara aktarılan görüntüler 'Infinity- Capture software ve Bio 1D' programları aracılığı ile analiz edildi. Elde edilen görüntüler elektronik ortamda çeşitli formatlarda değerlendirildi ve printer aracılığı ile çıktısı alındı.

3.1.4.2.8 Laminar Flow Cabinet

(Nüve® MN 120, Ankara, Turkey) DNA ve PCR yapılırken kontaminasyonu engellemek amacıyla kullanıldı.

3.1.4.2.9 Mikro Santrifüj

Sigma® (Osterode, Germany, Edition 1-4 ED marka) DNA ekstraksiyonunda ve PCR yapılırken reagentlerin santrifüj edilmesi amacıyla kullanıldı.

3.1.4.2.10 Mikrodalga Fırın

Beko® (Istanbul, Turkey, MD 1510). Agaroz jelin eritilmesi amacıyla kullanıldı.

3.1.4.2.11 Otomatik Pipetler

0,2- 2 µl (F2- EJ20427), 0,5- 10 µl (CJ 10189), 10- 100 µl (CJ06931) , 100- 1000 µl (CJ05931)'lik Finnpiptette® pipetler bakteriyoloji ve moleküler çalışmaları sırasında kullanıldı.

3.1.4.2.12 Parafilm

Parafilm M® (Chicago, US, catalog no: 112-160-01), Elektroforez aşamasından önce DNA'ların loading dye ile karıştırılmasında kullanıldı.

3.1.4.2.13 PCR mikrotüpleri

PCR reaksiyonunu gerçekleştirmek için, kullanılan PCR reagentlerinin konulduğu 0,2 ml, ince duvarlı, düz kapaklı, DNase, Rnase, Pyrogen free mikrotüpler Axygen® (Union City,USA, catalog no: PCR-02-C) kullanıldı.

3.1.4.2.14 PCR Karışımı

PCR reaksiyonu Thermo Fisher Scientific® (Waltham, Massachusetts, US) Phire Hot Start II DNA Polymerase (katalog no: F122s), 5X Phire Reaction Buffer (katalog no: F524L) Thermo Scientific®, dNTP Mix Roche® ® (Mannheim, Germany) (katalog no: R0191) kullanıldı. PCR reaksiyonunda kullanılırken, kit reagentleri için özel soğutucu raklar kullanıldı. Miks ve reagentler kullanılmadığı zaman -20°C'de saklandılar.

3.1.4.2.15 PCR Soğutucu Sistem, Buzlu Rack

Eppendorf® PCR cooler (Hamburg, Germany, katalog no: Z606634-1EA) marka buzlu rack ile PCR reaksiyonu hazırlanırken reagentleri ve örneklerin DNA'larını PCR reaksiyonu başlatılana kadar soğukta tutulması sağlandı. Böylece reagent ve DNA örneklerinin bozulması engellendi.

3.1.4.2.16 Primerler

PCR reaksiyonunda kullanılan primerler Alpha DNA®, Montreal, (Canada)'de sentezletildi. Primerler Franck ve ark. 1998 yaptıkları çalışmaya göre seçim yapıldı. Çalışma solüsyonu, 1 µl stok primer solüsyonunu ile 19µl steril Milli Q su hazırlandı. Stok primer solüsyonu ve sulandırılmış primer solüsyonu -20 °C'de saklandı.

***Stx1* geni için:**

(F) Z36899b: 94066 pmol/µl- TTCGCTCTGCAATAGGTA

(R) Z36899a: 72797 pmol/µl - TTCCCAGTTCAATGTAAGAT

***Stx2* geni için:**

(F) L11078a: 69917 pmol/µl - GTGCCTGTTACTGGGTTTTTCTTC

(R) L11078b: 80171 pmol/µl - AGGGGTCGATATCTCTGTCC

***F41* geni için:**

(F) X14354a: 85359 pmol/µl- GCATCAGCGGCAGTATCT

(R) X14354b: 99481 pmol/µl- GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT

***K99* geni için:**

(F) M35282a: 121416 pmol/µl- TATTATCTTAGGTGGTATGG

(R) M35282b: 73868 pmol/µl- GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTC

***STa* geni için:**

(F) M25607a: 91850 pmol/µl- GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA

(R) M25607b: 88315 pmol/µl- AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA

eae geni için:

(F) Z11541: 105842 pmol/μl- ATATCCGTTTTTAATGGCTATCT

(R) S90827: 96387 pmol/μl- AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA

3.1.4.2.17 Spektrofotometre

Nanodrop ND- 1000 V3.3 Spektrofotometre (NanoDrop Technologies, Inc®. Wilmington, USA) bu amaçla kullanıldı. İzole edilen DNA'nın konsantrasyon ve saflığının belirlenmesinde kullanıldı.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteriyolojik İnceleme

3.2.1.1 *E. coli* izolatlarının Tazelenmesi ve Saflaştırılması

E. coli izolatlarının tazelenmesi/canlandırılması işleminde -20°C'de saklanan izolatlar Mac Conkey (MC) Agar ve Eosine Methilen Blue (EMB) Agar yüzeyine ekildi. Tryptose Soya Agar (TSA) ve Kanlı Agar ise izolatların canlandırılması amacıyla kullanıldı. Petriler 37°C 18-24 saat inkübasyona bırakıldı, inkübasyon süresi sonunda koloniler *E.coli* yönünden değerlendirildi.

3.2.2 *E. coli* O157:H7 saptanması

3.2.2.1 Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar'a ekim

E. coli O157:H7 şüpheli *E. coli* serotiplerinin izolasyonu için 2,5 mg/ 1 litre potassium tellurite içeren cefixime katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar yüzeyine ekimler yapıldı. Petriler 37°C 18-24 saat inkübasyona bırakıldı, inkübasyon sonunda, koloniler O157:H7 yönünden değerlendirildi.

3.2.2.2 Wellcollex *E. coli* O157:H7

O157:H7 suşlarının doğrulanması amacıyla, sorbitol negatif koloniler ticari O157:H7 latex test kiti (Remel Europe Ltd®, Dartford, UK- katalog no: 30959601/ZC61) ile test edildi. Elde edilen kolonilerden 1-2 koloni alınarak beyaz

reaksiyon kartı üzerinde 40µl steril fizyolojik su içerisinde süspansiyon edildi. Süspansiyonun üzerine 40µl O157 lateks aglütinasyon test kiti (Wellcolex coli O157:H7) eklenerek karıştırıldı ve 30 saniye içerisinde oluşan aglütinasyon pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.3 Multipleks PCR

3.2.3.1 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu amacıyla Tryptose Soy Agar'da (TSA) üretilen 18 saatlik bakteri kolonileri (15- 20 koloni) 0,2 ml steril saf suda süspansiyon edilerek 99°C'de 5 dakika bekletildi. Süspansiyon, 45 saniye boyunca 12,500-13,000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. DNA ekstratları numaralandırılarak diğer çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C saklandı.

3.2.3.2 DNA Konsantrasyonu ve Saflığı Ölçümü

Nano Drop ND- 1000 V.3.3 Spektrofotometre (Nano Drop Technologies, Inc. Wilmington, USA) ile yapıldı. Cihazın çalışma prosedürü gereği önce ölçüm yapılacak nükleik asidin içinde bulunduğu sıvı ile 'Blank (Boş) ölçüm' yapıldı. Bu amaçla ekstrakte edilen *E. coli* (ATCC 25922) süşunun DNA'sından 1,5µl alınarak spektrofotometrenin ölçüm noktasına dikkatli bir şekilde damlatılarak değerlendirildi. Ölçüm noktası temiz ve kuru peçete ile silinerek anlatılan işlemler diğer izolatlardan ekstrakte edilen DNA'lar için ayrı ayrı uygulandı.

3.2.3.3 PCR Parametreleri

Örneklerin ve standart süşların DNA'ları ekstrakte edildikten sonra hedef DNA olarak PCR miksinde kullanıldı.

3.2.3.3.1 Multipleks PCR protokolü

Hedef DNA'lar, PCR amplifikasyonunda kullanıldı. Amplifikasyon prosedürü olarak Franck ve ark., (1998) tarafından oluşturulan prosedür kısmen modifiye edilerek uygulandı. Test 20µl final konsantrasyonda gerçekleştirildi. *Stx1* (555 Bp),

Stx2 (118 Bp), *eae* (425 Bp), *STa* (190 Bp), *F41* (380 Bp) ve *F5(K99)* (314 Bp), genlerini içeren 6 farklı gen bölgesi aynı anda multipleks PCR protokolüyle tarandı.

mPCR miksinde kullanılan reagentler:

1- 75 mM MgCl₂ Phire Reaction Buffer (Thermo Scientific®)

2- 10 mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Roche®)

3- Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific®)

4- Primerler (Alpha DNA®) 6 adet [*Stx1* (555 Bp), *Stx2* (118 Bp), *eae* (425 Bp), *STa* (190 Bp), *F41* (380 Bp) ve *F5(K99)* (314 Bp)]

Reaksiyon karışımı her bir primerden (0,2x12) 2,4µl, PCR grade nucleotide miksi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)'tan 0,4µl, Phire Reaction Buffer 4µl, Phire Hot Start II DNA Polymerase 0,4µl, Su 10,8 ve 2µl template içermektedir Tablo (8). PCR reaksiyonu, Techne® TC-3000G Gradient Termal Cycler de 98°C'de 5dak., 98°C'de 30 san., 55°C'de 30san., 70°C'de 1 dak. ve 70°C'de 10 dak. olacak şekilde 25 siklus şeklinde uygulandı Tablo (9).

Tablo (8): Multipleks PCR protokolü

PCR içeriği	Hacim/ Reaksiyon
H ₂ O	10,8 µl
5x Phire Reaction Buffer	4 µl
dNTP	0,4 µl
Primers (0,2x12)	2,4 µl
Phire Hot Start II DNA Polymerase	0,4 µl
Template DNA	2 µl
Toplam	20 µl

DNA template (çalışılan örnekler), template bulunmayan negatif kontrol (su), template bulunan negatif kontrol (ATCC 25922 Standart suş) ve pozitif kontrolden oluşacak şekilde reaksiyon miksi hazırlandı. PCR miksi her örnek için 20'şer µl oranında hazırlandı. PCR miskleri amplifikasyon amacıyla, Gradient Thermal Cycler (Techne TC-3000G, Bibby Scientific, UK) PCR makinesine yerleştirildi. Reaksiyonda kullanılan DNA amplifikasyon parametreleri aşağıdaki gibidir:

Tablo 9: DNA amplifikasyon parametreleri

İlk denatürasyon	98°C'de 5 dakika	25 siklus
Denatürasyon	98°C'de 30 saniye	
Annealing (Bağlanma)	55°C'de 30saniye	
Extension (Uzatma)	70°C'de 1 dakika	
Son uzatma	70°C'de 10 dakika	
Son bekletme	4°C'de	

3.2.3.3.2 Agaroz Jel Hazırlanması ve Dökülmesi

Multipleks PCR protokolünde %1,4 agaroz jel kullanıldı. 100 ml 1X TAE buffer içine hassas terazide tartılan 1,4 gr agaroz karıştırıldı ve bir erlen mayer içinde mikrodalga fırında yüksek ayarda çözümü sağlandı. Aralıklarla erlen, mikrodalgadan çıkarılıp çalkalandı. Agaroz tamamen eriyene kadar çalkalanarak ısıtıldı. Elektroforez tepsisinin çatlamaması için çözelti, muslukta biraz soğutuldu (65°C). Horizontal elektroforez tankına ait 20 gözlü iki tarak (jel ile tanka yerleştirildikten sonra agaroz jel, tank tepsisine döküldü. 15 dakika sonra jel polimerize olduktan sonra taraklar jelden dikkatlice çıkarıldı. Elektroforez tankı, jeli ve elektrodları kapatacak şekilde 1X TAE buffer ile dolduruldu.

3.2.3.3.3 Amplifikasyonu yapılan DNA'ların agaroz jele yüklenmesi

Çalışılacak olan amplifiye DNA'lar, buzlu raklarda elektroforez tankının bulunduğu odaya getirildi ve parafilm üzerinde 2µl loading dye ile boyandı. 10µl amplifiye DNA ile 2µl 6X loading dye (Amresco) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa (Amresco) Molecular Weight Marker 100 bp DNA Ladder ve sonra pozitif ve negatif kontroller yüklendi.

3.2.3.3.4 Amplifikasyonu yapılan DNA'ların Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

Multipleks PCR protokolüne göre, elektroforez tankına bağlı olan güç kaynağı cihazı, 80 volt, 400 mA ve 100 dakika süre ile ayarlandı. Süre sonunda tanktan dikkatlice çıkartılan agaroz jel, karanlık bir odada UV transilluminatör ile DNA bantlarının görüntülenmesi sağlandı. Kontrolü yapılan agaroz jelin Vilber Lourmat Quantum 1100 marka Jel Görüntülenmesi ve Dökümantasyon Sistemi ile beyaz ışık ve UV ışığı altında DNA'ların görüntülenmesi sağlandı ve kayıtları alındı. Multipleks PCR protokolüne göre, elektroforez tankına bağlı güç kaynağı cihazı, 80 volt, 400 mA ve 100 dakika süre olarak ayarlandı. Süre sonunda tanktan dikkatlice çıkartılan agaroz jel görüntüleme sisteminde değerlendirildi ve kaydedildi.

3.2.3.3.5 Patotiplendirme

PCR çalışması sonucu evcil hayvanlara ait *E. coli* izolatlarında *Stx1*, *Stx2*, *eae*, *STa*, *F41*, *K99* genleri yönünden pozitif bant veren izolatlar belirlendi ve *E. coli* izolatları virulens genleri kapsamına göre patotiplendirildi (Franch ve ark., 1998 ve Kuhnert ve ark., 2000). Buna göre, *Stx1*, ve *Stx2* ve *eae* genlerinin biri veya birkaçı yönünden pozitif olan izolatlar (STEC), *STa*, *F41* ve *F5(K99)* genlerinin biri veya birkaçı yönünden pozitif olan izolatlar ETEC ve yalnızca *eae* pozitif olan (EPEC) olarak patotiplendirildi.

4 BULGULAR

4.1 *E. coli* O157:H7

4.1.1 Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar Ekim sonuçları

E. coli O157:H7 serotipinin varlığı, Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar besiyeri kullanıldı. *Stx1*, *Stx2* ve *eae* genlerinden biri veya birkaçı yönünden pozitif olan izolatlar (37 adet) incelendi. Sığırlardan sekiz adet, koyunlardan on adet, keçilerden onbeş adet ve köpeklerden dört adet *E.coli* izolatı söz konusu genleri taşıması sebebiyle değerlendirmeye alındı. Sonuç olarak sığırlardan dört adet (50%) ve keçilerden bir adet izolat (%6,7) sorbitol pozitif izolat bulundu. İzolatların dağılımı Tablo (10) ve Tablo (11)'de belirtilmektedir. Koyun ve köpek izolatlarının tümü sorbitol negatif bulundu.

Tablo 10: Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar pozitif örnekler

İzolat No	Lokalizasyon	Orjin	CT-SMAC sonuçları	İncelenen örnek No
84	Bursa/Yenişehir	Sığır	Pozitif	1
504	U.Ü.V.F.M	Sığır	Pozitif	2
510	U.Ü.V.F.M	Sığır	Pozitif	3
511	U.Ü.V.F.M	Sığır	Pozitif	4
379	U.Ü.V.F.M.	Keçi	Pozitif	5

#U.Ü.V.F.M: Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı

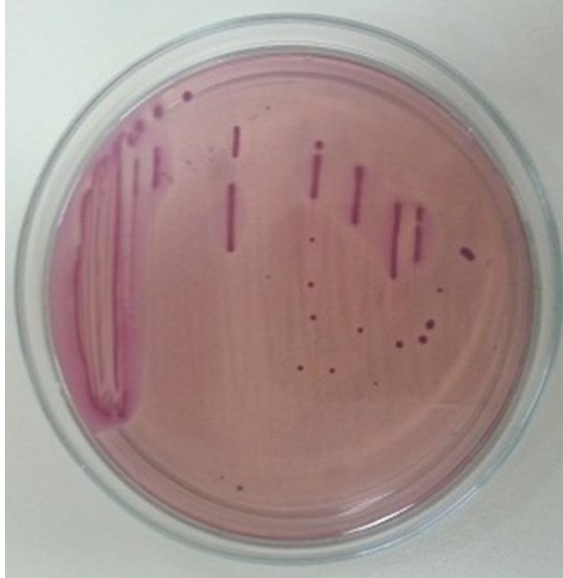
* U.Ü.A.U.M: Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma Uygulama Merkezi

Tablo 11 : Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar sonuçları

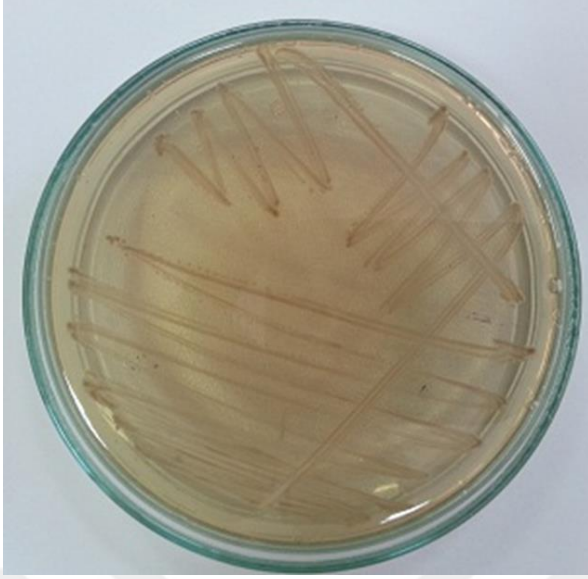
CT-SMAC	Sığır (n:8)	Koyun (n:10)	Keçi (n:15)	Köpek (n:4)
Pozitif	4 (%50)	0	1 (% 6,7)	0
Negatif	4 (%50)	10 (%100)	14 (% 93.3)	4 (%100)

4.1.2 Wellcollex *E. coli* O157:H7 Sonuçları

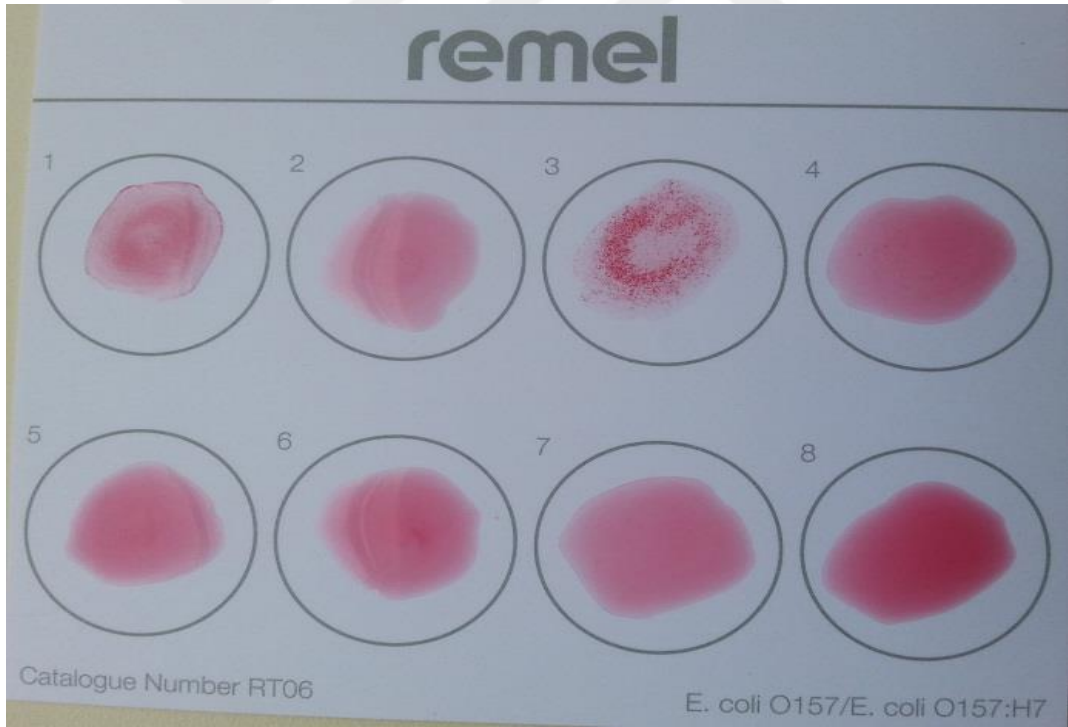
E. coli O157:H7'nin suşlarının tespiti amacıyla sorbitol negatif *E. coli* izolatları Wellcollex *E. coli* O157:H7 aglütinasyon kiti ile test edildi. Wellcollex *E. coli* tarafından test edilen tüm izolatlarının sorbitolü fermente ettiği ve sonuçların tüm izolatlar için negatif olduğu saptandı (Şekil 3).



Şekil 1: Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar'da sorbitol pozitif *E. coli*



Şekil 2: Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar'da sorbitol negatif *E. coli*



Şekil 3: Wellcollex *E. coli* O157:H7

1 ve 3 no'lu antijen aglütinasyon pozitif *E. coli* O157:H7.
2 no'lu antijen aglütinasyon negatif *E. coli* O157:H7
4- 84, 5- 504, 6- 510, 7- 511, 8- 397

4.2 Multipleks PCR Sonuçları

Multipleks PCR yöntemi ile, 111 adet sığır, 25 adet koyun, 45 adet keçi, 4 adet at, 13 adet kedi ve 35 adet köpek olmak üzere toplam 233 adet *E.coli* izolatu incelendi. Tüm izolatlar dikkate alındığında *Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *STa* gen sırasıyla %11,1; %7,3; %5,2 ve %1,7 olarak saptandı. İzolatlardan *F41* ve *K99* saptanmadı. Sığır izolatlarının 9'unda (%8,1), koyun izolatlarının 13'ünde (%52), keçi izolatlarının 15'inde (%33,3) ve köpek izolatlarının 4'ünde (%11,4) diarejenik *E. coli* varlığının göstergesi olan virulens genleri tanımlandı. At ve kedilere ait *E. coli* izolatlarında virulens genleri tespit edilmedi Tablo (12) ve Tablo (13).

Tablo 12: Sığır, koyun, keçi, at, kedi ve köpeklere ait izolatlardan elde edilen *E. coli* virulens genlerinin dağılımları

İncelenen Örnek No	İzolat No	Lokalizasyon	Orjin	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>eae</i>	<i>STa</i>	F41	F5 (K99)
1	323	U.Ü.V.F.M	Sığır			+			
2	92	Bursa/Yenişehir	Sığır	+		+			
3	101	Bursa/Yenişehir	Sığır				+		
4	152	Bursa/Karacabey	Sığır	+	+	+			
5	153	Bursa/Karacabey	Sığır	+	+	+			
6	165	Bursa/Karacabey	Sığır	+	+	+			
7	167	Bursa/Karacabey	Sığır	+	+	+			
8	200	Bursa/Nilüfer	Sığır	+	+	+			
9	205	Bursa/Nilüfer	Sığır	+	+	+			
10	210	U.Ü.A.U.M	Koyun	+	+				
11	212	U.Ü.A.U.M	Koyun		+				
12	214	U.Ü.A.U.M	Koyun				+		
13	217	U.Ü.A.U.M	Koyun				+		
14	219	U.Ü.A.U.M	Koyun	+					
15	221	U.Ü.A.U.M	Koyun		+				
16	222	U.Ü.A.U.M	Koyun	+					
17	223	U.Ü.A.U.M	Koyun	+					

18	225	U.Ü.A.U.M	Koyun		+				
19	230	U.Ü.A.U.M	Koyun				+		
20	328	U.Ü.V.F.M	Koyun	+	+				
21	372	U.Ü.V.F.M	Koyun	+	+				
22	376	U.Ü.V.F.M	Koyun	+					
23	248	U.Ü.A.U.M	Keçi	+	+				
24	249	U.Ü.A.U.M	Keçi	+					
25	253	U.Ü.A.U.M	Keçi	+					
26	254	U.Ü.A.U.M	Keçi		+				
27	255	U.Ü.A.U.M	Keçi	+					
28	256	U.Ü.A.U.M	Keçi	+					
29	263	U.Ü.A.U.M	Keçi	+					
30	267	U.Ü.A.U.M	Keçi		+				
31	269	U.Ü.A.U.M	Keçi	+					
32	273	U.Ü.A.U.M	Keçi	+					
33	274	U.Ü.A.U.M	Keçi		+				
34	279	U.Ü.A.U.M	Keçi	+					
35	283	U.Ü.A.U.M	Keçi	+					
36	288	U.Ü.A.U.M	Keçi	+					
37	379	U.Ü.V.F.M	Keçi	+	+				
38	419	U.Ü.V.F.M	Köpek			+			
39	445	U.Ü.V.F.M	Köpek			+			
40	447	U.Ü.V.F.M	Köpek			+			
41	448	U.Ü.V.F.M	Köpek			+			
Toplam				26(%11,1)	17(%7,3)	12 (%5,2)	4 (%1,7)	0	0

Tablo 13: Sığır, koyun, keçi, at, kedi ve köpeklere ait izolatlardan elde edilen *E. coli* virulens genleri dağılımları ve oranları

Virulens genleri	Sığır (n:111)	Koyun (n:25)	Keçi (45)	At (4)	Kedi (13)	Köpek (35)	Toplam (n:233)
<i>Stx1</i>	7 (%6,3)	7 (% 28)	12(%26,7)	0	0	0	26(%11,1)
<i>Stx2</i>	6 (%5,4)	6 (%24)	5 (% 11,1)	0	0	0	17 (%7,3)
<i>eae</i>	8 (%7,2)	0	0	0	0	4 (%11,4)	12 (% 5,2)
<i>STa</i>	1 (%0,9)	3 (% 12)	0	0	0	0	4 (% 1,7)
F5 (K99)	0	0	0	0	0	0	0
F41	0	0	0	0	0	0	0
Toplam	22(%19,8)	16 (%64)	17(%37,8)	0	0	4(%11,4)	59(%25,3)

4.2.1 Sığırlardan elde edilen *E. coli* izolatlarının multipleks PCR sonuçları

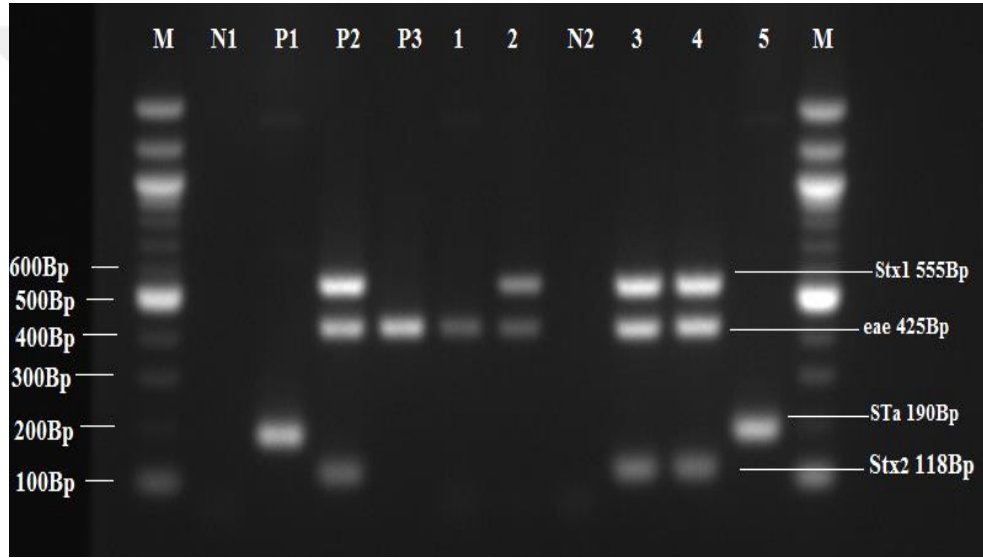
Toplam 111 adet sığır kökenli *E. coli* izolatının 6 adedi (%5,4) *Stx1*, *eae* ve *Stx2* genlerini birarada, 1 adedi (%0,9) *Stx1* ve *eae* genlerini birlikte taşıırken, 1 adedi (%0,9) *STa* geni ve 1 adedi (%0,9) *eae* genini taşıyordu (Tablo 14).

Tablo 14: Virulens genlerinin varlığına göre sığırlardan izole edilen *E. coli* patotipleri

Virulens genleri	Patotipler	Sığırlara ait <i>E. coli</i> izolatları (n:111)	%
<i>Stx1 + eae + Stx2</i>	STEC	6	5,4
<i>Stx1 + eae</i>	STEC	1	0,9
<i>STa</i>	ETEC	1	0,9
<i>eae</i>	EPEC	1	0,9
Toplam		9	8,1

Tablo 15: Virulens genlerinin (Ergin/Genç/Gastroenteritisli/Sağlıklı) varlığına göre sığırlardan izole edilen *E. coli* virulens genleri

Virulens genleri	Sığır (n:111)	Ergin	Genç	Gastroenteritisli	Sağlıklı
<i>Stx1</i>	7 (%6,3)	0	7	3	4
<i>Stx2</i>	6 (%5,4)	0	6	2	4
<i>eae</i>	8 (%7,2)	1	7	4	4
<i>STa</i>	1 (%0,9)	0	1	1	0
<i>F41</i>	0	0	0	0	0
<i>F5(K99)</i>	0	0	0	0	0



Şekil 4: Sığırlara ait izolatlardan elde edilen *E. coli* virulens genlerinin multipleks PCR görüntüsü

M- Marker 100 Bp, **N1-** Negatif Kontrol (ATCC 25922), **P1-** Pozitif kontrol (E5763), **P2-** Pozitif kontrol (ATCC 35150), **P3-** Pozitif kontrol (ATCC 43887), **1-** 323 *eae*, **2-** 92 *Stx1+eae*, **N2-** Negatif Kontrol (Su), **3-** *Stx1+Stx2+eae*, **4-** *Stx1+Stx2+eae*, **5-** *STa*, **M-** Marker 100 Bp

4.2.2 Koyunlardan elde edilen *E. coli* izolatlarının multipleks PCR sonuçları

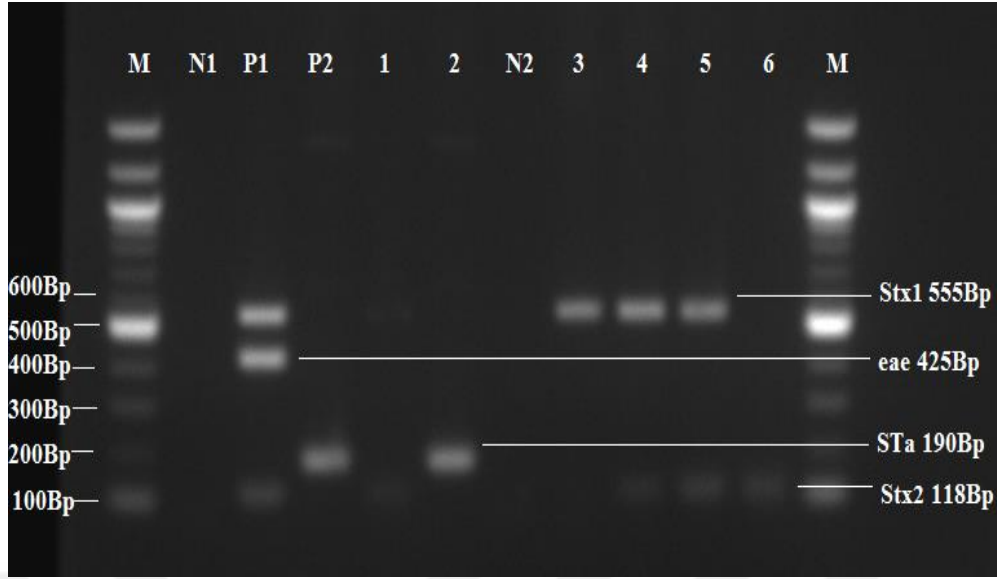
Toplam 25 adet koyun kökenli *E. coli* izolatının 3 (%12) adedi *Stx1* ve *Stx2* genlerini birlikte taşıırken, 4 (%16) adedi *Stx1*, 3 (% 12) adedi *Stx2* ve 3 (%12) adedi *STa* genlerini taşıyordu (Tablo 16).

Tablo 16: Virülens genlerinin varlığına göre koyunlardan izole edilen *E. coli* patotipleri

Virülans genleri	Patotipler	Koyunlara ait <i>E. coli</i> izolatları (n:25)	%
<i>Stx1</i>	STEC	4	16
<i>Stx2</i>	STEC	3	12
<i>Stx1 + Stx2</i>	STEC	3	12
<i>STa</i>	ETEC	3	12
Toplam		13	52

Tablo 17: Virülens genlerinin (Ergin/Genç/Gastroenteritisli/Sağlıklı) varlığına göre koyunardan izole edilen *E. coli* virülens genleri

Virülens genleri	Koyun (n:25)	Ergin	Genç	Gastroenteritisli	Sağlıklı
<i>Stx1</i>	7 (%28)	7	0	3	4
<i>Stx2</i>	6 (%24)	6	0	2	4
<i>eae</i>	0	0	0	0	0
<i>STa</i>	3 (%12)	3	0	0	3
<i>F41</i>	0	0	0	0	0
<i>F5(K99)</i>	0	0	0	0	0



Şekil 5: Koyunlara ait izolatlardan elde edilen *E. coli* virulens genlerinin multipleks PCR görüntüsü

M- Marker 100 Bp, **N1-** Negatif Kontrol (ATCC 25922), **P1-** Pozitif kontrol (ATCC 35150), **P2-** Pozitif kontrol (E5763), **1-** 210 *Stx1+Stx2*, **2-** 214 *STa*, **N2-** Negatif Kontrol (Su), **3-** 219 *Stx1*, **4-** 328 *Stx1+Stx2*, **5-** 372- *Stx1+Stx2*, **6-** 221 *Stx2*, **M-** Marker 100 Bp

4.2.3 Keçilerden elde edilen *E. coli* izolatlarının multipleks PCR sonuçları

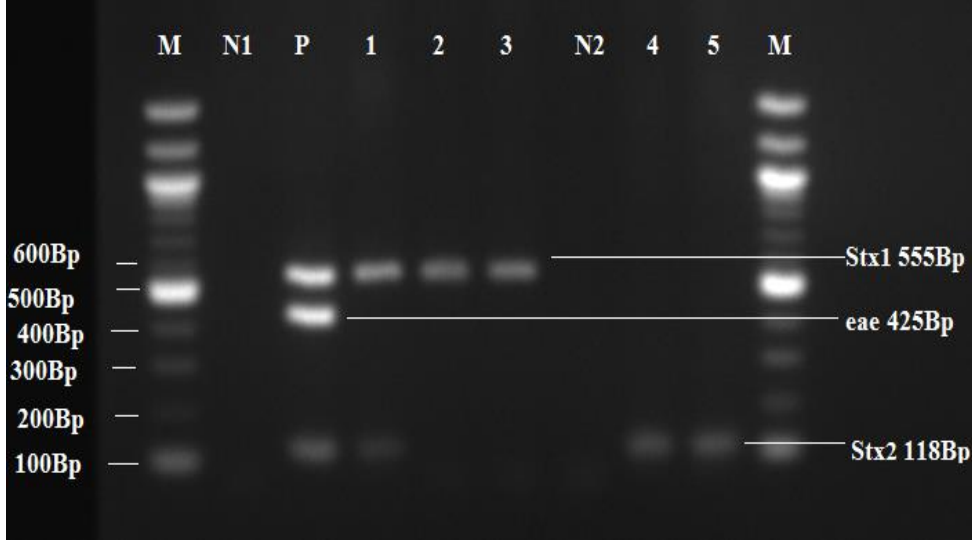
Keçi kökenli toplam 45 adet *E. coli* izolatının 2 adedi (% 4,4) *Stx1* ve *Stx2* genlerini birlikte taşıırken, 10 adedi (%22,2) sadece *Stx1*, 3 adedi de (%6,7) sadece *Stx2* genini taşıyordu (Tablo 18).

Tablo 18: Virulens genlerinin varlığına göre keçilerden izole edilen *E. coli* patotipleri

Virulens genleri	Patotipler	Keçilere ait <i>E.coli</i> izolatları (n:45)	%
<i>Stx1</i>	STEC	10	22,2
<i>Stx2</i>	STEC	3	6,7
<i>Stx1 + Stx2</i>	STEC	2	4,4
Toplam		15	33,3

Tablo 19: Virulens genlerinin (Ergin/Genç/Gastroenteritisli/Sağlıklı) varlığına göre Keçilerden izole edilen *E. coli* virulens genleri

Virulens genleri	Keçi (n:45)	Ergin	Genç	Gastroenteritisli	Sağlıklı
<i>Stx1</i>	12 (%26,7)	12	0	1	11
<i>Stx2</i>	5 (%11,1)	5	0	1	4
<i>eae</i>	0	0	0	0	0
<i>STa</i>	0	0	0	0	0
<i>F41</i>	0	0	0	0	0
<i>F5(K99)</i>	0	0	0	0	0



Şekil 6: Keçilere ait izolatlardan elde edilen *E. coli* virulens genlerinin multipleks PCR görüntüsü

M- Marker 100 Bp, **N1-** Negatif Kontrol (ATCC 25922), **P-** Pozitif kontrol (ATCC 35150), **1-** 248 *Stx1+Stx2*, **2-** 249 *Stx1*, **3-** 253 *Stx1*, **N2-** Negatif Kontrol (Su), **4-** 254 *Stx2*, **5-** *Stx2*, **M-** Marker 100 Bp

4.2.4 Köpeklerden elde edilen *E. coli* izolatlarının multipleks PCR sonuçları

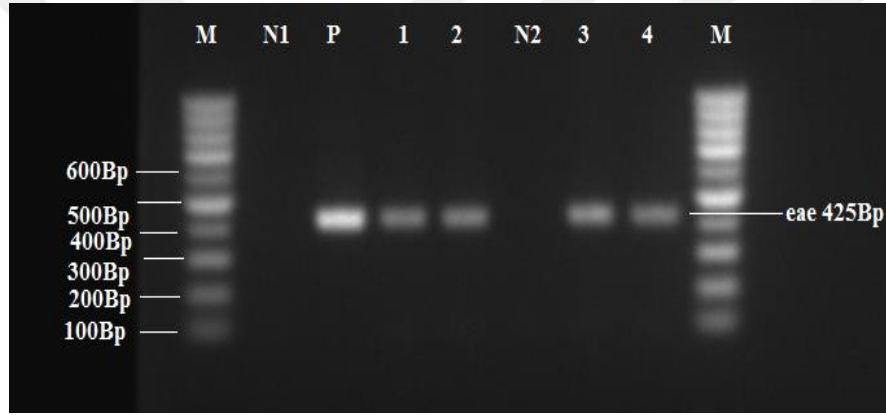
Toplam 35 adet köpek kökenli *E. coli* izolatının 4 adedi (%11,4) sadece *eae* genini taşıyordu (Tablo 20).

Tablo 20: Virulens genlerinin varlığına göre köpeklerden izole edilen *E. coli* patotipleri

Virulens genleri	Patotipler	Köpeklere ait <i>E.coli</i> izolatları (n:35)	%
<i>eae</i>	EPEC	4	11,4

Tablo 21: Virulens genlerinin (Ergin/Genç/Gastroenteritisli/Sağlıklı) varlığına göre köpeklerden izole edilen *E. coli* virulens genleri

Virulens genleri	Köpek (n:35)	Ergin	Genç	Gastroenteritisli	Sağlıklı
<i>Stx1</i>	0	0	0	0	0
<i>Stx2</i>	0	0	0	0	0
<i>eae</i>	4 (% 11,4)	4	0	0	4
<i>STa</i>	0	0	0	0	0
<i>F41</i>	0	0	0	0	0
<i>F5(K99)</i>	0	0	0	0	0



Şekil 7: Köpeklere ait izolatlardan elde edilen *E. coli* virulens genlerinin multipleks PCR görüntüsü

M- Marker 100 Bp, **N1-** Negatif Kontrol (ATCC 25922), **P-** Pozitif kontrol (ATCC 43887), **1-** 419 *eae*, **2-** 445 *eae*, **N2-** Negatif Kontrol (Su), **3-** 447 *eae*, **4-** 448 *eae*, **M-** Marker 100 Bp

4.2.5. Kedilerden elde edilen *E. coli* izolatlarının multipleks PCR sonuçları

Toplam 13 adet kedi kökenli *E. coli* izolatında incelenen virulens geni saptanmadı.

4.2.6 Atlardan elde edilen *E. coli* izolatlarının multipleks PCR sonuçları

Toplam 4 adet at kökenli *E. coli* izolatında incelenen virulens geni saptanmadı.

4.2.7 Virulens genleri dağılımı dikkate alınarak izolatların patotiplendirilme sonucu

Virulens genleri dağılımı dikkate alınarak izolatlar patotiplendirildiğinde, sığır, koyun ve keçilerde diarejenik *E. coli* varlığının göstergesi olan virulens genlerinin oranları sırası ile; Shiga toksijenik *E. coli* (STEC) %7,2, %40 ve %33,3; Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) %0,9, %12 ve %0 idi. Sığır ve köpeklerde Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) sırasıyla 1 (%0,9) ve 4 (%11,4) adet olarak saptanırken koyun, keçi, at ve kedilerde EPEC saptanmadı. At ve kedilerde diarejenik *E. coli* saptanmadı (Tablo 22).

Tablo 22: *E. coli* patotiplerinin ilgili virulens genlerinin varlığına göre hayvanlardaki dağılım oranı

Diarejenik <i>E. coli</i> patotipleri	Sığır (n:111)	Koyun (n:25)	Keçi (n:45)	At (n:4)	Kedi (n:13)	Köpek (n:35)	Toplam (n:233)
STEC	7 (%6,3)	10 (%40)	15 (%33,3)	0	0	0	32 (%13,7)
ETEC	1 (%0,9)	3 (%12)	0	0	0	0	4 (%1,7)
EPEC	1 (%0,9)	0	0	0	0	4 (%11,4)	5 (%2,1)
Toplam	9 (%8,1)	13 (%52)	15 (%33,3)	0	0	4 (%11,4)	41 (%17,6)

5 TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1 Tartışma

Patojenik *E. coli* kaynaklı hayvan ve insan infeksiyonları dünya çapında yaygın olarak görülmektedir ve salgınlara yol açmaktadır (Aslani ve ark., 2008; Gyles 2007; Kaper ve ark., 2004; Kosek ve ark., 2003 ve Pitout 2012). İnsanlarda oldukça şiddetli infeksiyonlara yol açan Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC)'nin O157:H7 serotipi özellikle son yıllarda adından sıklıkla bahsedilen gıda kaynaklı bir patojen olarak bilinmektedir. 2006-2017 yılları arasında CDC, *E. coli* kaynaklı birçok salgın bildirmiştir ve bu salgınlardan sorumlu serotipler O157:H7, O121, O26 ve O145, O104 olarak tanımlanmışlardır. (CDC, <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>, 2017). İlgili serotiplerin birçoğu hayvansal kaynaklı olup, bir kısmı da hayvansal dışkılarla diğer gıdaların kontaminasyonu yoluyla salgınlara neden olmuştur. İnsan ve hayvanlarda patojen olan türlerin belirlenmesi ve takip edilmesi epidemiyolojik açıdan önemlidir. Patojenik *E. coli* suşları, kromozom veya plasmidde kümeler halinde bulunan virulens faktörlerinin varlığı ile tanımlanırlar. DNA içeriğindeki büyük değişime ve farklı virulens belirleyicilerinin genomik yer dağılımındaki (Insertion sekans) farka göre, patojen *E. coli*, genellikle Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC) Verotoksijenik *E. coli* (VTEC) olarak da adlandırılırlar; kanlı diyare ve hemorajik kolite neden olabilme yetenekleri nedeniyle Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Enteropatojenik (EPEC), Enterotoksijenik (ETEC), Enteroinvasiv (EIEC), Enteroagregatif (EAEC) ve Diffüze yapışık *E. coli* (DAEC) olarak türlere ayrılır (Gyles ve Fairbrother, 2010; Kaper ve ark., 2004 ve Mainil ve Daube, 2005).

Bu tez çalışmasının amacı, Bursa ve çevre illerde farklı türdeki evcil hayvanlardan elde edilen *E. coli* izolatlarında virulens genlerinin varlığı saptamaktır. Çalışma, bilinen baz ağırlığındaki DNA'nın multipleks PCR yöntemiyle araştırılması ve *Stx1*, *Stx2*, *eae*, *STa*, *F41*, *K99* genlerinden birini veya birkaçını taşıyan *E. coli* suşlarının virulens özelliklerinin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Multipleks PCR yöntemi ile bazı hayvan türlerinde ilgili genlerin saptanması üzerine çeşitli raporlar yayınlanmıştır (Paton ve Paton, 1998 ve Fagan ve ark., 1999). Bu çalışmada, *E. coli*

izolatlarının %17,6'sında (41/233) patojenik *E. coli* varlığına işaret eden en az bir adet virulens geni saptanmıştır. Sonuçlar, Türkiye'de evcil hayvanlarda zoonoz olabilen virulent *E. coli*'nin yaygın olduğunu göstermektedir. Çalışma kapsamında, 9 adet sığır (%8,1), 13 adet koyun (%52), 15 adet keçi (%33,3) ve 4 adet (%11,4) köpekte patojenik *E. coli* varlığına işaret eden virulens genleri tespit edilmiştir. Çalışmada, *Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *STa* genleri pozitif olan izolatların oranları ise sırasıyla %11,1; %7,3; %5,2 ve %1,7 olarak saptanmıştır. Ayrıca tüm *E. coli* izolatlarından %18,4 oranında Shiga toksin geni (*Stx*) tespit edilmiştir. Holland ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, hayvansal *E. coli* izolatları arasında *Stx* geninin yüksek prevalans gösterdiğini bildirmiştir.

Son yıllarda Türkiye'de ve dünyada *E. coli* patotipleri, serotiplendirmede yaşanan çeşitli zorluklar nedeniyle, taşıdıkları virulens genlerinin varlığına göre de sınıflandırılmaktadır (Joensen ve ark., 2015). Bu çalışmada serotiplendirme yapılmaksızın, *E. coli* izolatlarının taşıdıkları virulens genlerinin varlığına göre yapılan patotiplendirme sonuçları dikkat çekicidir. Çalışmada sığır, koyun, keçi, at, kedi ve köpeklerde patojenik *E. coli* varlığını gösteren virulens genleri tespit edilmiştir. Buna göre Shiga toksijenik *E. coli* (STEC) sığırlarda %6,3, koyunlarda %40, keçilerde %33,3, Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) sığırlarda %0,9, koyunlarda %12 ve Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) ise sığırlarda %0,9 ve köpeklerde %11,4 oranında saptanmıştır. At ve kedilerde ise patojenik *E. coli* tespit edilmemiştir.

Zoonoz nitelik taşıyan STEC patotipleri tüm dünyada ve Türkiye'de ruminantlarda yaygındır. Ruminantlar insanlara STEC patotipinin bulaşmasında majör rezervuardır (Blanco ve ark., 2004) ve insanlarda yol açtığı hastalıklar ve salgınlar tüm dünyada bildirilmektedir (Beutin 2006). Dünyada ve Türkiye'de yapılan çalışmalarda, araştırmacılar, hayvanlarda değişik oranlarda STEC prevalansı rapor etmiştir. Bu çalışmada STEC sığırlarda %6,3 oranında saptanmıştır. Türkiye'de yapılan bazı çalışmalarda, sığırlarda STEC prevalansı %8 ila %19,7 saptanmıştır (Aksoy ve ark., 2007 ve Gülhan 2003). Yapılan diğer çalışmalarda sığırlarda STEC prevalansı %6,5 ila %31,1 arasında saptanmıştır (Aidar-Ugrinovich ve ark., 2007; Beutin ve ark., 1993; Montenegro ve ark., 1990; Otawa ve ark., 2004; Tahamtan ve

ark., 2010 ve Zschock ve ark., 2000). Tez çalışmamızda, sığırlarda *Stx* pozitifliği %11,7 oranında saptanırken, yapılan diğer çalışmalarda *Stx* pozitifliği %8,5 ila %12,7 arasında tanımlamıştır (Leomil ve ark., 2003; Osek 2003 ve Sepehriseresht ve ark., 2009). *Stx1* ve *Stx2* Shiga toksinler arasında iki ana tür kabul edilmiştir. Bu çalışmada sığır izolatlarındaki *Stx1* oranı %6,3 olduğu ve bu durumun Galli ve ark. (2010) tarafından bildirilen oranlardan (%9,2) daha düşük bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada; sığır izolatlarında *Stx1* (%6,3), *Stx2*'den (%5,4) daha yüksek oranda tespit edildi. Sonuçlar, Leomil ve ark. (2003) ve Krause ve ark. (2005)'nin yaptıkları bir çalışmayla benzerlik göstermektedir ki ilgili çalışmada *Stx1*'in, sığır STEC izolatları tarafından taşınan baskın *Stx* türü olduğunu bildirmiştir. Tez çalışmamızda tüm izolatlarda *Stx1* geni 26 adet (%11,1) ve *Stx2* 17 adet (%7,3) saptanmıştır ancak ilgili genler tek başına, 1 adet *Stx1* dışında birlikte izole edilmemiştir. Bu durum Yılmaz ve ark. (2006)'nın bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Galli ve ark. (2010) sığır izolatlarında sırayla, *Stx1* (%9,2), *Stx1/Stx2* (%26,8) ve *Stx2* (%64) genlerini tespit etmiştir. Güler ve ark. (2008), buzağılardan izole edilen *E. coli*'lerde 18 adet *eae*, 8 adet *Stx1* ve 5 adet *Stx2* genini tek başına veya kombinasyon halinde saptamıştır. Bu durum, Shiga toksinden sorumlu virulens genlerinin farklı bakteriyofajlar tarafından aktarımı sözkonusu olması nedeniyle şekillenmiş olabilir. *E. coli*'nin kromozomal mimarisi transposable elementlerin giriş ve çıkışlarıyla beklenmedik çeşitlilik gösterebilmektedir. *Stx1*'in ediniminin *Stx2*'den farklı olarak çoklu eksojen faktörlerin (antibakteriyel direnç vb.) dikkate alınmasını zorunlu kılan çok adımlı bir süreç olabileceği düşünülmektedir.

Sığır STEC patotipi ile beraber *eae* gen virulens belirteçlerinin (marker) insanlarda Attaching/Effacing (A/E) lezyonlarını indükleyebildiği ve bunun da ciddi infeksiyonlara yol açtığı bildirilmiştir (Boerlin ve ark., 1999). Ayrıca, Barrett ve ark. (1992) *eae* geninin, insanlarda STEC'in virulensinin ortaya çıkmasında gerekli olabileceğini belirtmektedir. Bu nedenle, *eae* geninin STEC patojenitesini belirlemede önemli rol oynayabildiği düşünülmektedir (Nataro ve Kaper, 1998). Tez çalışmamızda, 111 adet sığır izolatında 8 adet (%7,2) ve 35 adet köpek izolatında ise 4 adet (%11,4) *eae* geni saptanmıştır. Bu çalışmada tüm izolatlardan saptanan STEC suşlarında belirlenen *eae* gen oranı %21,9'dur. Bu sonuç, Cobbold ve Desmarchelier

(2001)'in %0,8 olan sonucu ile karşılaştırıldığında dramatik olarak yüksek ve Leomil ve ark. (2003)'ün %41,6 oranı ile karşılaştırıldığında ise daha düşük olarak tanımlanabilir. İshalli sığırlardan izole edilen STEC'nin sağlıklı sığırlardan elde edilen izolatlara göre *eae* genini daha sık taşıdığı gösterilmiştir (Pohl ve ark., 1991). Çalışmamız bulgularına göre sığır izolatlarından elde edilen *Stx1+eae+Stx2* genlerini birlikte taşıyan 6 adet izolatın 4 adedi sağlıklı ve genç hayvanlardan, 2 adedi ise gastroenteritisli genç hayvanlardan izole edilmiştir. Tez çalışmamızın sonuçları sağlıklı görünen ruminantlarda, STEC varlığını gösteren virulens gen taşıyıcılığı gastroenteritisli hayvanlardan daha yüksek olduğu ve hayvanın kondüsyonu, yaşı ve sağlık durumu düşünülmesizin sağlıklı ve genç hayvanların da STEC için rezervuar olabileceğini ortaya çıkarmıştır.

Çalışmalarda koyunlarda STEC saçılım oranının yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Kudva ve ark., 1997; Sidjabat-Tambunan ve Bensink 1997). Tez çalışmamızda, koyunlarda STEC prevalansının (%40) sığır izolatlarından saptanan orandan dikkat çekici biçimde daha yüksek (%6,3) olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, bazı çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir (Aksoy ve ark., 2007; Beutin ve ark., 1993; Beutin ve ark., 1997; Gülhan 2003 ve Zschock ve ark., 2000). Tez çalışmamızda, sonuçlara göre STEC varlığını gösteren virulens gen taşıyıcılığı koyunlarda %40 keçilerde ise %33,3 oranlarında saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada, STEC'in küçükbaş ruminantlarda saçılımı yaş ve mevsime bağlı olduğu gösterildi. Genç yaştaki hayvanlarda STEC'in prevalansının yaşlı hayvanlara göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (Battisti ve ark., 2006 ve Cortes ve ark., 2005). Tez çalışmamızda, çalışma sonuçlarından farklı olarak koyun ve keçilerden elde edilen STEC izolatları ağırlıklı olarak sağlıklı ve ergin hayvanlardan saptanmıştır. Dünyada rapor edilmiş farklı çalışmalarda koyunlar ve keçilerde STEC varlığının belirlenmesi yönünden çeşitli sonuçlar elde edilmiştir (Beutin ve ark., 1993; Cortes ve ark., 2005; Ferreira ve ark., 2015; Fegan ve Desmarchelier, 1999; Kudva ve ark., 1997; Schilling ve ark., 2012; Vettorato ve ark., 2003; Vu-Khac ve Cornick, 2008 ve Zschock ve ark., 2000). Bu sonuçlara göre STEC prevalansının koyunlarda %45 ila %100 ve keçilerde ise %36 ila %100 arasında değişen oranlarda olduğu rapor edilmiştir. Dünyada ve Türkiye'de hayvanlardaki STEC oranları benzerdir ve tez çalışması sonuçları da diğer

çalışma sonuçlarını destekler niteliktedir. Türkiye’de küçükbaş ruminantlar ile yapılan bir çalışmada *Stx1* (%37,7), *Stx2* (%18,8) ve *Stx1/Stx2* (%6,3) tespit edilmiştir (Turutoğlu ve ark., 2007). Bazı çalışmalarda, yalnızca *Stx2*’ye sahip suşların yine sadece *Stx1*’i barındıran suşlardan ve hatta *Stx1* ve *Stx2*’yi birlikte taşıyan suşlardan daha virulent olduğu saptanmıştır (Nataro ve Kaper, 1998 ve Ludwig ve ark., 2002). Bu çalışmada, sadece *Stx2* genine sahip olan patojen izolatlar 3 adet koyun ve 3 adet keçide tespit edilmiştir. Türkiye’de koyun ve keçiler beslenmede önemli bir protein kaynağıdır. Bu nedenle *Stx2*’in Türkiye’de koyun ve keçi popülasyonundan izole edilen patojenik *E. coli*’ler arasında yaygın olabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, hayvanlardaki *Stx* pozitif *E. coli* yaygınlığının, insanlarda HUS infeksiyonu riskini arttırabileceği öngörülmektedir. STEC, insanlarda, Hemorajik Kolit (HC) ve Hemorajik Üremik Sendrom (HUS) gibi ciddi hastalıklara neden olabilmektedir (Karmali 1989). Bu patojenlerden kaynaklanan insan infeksiyonları, genellikle et ve pastörize edilmemiş süt gibi kontamine olmuş gıda maddelerinin tüketilmesinden kaynaklanmaktadır (Dorn 1988; Karmali 1989 ve Salmon ve ark., 1989). Tez çalışmamızın sonuçları, koyun ve keçilerin de önemli birer STEC taşıyıcısı olabilecekleri ve Türkiye’de zoonotik STEC patotipi yönünden halk sağlığı için ciddi tehdit oluşturabileceğini ortaya koymaktadır.

Atlarda ishal ile ilişkili *E. coli* suşları hakkında literatür bilgisi sınırlıdır. Tez çalışmamızda, at izolatlarında *E. coli* virulens genlerinden hiçbiri tespit edilmemiştir. Benzer şekilde, Liberatore ve ark. (2007)’nin sonuçlarına göre, atlardan izole edilen *E. coli* suşunun çeşitli *E. coli* patotiplerinin virulens genlerinin varlığı araştırılmış ve hepsi negatif bulunmuştur. Ayrıca, Van Duijkeren ve ark. (2000)’nin yaptığı bir çalışmada, at izolatlarında *Stx2*, *eae*, *F41* ve *STa* tespit edilmemiştir. Çalışmamızdan farklı olarak, Koochakzadeh ve ark., (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, atlardan non-sorbitol fermente *E. coli* izole edilmiş ve bunun yanısıra, Holland ve ark. (1996) taylarda ishalleri dışkılarından elde ettikleri *E. coli* suşlarının *Stx1*, *Stx2* ve *eae* genlerini barındırdığını bildirmiştir. Hemolitik *E. coli*’nin sağlıklı tayların dışkılarına kıyasla ishalleri tayların dışkılarında daha yüksek sayılarda mevcut olduğu görülmüştür (Holland ve ark.,1996). Bu farklılık, tez çalışmamızda kullanılan sağlıklı atlardan elde

edilmiş olması ve çalışmamızda atlarda materyal sayısının düşük olması ile açıklanabilir.

Tez çalışmamızda, PCR sonuçlarına göre evde beslenen kedi ve köpeklerde STEC patotipini tanımlayacak gen bölgelerine rastlanılmadı. Kedi ve köpeklerde STEC infeksiyonu, insanlardaki gibi HUS'a neden olabilmektedir. Bu yönüyle ilgili patotip, pet hayvanları ile insanlar arasında zoonotik öneme sahiptir.

E. coli O157:H7, STEC serotipidir ve halk sağlığı için çok önemli enterik patojendir (Cagney ve ark., 2004). Birçok ülkede çiftlik hayvanlarında *E. coli* O157'nin varlığı bildirilmiştir (Bonardi ve ark., 1999; Chapman ve ark., 2001; ve Osek ve Winiarczyk, 2001). Türkiye'de hayvanlarda *E. coli* O157 serotipini araştıran bazı çalışmalar bulunmaktadır (Aksoy ve ark., 2005; Aslantaş ve ark., 2006; Çabalar ve ark., 2001; Inat ve Siriken 2010 ve Yılmaz ve ark., 2006). Tez çalışmamızda Sefiksim Tellürit Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar'da saptanan 5 adet sorbitol fermente etmeyen koloniden 4'ünün (%50) sığırlara ve 1'inin (%6,7) keçilere ait olduğu ve *E. coli* O157:H7 varlığının konfirmasyonu amacıyla yapılan Wellcollex *E. coli* (Remel®) testinde ise tüm izolatların O157:H7 yönünden negatif olduğu sonucuna varıldı. Bu bulgular, bazı araştırmalarla (Güler ve ark., 2008; Leomil ve ark., 2003 ve Osek ve Winiarczyk 2001) benzer sonuçlar göstermektedir. Türkiye'de, sığırlarda yapılan çalışmalarda *E. coli* O157 veya *E. coli* O157:H'nin prevalansı %0 ila %13,6 değerleri arasında ortaya konulmuştur (Aksoy ve ark., 2005; Aslantaş ve ark., 2006; Çabalar ve ark., 2001; Çiçek ve Savaşan, 2010; Güler ve ark., 2008; Gun ve ark., 2003 ve Yılmaz ve ark., 2006). Tez çalışmamızda, izolatların hiçbirinde O157:H7 suşu saptanmadı. Bunun yanısıra, sığırlarda *Stx1+eae+Stx2* birarada yüksek oranda tespit edildi. Çalışmada O157:H7 serotipi saptanmamış olması, izolatların diğer shigatoxin üreten ancak O157:H7 olmayan serotiplerinin olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca izolasyon prosedürlerinden selektif zenginleştirme protokolü ve immünomanyetik seperasyon tekniği kullanılmamıştır. Farklı serotiplerin saptanmasında yapılacak ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

EPEC bebeklerde ve yenidoğan çiftlik hayvanlarında, tavşanlarda ve köpeklerde önemli bir gastro-enteritis nedeni olarak bilinmektedir (Holland ve ark.,

1990). Bir çalışmada intimin'in EPEC'in en önemli virulens faktörü olduğu gösterilmiştir (Nataro ve Kaper, 1998). Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)'nin patogeneğinde, Attaching/Effacing (A/E) lezyonlarının oluşumu, enterositlere bakterilerin bağlanmasında önemlidir. Bu bağlanma *eae* geni tarafından kodlanan yapışkan bir intimin molekülü tarafından oluşturulur (Nataro ve Kaper, 1998). *eae* geninin saptanması, *E. coli*'de A/E patojenisitesinin varlığı için işaret olarak kabul edilmektedir (Knutton ve ark., 1991). EPEC özelliğindeki bir bakterinin A/E lezyonlarına neden olması için ise *eae* geni gerekli ancak yeterli değildir (Donnenberg ve ark., 1992). Sağlıklı görünen birçok çiftlik hayvanı bundle forming pili (BFP) taşıyan ancak *stx* geni negatif özellikte atipik formda EPEC taşıyıcısıdır (Gyles ve Fairbrother, 2010). Kedi ve köpeklerde ise tipik EPEC formu gözlenmektedir. İnsanlardaki EPEC patotipleri plasmid aracılı tranposable BFP taşıyıcısıdır. Tez çalışmamızda tüm izolatlardan belirlenen *eae* gen oranı %5,2 olarak saptanmıştır. Bu sonuç önceki çalışmalarda belirlenen %1,2 ila %9,8 arasındaki oranlar ile paralellik göstermektedir (Nguyen ve ark., 2011; Yuluo ve ark., 2010 ve Zahraei Salehi ve ark., 2006). Huasai ve ark. (2012)'in bulgularına benzer olarak çalışmamızda en çok sığırlarda *eae* geni tespit edilmiş ancak koyunlarda *eae* geni tespit edilmemiştir. Tez çalışmamızda, EPEC sığırlarda %0,9 oranında tespit edilmiştir. Buna benzer olarak Holland ve ark. (1999) sığırların EPEC için önemli bir rezervuar olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, bazı araştırmacılar sığırlarda EPEC prevalansını %2,6 ila %55 arasında saptanmıştır (Badouei ve ark., 2014; Hornitzky ve ark., 2005; Orden ve ark., 1998; Singh ve ark., 2015 ve Wani ve ark., 2003). Tez çalışmamızda, 111 adet sığıra ait *E. coli* izolatından *Stx1*, *Stx2* ve *eae* genlerini birlikte taşıyan 6 adet (%5,4), *Stx1* ve *eae* genlerini taşıyan 1 adet (%0,9) ve sadece *eae* geni taşıyan 1 adet (%0,9) izolat saptanmıştır. Bu sonuçlar Türkiye'deki sığırların insan patojeni olma potansiyeline sahip EPEC taşıyıcısı olabileceğini göstermektedir.

Tez çalışmamızda, koyun ve keçilerde EPEC tespit edilmedi. Almanya'da keçilerde EPEC suşları tespit edilmediği bildirilmiştir (Krause ve ark., 2005). Yapılan bazı çalışmalarda koyunlarda EPEC prevalansı %7,7 ila %26,7 arasında (Bhat ve ark., 2008; Cookson ve ark., 2006; Wani ve ark., 2003 ve Wani ve ark., 2009), keçilerde ise %0 ila %16 arasında saptanmıştır (Cortes ve ark., 2005; De La Fuente ve ark.,

2002; Krause ve ark., 2005 ve Wani ve ark., 2006). EPEC izolatları keçi yavrularında, yer değiştiren hayvanlar ve yetişkinlere göre daha sık tespit edildi (Cortes ve ark., 2005 ve De la Fuente ve ark., 2002). EPEC izolatları, 57/187 sığır (%30,5) (40 buzağı, 12 dve ve 5 süt ineği) ve 34/132 koyun izolatından (%26) (17 ko, 11 koyun ve 6 kuzu) izole edilmiştir (Cookson ve ark., 2006). Sığırlarda yaştan dolayı önemli farklılıklar görülmüş, buzağılarda ve düvelere ait olanlar süt ineklerine göre daha yüksek bulunmuştur (Cookson ve ark., 2006). Bu alışmalar arasında EPEC prevalansındaki farklılıklar, coğrafi konum veya incelenen hayvanların yaşına bağlı olabilir.

Evde beslenen pet hayvanları tarafından sahiplerine veya onlarla yakın temaslarda bulunan insanlara fekal-oral, solunum yoluyla, ısırık ya da tırmalama veya vektörler yardımıyla zoonotik özellikteki bakterilerin iletimi söz konusudur. Son bulgular patojenik *E. coli* suşlarının evde beslenen hayvanlar ile insanlar arasındaki geçişini göstermektedir (Khakhria ve ark., 1990). Köpeklerde riner sistem infeksiyonlarına (HUS) neden olan *E. coli* suşu ile insandaki ekstraintestinal patojenik *E. coli* genetik olarak benzerdir ve insan klinik izolatlarındaki virulens genleriyle aynı karaktere sahiptir. Jerse ve ark. (1990) köpek ve kedilerden *eae* geni izole etmişlerdir. Bu genin fenotipin A/E ile bağlantılı olarak saptanması, potansiyel virulensi göstermek için yeterli kanıt sağlamaktadır (Holland ve ark.,1999). Tez alışmamızda köpeklerden elde edilen izolatlarda %11,4 oranında EPEC tespit edilmiştir. Sonuçlar, EPEC'nin köpeklerden izole edildiğini bildiren bir çalışmayla (Beutin 1999) benzerlik göstermektedir. Brezilya'da EPEC vakaları köpeklerde Enteropatojenik *E. coli* (DEPEC), kedilerde Enteropatojenik *E. coli* (CEPEC) adıyla bildirilmiştir (Morato ve ark., 2009). Tez alışmamızda elde edilen sonuçlarda, kedilerden elde edilen *E. coli* virulens genlerinin hepsi negatiftir. Bir başka çalışmada, köpek ve kedi *E. coli* izolatında STEC, EIEC ve ETEC taranmış ve çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde hiçbir izolatla ilgili patotipler saptanmamıştır (Puno-Sarmiento ve ark., 2013). ETEC köpeklerde ve kedilerde yaygınlığı düşük olmasının yanında (Nagy ve Fekete, 1999), köpeklere nazaran ETEC suşları, kedilerde daha az oranda incelenmiştir (Beutin 1999). Ayrıca, Caliman ve Marin (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, kedilerden alınan *E. coli* rneklerinin hiçbirinde *Stx1* veya *Stx2* genlerinin varlığı

saptanmamıştır. Buna karşın, Abaas ve ark. (1989) sağlıklı ve ishallerde yüksek oranda STEC izole etmiştir. Younis ve ark. (2015) tarafından yapılan başka bir çalışmada da köpek ve kedilerde *Stx2* ve *eae* genleri araştırılmış ve %20 ve %60 oranlarında tespit edilmiştir. Bu sonuçlar arasındaki fark izolatların sağlıklı veya hasta hayvanlardan izole edilmesinden kaynaklanabilir. Barınaklarda kalan ishallerde köpeklerde evde bakılanlara nazaran daha fazla EPEC ve STEC tanımlanmıştır (Sancak ve ark., 2004). Tez çalışmamızdaki köpeklere ait *E.coli* izolatlarından saptanan %11,4 oranında *eae* geni, çeşitli nedenlerle (aşılama, takip vb) üniversitemiz hastanesine getirilen sağlıklı hayvanlardan elde edilmiştir. Bu yönüyle bulgular, sağlıklı görülen köpeklerin de insanlarda ishale neden olan tipik EPEC rezervuarı olabileceği ihtimalini göstermektedir.

Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) suşları insan ve bazı hayvan türlerinde, özellikle yeni doğanlarda ishale neden olan başlıca türdür (Kwai ve Ke, 2009 ve Lopez-saucedo ve ark., 2003). ETEC türlerinin ayırımında kullanılan virulens genleri enterotoksin genleri ile barsak epitelyumuna kolonizasyonu sağlayan fimbrial adhesin genleridir. Enterotoksin üreten ETEC patotipleri ısıya dayanıklı (HS) veya dayanıksız (HL) olabilirler. *STa* geni ise HS özelliğindedir, plasmidle taşınan transpozon aracılığıyla aktarılır. *STa* geninin son yıllarda insanlarda kolon kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği saptanmıştır, enterotoksinin anti angiogenik ve antimetastazik molekül olarak kullanılması yönünde çalışmalar yapılmaktadır (Gyles ve Fairbrother, 2010).

Tez çalışmamızda, sığır izolatlarında *STa* genini taşıyan ETEC, %0,9 oranında tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, diğer araştırmacıların bildirdiği sonuçlarla paralellik %1,3 ila %3,9 göstermektedir; (Blanco ve ark., 1988; Rajkhowa ve ark., 2009 ve Salvadori ve ark., 2003). Tez çalışmamızda koyunlardan %12 oranında ETEC saptanmış ve başka çalışmalarda da bu oranın %9 ila %18,5 arasında değiştiği bildirilmiştir (Bandyopadhyay ve ark., 2011; Manzoor ve ark., 2015 ve Turkyılmaz ve ark., 2013). Tez çalışmamızda test edilen numunelerin hiçbirinde *F41* veya *F5 (K99)* genleri tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar Türkiye’de ve Dünya’da yapılan çalışmalar değerlendirdiğinde hem benzerlik hem de bazı farklılıklar göstermektedir. *K99* ve

F17'nin azalmış prevalansını, bu antijenleri içeren aşuların kullanımı ile açıklanabileceğini gösteren kanıtlar vardır (Contrepolis ve Guillimin, 1984). Tez çalışmamızda, ETEC'in düşük oranda tespit edilmesi, ETEC'lerin neden olduğu buzağı ishallerine karşı saha aşı uygulaması yapılmış olabileceği şeklinde açıklanabilir.

ETEC yaygın olarak yenidoğanlarda, süttten kesilmiş domuzlar ve yeni doğan buzağular gibi bazı hayvan türlerinde görülür (Foster ve ark., 2009; Liu ve ark., 2014 ve Duan ve ark., 2012). *F5*'in enterositlere bağlanması yaşa bağlıdır ve bu durum 12 saatten iki haftaya kadar kademeli olarak azalır. ETEC, hayatın ilk dört gününde buzağularda ishal oluşturur, büyük buzağular veya yetişkin sığırlar etkene daha dirençlidir (Foster ve ark., 2009). Daha yaşlı domuzlardan veya buzağulardan alınan bağırsak hücreleri *F5* aracılı adhesyona dirençlidir (Runnels ve ark., 1980). Aynı durum *K99* antijeni için de geçerlidir. Yüzey proteinlerin aracılık ettiği adhesyonlar, yenidoğan buzağularda ve kuzularda bolca bulunan ve *K99*'da yaşla kademeli olarak azalan glikoprotein reseptörlerinin varlığına bağlıdır (Runnels ve ark., 1980). Tez çalışmamızda *F41* ve *K99* suşlarının saptanmamasının nedeni izolatların çoğunluğunun büyük yaştaki hayvanlardan elde edilmiş olması olabilir.

Bu tez çalışmamızda, Bursa ve çevre illerde bulunan ve evcil hayvanlardan elde edilen *E. coli* izolatlarında patojen *E. coli*'lere ait virulens genlerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu zamana kadar yapılan çalışmalar ruminantlar ağırlıklı olmak üzere birkaç hayvan türüyle sınırlı kalmıştır. Çalışmamızdaki materyalimiz oldukça geniş bir varyasyonda olup, farklı hayvan türlerinin bir arada değerlendirilmesi ve yorumlanmasına imkan vermiştir. Bu yönüyle çalışmamız orijinal nitelik taşımaktadır. Çalışmamız ayrıca, insan infeksiyonlarından sorumlu patotiplerin hayvanlarda da varlığının saptanması, etkenin zoonoz karakterinin anlaşılması ve patogenezinin tanımlanması açısından önemli bilgiler vermektedir. Çalışma sonuçları, hayvanlardan elde edilen *E. coli* izolatlarında virulens faktörlerinden *Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *StA*'nın en sık tespit edilen genler olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda *F41* ve *K99* genlerine rastlanmamıştır. Sonuçlar insan beslenmesinde en önemli protein kaynağı olan ruminantların STEC, ETEC ve EPEC'in olası rezervuarları olduğunu göstermektedir.

İnsanlardaki infeksiyonlardan sorumlu *E. coli* suşlarının zoonoz nitelik taşıdığı ve insanlara etkenin bulaşması yönünden kritik kontrol noktalarının saptanmasının faydalı olacağı düşünülmektedir (Griffin ve Tauxe, 1991; Karmali 1989 ve Nataro ve Kaper, 1998). Çalışmamızda kullanılan moleküler tanı yöntemi olan ve birçok genin bir arada ve aynı anda taranmasını sağlayan Multipleks PCR yöntemi, patojenik *E. coli*'nin tanımlanmasında hızlı ve yararlı bir tanı yöntemidir. Çalışmamız, Türkiye'de hayvanlardaki virulent *E. coli* suşlarının varlığını doğrulamıştır. Daha sonra planlanacak çalışmalarda izolatların klonal analizini tanımlamak amacıyla multilokus sekans tiplendirme (MLST) ve pulsed-field jel elektroforez (PFGE) yöntemleriyle moleküler epidemiyolojik taramalarının yapılması ve Türkiye'deki hayvan popülasyonlarında patojenik *E. coli* suş haritasının çıkarılması planlanmaktadır.

5.2 Sonuç

Bu tez çalışmasında, Bursa ve çevresindeki evcil hayvan popülasyonlarından elde edilen *E.coli* izolatlarındaki virulens genlerinin prevalansının sırasıyla *Stx1* için %11,1; *Stx2* için %7,3; *eae* için %5,2; *STa* için %1,7; *F41* için %0 ve *K99* için %0 olduğu ve hayvan türleri içinde en yüksek oranda virulens geni taşıyan hayvan grubunun koyunlar olduğu saptanmıştır. Virulens genleri dağılımı dikkate alınarak izolatlar patotiplendirildiğinde ise evcil hayvanlarda zoonoz olan STEC (%13,7), ETEC (%1,7), EPEC (%2,1) patotiplerine rastlanmıştır. Multipleks PCR yönteminin *E. coli* patotiplerinin saptanmasında diagnostik laboratuvarlar için hızlı ve ekonomik bir metod olduğu sonucuna varılmıştır.

6 KAYNAKLAR

- Abaas S, Franklin A, Kuehn I et al (1989) Cytotoxin activity on Vero cells among *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in cats. American Journal of Veterinary Research 50 1294-1296.
- Abbasi P, Kargar M, Doosti A et al (2014) Characterization of Shiga-toxin producing *E.coli* (STEC) and enteropathogenic *E.coli* (EPEC) using multiplex Real-Time PCR assays for *Stx1*, *Stx2*, *eaeA*. Iranian Journal of Microbiology 6 (3): 169-174.
- Acheson DW (2000) How does *Escherichia coli* O157:H7 testing in meat compare with what we are seeing clinically?. Journal of Food Protection 63(6): 819- 821.
- Aidar-Ugrinovich L, Blanco J, Blanco M et al (2007) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. International Journal of Food Microbiology 115: 297-306. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.046
- Aksoy A, İstanbulluoğlu E, Apan TZ et al (2005) Kırıkkale ili'nde sığır ve koyun dışkılarında *Escherichia coli* O157:H7 prevalansının belirlenmesi. Veteriner Hekim Mikrobiyoloji Dergisi 5: 3-8.
- Aksoy A, Yildirim M, Kaçmaz B et al (2007) Verotoxin Production in Strains of *Escherichia coli* Isolated from Cattle and Sheep, and Their Resistance to Antibiotics. The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 31 (4): 225-231.
- Anderson MA, Whitlock JE, Harwood VJ (2006) Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes in feces of humans, cattle, and horses. Applied and Environmental Microbiology 72 (11): 6914-6922. Doi:10.1128/AEM.01029-06
- Arthur TM, Barkocy-Gallagher GA, Rivera-Betancourt M et al (2002) Prevalence and Characterization of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on Carcasses in Commercial Beef Cattle Processing Plants. Applied Environmental Microbiology 68 (10): 4847- 4852. DOI: 10.1128/AEM.68.10.4847-4852.2002
- Aslani MM, Salmanzadeh-Ahrahbi S, Ahlikani YM et al (2008) Molecular detection and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Esherichia coli* isolated from diarrheal cases. Saudi Medical Journal 29 (3): 388-392.
- Aslantaş O, Erdoğan S, Cantekin Z et al (2006) Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from Turkish cattle. Food Microbiology 106 (3): 338-342. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.005
- Aydın F, Umur Ş, Gökçe G et al (2001) Kars yöresindeki ishalleri buzağılardan bakteriyel ve praziter etkenlerin izolasyonu ve identifikasyon. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 7 (1): 7- 14.
- Aydın N, Paracikoğlu J (2006) VETERİNER MİKROBİYOLOJİ (Bakteriyel Hastalıklar). İlke- Emek Yayınları, Ankara, s: 113.
- Aydoğan S, Sünbül M, Leblebicioğlu H et al (2001) The prevalences of *Escherichia coli* O157 and *Aeromonas* species in patients with acute diarrhea. Mikrobiyoloji Bülteni 35: 525-530.
- Babacan O, Akan M, İzgür M (2011) Kedi ve köpeklerin ürogenital sistem infeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi 82(1):43-48.

Badouei MA, Lotfollahzadeh S, Arman M et al (2014) Prevalence and Resistance Profiles of Enteropathogenic and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Diarrheic Calves in Mashhad and Garmsar Districts, Iran. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection* 1(3): e22802. DOI: 10.17795/ajcmi-22802

Bandyopadhyay S, Mahanti A, Samanta I (2011) Virulence repertoire of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enterotoxigenic *Escherichiacoli* (ETEC) from diarrhoeic lambs of Arunachal Pradesh, India. *Tropical Animal Health and Production* 43 (3): 705-710. DOI: 10.1007/s11250-010-9757-1

Barett TJ, Kaper JB, Jerse AE et al (1992) Virulence factors in shiga-like toxin producing *E. coli* isolated from humans and cattle. *Journal of Infectious Disease* 165 (5): 979-980. DOI:https://doi.org/10.1093/infdis/165.5.979

Battisti A, Lovari S, Franco A et al (2006) Prevalence of *Escherichia coli* O157 in lambs at slaughter in Rome, central Italy. *Epidemiology and Infection* 134 (2): 415-419. DOI.org/10.1017/S0950268805005236

Bauerfeind R, Von Graevenitz A, Kimmig P et al (2016) Zoonoses infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans. 4th edition, ASM Press, Washington, DC USA.

Bentancor A, Rumi MV, Gentilini MV et al (2007) Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina. *FEMS Microbiology Letters* 267: 251-256. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00569.x

Bettelheim KA (1992) The genes *Escherichia*. Editors: BALOWS A, TRUPER HG, DWORKIN M et al, *The Prokaryotes*, Second Edition, Springer-Verlag KG, Berlin, German, pp 2696-2736.

Beutin L, Geier D, Steinruck H et al (1993) Prevalence and Some Properties of Verotoxin (Shiga-Like Toxin)-Producing *Escherichia coli* in Seven Different Species of Healthy Domestic Animals. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (9):2483-2488.

Beutin L, Geier D, Zimmermann S et al (1995) Virulence markers of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (3): 631-635.

Beutin L, Geier D, Zimmermann S et al (1997) Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (6): 2175-2180.

Beutin L, (1999) *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Veterinary Research* 30 (2-3): 285-298.

Beutin L (2006) Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 53: 299-305.

Bhat MA, Nishikaw Y, Wani SA (2008) Prevalence and virulence gene profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrhoeic and healthy lambs in India. *Small Ruminant Research* 75: 65-70. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2007.08.006

Blanco J, Gonzalez EA, Garcia S et al (1988) Production of toxins by *E. coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (north-western Spain). *Veterinary Microbiology* 18: 297-311.

Blanco J, Blanco M, Gonzales EA et al (1990) Comparative evaluation of three tests for the detection of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors (CNF1 and CNF2) using filtrates of cultures treated with mitomycin C. *FEMS Microbiology Letters* 69:311-316.

Blanco JE, Blanco J, Blanco M et al (1994) Serotyping of CNF1-producing *Escherichia coli* strains that cause extraintestinal infections in humans. *European Journal of Epidemiology* 10:(6) 707-711.

Blanco M, Blanco JE, Blanco J et al (1997) Distribution and characterization of faecal verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Veterinary Microbiology* 54 (3-4): 309-319. DOI.org/10.1016/S0378-1135(96)01292-8

Blanco J, Blanco M, Blanco JE et al (2001) Epidemiology of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants. Editors: DUFFY G, GARVEY P, MCDOWELL DA, Verocytotoxigenic *E. coli*. Food and Nutrition Press Inc., Trumbull, CT; pp:113-148.

Blanco M, Blanco J, Mora A et al (2003) Vero toxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products and humans. *Experimental Biology and Medicine* 228: 345-351. DOI: 10.1177/153537020322800403

Blanco M, Blanco JE, Mora A et al (2004) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 41:1351-1356. DOI: 10.1128/JCM.41.4.1351-1356.2003

Blomberg L, Cohen PS, Conway PL (1993) A study of the adhesive capacity of *E.coli* strain Bd1107/ 7508 (K88ac) in relation to growth phase. *Microbial Pathogenesis* 14 (1): 67-74. DOI: 10.1006/mpat.1993.1007

Boerlin P, Mcewen SA, Boerlin-Petzold F et al (1999) Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 487-503.

Bonardi S, Maggi E, Bottarelli A et al (1999) Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from cattle at slaughter in Italy. *Veterinary Microbiology* 67 (3): 203-211. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00039-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00039-5)

Borie CF, Monreal Z, Martinez J et al (1997) Detection and characterization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in slaughtered cattle. *Zentralbl Veterinarmed.* 44(5):273-279. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1997.tb00973.x

Boynukara (Uslanoğlu) B, Aksu Z, Gülhan T (2004) *Escherichia coli*'nin insanlarda oluşturduğu infeksiyonlar. *Veteriner Hekim Mikrobiyoloji Dergisi* 4 (1-2): 29-38.

Brandal LT, Sekse C, Lindstedt BA et al (2012) Norwegian sheep are an important reservoir for human-pathogenic *Escherichia coli* O26:H11. *Applied and Environmental Microbiology* 78(12):4083-4091. DOI: 10.1128/AEM.00186-12

Bryan A, Shapir N, Sadowsk MJ (2004) Frequency and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in Genetically Diverse, Nonselected, and Nonclinical *Escherichia coli* Strains Isolated from Diverse Human and Animal Sources. *Applied and Environmental Microbiology* 70(4): 2503-25. DOI: 10.1128/AEM.70.4

Burgess CM, Parker C, Huynh S et al (2009) Prophage gene deletion identified in verocytotoxigenic *E. coli* isolated from the Irish beef chain, An international conference organised by ProSafeBeef, March 25th to 26th 2009, Dublin, Advancing Beef Safety through Research and Innovation, p: 75.

Cagney C, Crowley H, Duffy G et al (2004) Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and beef burgers from butcher shops and supermarkets in the Republic of Ireland. *Food Microbiology* 21: 203-212. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00052-2](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00052-2)

Caliman MW, Marin JM (2014) Virulence genes in *Escherichia coli* isolated from feces and urine of cats. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 66 (4):1287-1290. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-6694>

Callaway TR., Anderson RC, Edrington TS et al (2004) What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle?. *Journal of animal science* 82 (13 E. suppl.), 93-99. DOI:10.2527/2004.8213_supplE93x

Cantey JR, Blake RK (1977) Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *Journal of Infectious Diseases* 135 (3):454-462. DOI: 10.1093/infdis/135.3.454

Chalmers RM, Salmon RL, Willshaw GA (1997) Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in a farmer handling horses. *Lancet* 349(9068):1816. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61697-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61697-2)

Chapman PA, Siddons CA, Gerdan Malo AT (1997) A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiology and Infection* 119(2): 245-25. DOI: 10.1017/S0950268897007826

Chapman PA, Cerdan-Malo AT, Ellin M et al (2001) *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. *International Journal of Food Microbiology* 64 (1-2): 139-50.

Casadevall A, Pirofski L (1999) Host-pathogen interactions: Redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity* 67: 3703-3713.

CDC (2017) Reports of Selected *E. coli* Outbreak Investigations. <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>. 10.01.2017.

CDC (2016) Multistate Outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 Infections Linked to Chipotle Mexican Grill Restaurants. <https://www.cdc.gov/ecoli/2015/o26-11-15/>. 01.02.2016.

Clark CG, Kruczkiewicz P, Guan C et al (2013) Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. *Journal of microbiological methods* 94(3):180-191. Doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.020. Epub 2013 Jun 28.

Claudia M, Using CR, Chifiriuc MC et al (2009) Genetic analysis of virulence and pathogenicity features of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with neurogenic bladder. *Romanian Biotechnological Letters* 14(6): 4900-4905.

Cobbold R, Desmarchelier P (2000) A longitudinal study of shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Veterinary Microbiology* 71 (1-2): 125-137. DOI: 10.1016/S0378-1135(99)00173-X

Cobbold R, Desmarchelier P (2001) Characterisation and clonal relationships of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. *Veterinary Microbiology* 79: 323-233. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00366-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00366-7)

Contrepois M, Guillimin P (1984) vaccination anti *Escherichia coli* K99. *Chez la cherre*. Editors: YVORE P, PERRIN G, les maladies de la cherre, INRA, Paris, pp: 473-476.

- Cookson AL, Taylor SC, Bennett J et al (2006) Serotypes and analysis of distribution of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle and sheep in the lower North Island, New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 54(2): 78-84. DOI:10.1080/00480169.2006.36616
- Cortes C, De la Fuente R, Blanco J et al (2005) Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. *Veterinary Microbiology* 110(1-2):67-76. DOI:10.1016/j.vetmic.2005.06.009
- Çabalar M, Boynukara B, Gülhan T et al (2001) Prevalence of Rota virus, *Escherichia coli* K99 and O157:H7 in healthy dairy cattle herds in Van, Turkey. *Journal of Veterinary Animal Science* 25: 191-196.
- Çiçek E, Savaşan S (2010) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 in milk and feces of cattle in Aegean Region and determination of their verotoxin. *Etlik Veteriner Mikrobiyol Dergisi* 21:51-56.
- Dağlar D, Öngüt G (2012) Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) and Identification Methods (Derleme Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) ve Tanı Yöntemleri). *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 1: 1-9.
- DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme) (2006) Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark, Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme. Technical University of Denmark. 2006. <http://www.danmap.org>.
- Da Silva GJ, Mendonca N (2012) Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence* 3(1): 18-28. DOI: 10.4161/viru.3.1.18382
- Day NP, Scotland SM, Cheasty T (1983) *Escherichia coli* O157:H7 associated with human infections in the United Kingdom. *Lancet* 1: 825.
- Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Cray WCJr et al (1997) Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infection and Immunity* 65 (5): 1842-1848.
- De Graaf FK, Klemm P, Gaastra W (1981) Purification, characterization, and partial covalent structure of the adhesive antigen K99 of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 33 (3): 877- 883.
- De la Fuente R, Garcia S, Orden JA et al (2002) Prevalence and characteristics of attaching and effacing strains of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy sheep and goats. *American journal of veterinary research* 63(2): 262-266. DOI: 10.2460/ajvr.2002.63.262
- De Rycke J, Guillot JF, Boivin R (1987) Cytotoxin in Non - Enterotoxigenic strains of *E.coli* isolated from feces of diarrheic calves. *Veterinary Microbiology* 15 (1-2): 137-150. DOI: 10.1016/0378-1135(87)90139-8
- Didelot X, Bowden R, Wilson DJ et al (2012) Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nature reviews Genetics* 13(9):601-612. DOI:10.1038/nrg3226
- Donnenberg MS, Kaper JB (1992) Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 60 (10):3953-3961.

Donnenberg MS, Tzipori S, McKee ML et al (1993) The role of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *Journal of Clinical Investigation* 92: 1418-1424. DOI: 10.1172/JCI116718

Dontorou A, Papadopoulou C, Filioussis G et al (2003) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *International Journal of Food Microbiology* 82(3): 273-9. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00313-6

Dorn CR, (1988) Hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* in people consuming undercooked beef and unpasteurized milk. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193(11): 1360- 1361.

Doyle ME, Archer J, Kaspar CW (2006) Human Illness Caused by *E. coli* O157:H7 from Food and Non-food Sources. *Communicable Disease Epidemiology* WI 53702.

Duan Q, Yao F, Zhu G (2012) Major virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs. *Annals of Microbiology* 62(1):7-14. DOI: 10.1007/s13213-011-0279-5

Dubois D, Grare M, Prere MF et al (2012) Performance of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *Journal of Clinical Microbiology* 50(8):2568-2576. Doi:10.1128/JCM.00343-12

Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM (2016) Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* 7(1). Doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0006-201

Dunn JR (2003). The epidemiology of Shiga -Toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in Louisiana dairy cattle, beef cattle and white -tailed deer, Doctorate thesis, Louisiana State University.

Dunowska M, Morley PS, Traub-Dargatz JL et al (2006) Impact of hospitalization and antimicrobial drug administration on antimicrobial susceptibility patterns of commensal *Escherichia coli* isolated from the feces of horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 228(12): 1909-19. DOI:10.2460/javma.228.12.1909

Dursun S G, Kaya O (2010) Broiler Piliçlerinden *Escherichia coli* O157:H7 Serotipinin İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarliliklerinin Belirlenmesi. *Pendik Veterinary Mikrobiyoloji Dergisi* 37 (1).

Ecker DJ, Sampath R, Massire C et al (2008) Ibis T5000: a universal biosensor approach for microbiology. *Nature Reviews Microbiology* 6: 553-558. Doi:10.1038/nrmicro1918

Eklund M, Scheutz F and Siitonen A (2001) Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2829-2834.

Erdoğan H, Erdoğan A, Levent B et al (2008) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: case report. *The Turkish Journal of Pediatrics* 50(5): 488-491.

Erol İ (2007) Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif Matbaacılık Ltd. Sti. Ankara,s: 82-93.

Escher M, Scavia G, Morabito S et al (2014) A severe foodborne outbreak of diarrhoea linked to a canteen in Italy cused by enteroinvasive *Escherichia coli*, an uncommon agent. *Epidemiology and Infection* 142(12):2559-66. DOI:10.1017/S0950268814000181

Fairbrother JM, Nadeau E. (2006) *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Scientific and Technical Review* 25(2):555-569.

FDA (Food and Drug Administration) (2008) New animal drugs; cephalosporin drugs; extralabel animal drug use; order of prohibition. Bethesda, MD: FDA. Docket No. FDA-2008-N-0326. 21 CFR Part 530.

Fegan N, Desmarchelier P (1999) Shiga toxin- production *Escherichia coli* in sheep and pre- slaughter lambs in eastern Australia. Letters in Applied Microbiology 28: 335-339. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00556.x

Feil EJ, Maiden MCJ, Achtman M et al (1999) The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. Molecular Biology and Evolution 16(11):1496-1502. DOI:https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026061

Feng PCS, Monday SR (2000) Multiplex for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. Molecular and Cellular Probes 14:333-337. DOI:10.1006/mcpr.2000.0323

Ferreira MRA, Silva TS, Stella AE et al (2015) Detection of virulence factors and antimicrobial resistance patterns in shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep. Pesquisa Veterinaria Brasileira 35 (9):775-780. DOI: 10.1590/S0100-736X201500090

Foley SL, David G, Patrick FW et al (2006) Comparison of Subtyping Methods for Differentiating Salmonella enterica Serovar Typhimurium Isolates Obtained from Food Animal Sources. Journal of Clinical Microbiology 44(10) 3569-3577. Doi:10.1128/JCM.00745-06

Foster DM, Smith GW (2009) Pathophysiology of diarrhea in calves. The Veterinary clinics of North America. Food animal practice 25(1):13-36. DOI:10.1016/j.cvfa.2008.10.013

Franck SM, Bosworth BT, Moon HW (1998) Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. Journal of Clinical Microbiology 36: 1795-1797.

Franco A, Lovari S, Cordaro G et al (2009) Prevalence and concentration of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in adult sheep at slaughter from Italy. Zoonoses Public Health 56:215-220. DOI:10.1111/j.1863-2378.2008.01188.x

Galland JC, Hyatt DR, Crupper SS et al (2001) Prevalence, antibiotic susceptibility, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from longitudinal study of beef cattle feedlots. Applied Environmental Microbiology 67: 1619-1627. DOI:10.1128/AEM.67.4.1619-1627.2001

Galli L, Miliwebsky E, Irino K et al (2010) Virulence profile comparison between LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from cattle and humans. Veterinary Microbiology 143 (2-4): 307-313. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.11.028

Garcia-Sanchez A, Sanchez R, Rubio R et al (2007) Presence of Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 in a survey of wild artiodactyls. Veterinary Microbiology 121(3-4): 373-7. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.12.012

Goffaux F, China B, Janssen L et al (2000) Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. Research in Microbiology 151 (10): 865-871. DOI: 10.1016/S0923-2508(00)01153-0

Griffin PM, Tauxe (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E.coli* and associated hemolytic uremic syndrome.

Holand RE (1990) Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical Microbiology Reviews* 3(4): 345-375. DOI: 10.1128/CMR.3.4.345

Holland RE, Schmidt A, Sriranganathan N et al (1996) Characterization of *Escherichia coli* isolated from foals. *Veterinary Microbiology* 48 (3-4): 243-55. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00162-X](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135(95)00162-X)

Holland RE, Wilson RA, Holand, MS et al (1999) Characterization of eae+ *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrhoeic calves. *Veterinary Microbiology* 66: 251-263. DOI.org/10.1016/S0378-1135(99)00013-9

Hornitzky MA, Mercieca K, Bettelheim KA et al (2005) Bovine faeces from animals with gastrointestinal infections are a source of serologically diverse atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* strains that commonly possess intimin. *Applied and Environmental Microbiology* 71(7): 3405-3412. Doi:10.1128/AEM.71.7.3405-3412.2005

Huasai S, Chen A, Wang C et al (2012) Occurrence And Characteristics Of Virulence Genes Of *Escherichia coli* Strains Isolated From Healthy Dairy Cows In Inner Mongolia, China. *Brazilian Journal of Microbiology* 43 (2): 528-534. DOI: 10.1590/S1517-83822012000200013

Inat G, Siriken B (2010) Detection of *Escherichia coli* O157 and *Escherichia coli* O157:H7 by the immunomagnetic separation technique and *Stx1* and *Stx2* genes by multiplex PCR in slaughtered cattle in Samsun Province, Turkey. *Journal of Veterinary Science* 11(4): 321-326. DOI: 10.4142/jvs.2010.11.4.321

Islam MA, Mondol AS, de Boer E et al (2008) Prevalence and genetic characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from slaughtered animals in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol* 74(17):5414-5421. Doi:10.1128/AEM.00854-08

Jacoby GA (1994) Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 13(1): 2-11.

Jacoby G, Bush K (2016) Lahey clinic page on amino acid sequence for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant beta-lactamases. <http://www.lahey.org/Studies.08.11.2016>

Jafari A, Aslani MM, Bouzari S (2012) *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 4:102-117.

Jerse AE, Yu J, Tall BD et al (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 87 (20): 7839-7843. DOI: 10.1073/pnas.87.20.7839

Joensen KG, Tetzschner AM, Iguchi A et al (2015) Rapid and Easy In Silico Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *Journal of Clinical Microbiology* 53:2410-2426. Doi:10.1128/JCM.00008-15.

Johnson JR (1991) Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infections. *Clinical microbiology reviews* 4(1): 80-128.

Johnson JR, Delavari P, Stell AL et al (2001) Molecular comparison of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of the same electrophoretic lineages from humans and domestic animals. *The Journal of Infectious Diseases* 183 (1): 154-159. DOI:<https://doi.org/10.1086/317662>

Johnson WM, Lior H, Bezanson GS (1983) Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *The Lancet* 321 (8314-8315): 76. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)91616-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(83)91616-1)

Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC et al (2015) *Manual of Clinical Microbiology*. Volume 1. 11th edition, ASM Press, Washington, DC, pp 685-697.

Kagambega A, Martikainen O, Siitonen A et al (2012) Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence genes in the feces of slaughtered cattle, chickens, and pigs in Burkina Faso. *Microbiology Open* 1(3): 276-284. DOI: 10.1002/mbo3.30

Kaleli İ, Şengül M, Özen N et al (1999) Investigation of *Escherichia coli* O157 in cases of gastroenteritis. *İnfeksiyon Dergisi* 13: 235-238.

Kang SJ, Ryu SJ, Chae JS et al (2004) Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in calves associated with diarrhoea. *Veterinary Microbiology* 98: 323- 328. DOI:10.1016/j.vetmic.2003.11.004

Kaper JB, Karmali MA (2008) The continuing evolution of a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (12): 4535-4536. DOI: 10.1073/pnas.0801435105

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2 (2): 123-140. DOI:10.1038/nrmicro818

Kaper JB, O'Brien AD (1998) *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, DC. pp:121-128.

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

Khakhria R, Duck D, Lior H (1990) Extended phagetyping scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiology and Infection* 105 (3): 51 I-520. DOI:<https://doi.org/10.1017/S0950268800048135>

Kim JY, Kim SH, Kwon NH et al (2005) Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex and RAPD. *Journal of Veterinary Sciences* 6(1): 7-19.

Kinga W, Edyta D, Jacek O (2009) Molecular characterization of pathogens identified on hide and carcass of cattle slaughtered in Poland, An international conference organized by ProSafeBeef, March 25th to 26th 2009, Dublin, Advancing Beef Safety through Research and Innovation, p: 65.

Knutton S, Phillips AD, Smith HR et al (1991) Screening for EPEC in infants with diarrhea by the fluorescent- actin staining test. *Infection and Immunity* 59(1):365-371.

Koneman EW, Alen SP, Janda WM et al (2006) *Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology*, J. B. Lippincott, Philadelphia. 6th Edition, pp: 235-269.

Koochakzadeh A, Zahraei Salehi T, Nayeri Fasaei B ve ark., (2014) Detection of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing and *eae* harboring *Escherichia coli* in some wild captive and domestic equidae and canidae. *Archives of Razi Institute* 69 (2): 157-163. DOI: 10.7508/ari.2014.02.006

Kosek M, Berne C, Guerrant RL (2003) The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull. WHO* 81: 197-204.

- Krause G, Zimmermann S, Beutin L (2005) Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types. *Veterinary Microbiology* 106: 87-95. DOI:10.1016/j.vetmic.2004.11.012
- Krogh HV (1983) Occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves with acute neonatal diarrhea. *Nordisk veterinær medicin* 35 (10): 346-352.
- Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ (1997) Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin- producing of *E. coli* serotypes isolated from sheep. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (4): 892-899.
- Kuhnert P, Boerlin P, Frey J (2000) Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 107-117.
- Kuntz TB, Kuntz ST (1999) Enterohemorrhagic *E.coli* infection. *Prim Care Update OB/GYNS* 6(6):192-196. [https://doi.org/10.1016/S1068-607X\(99\)00023-2](https://doi.org/10.1016/S1068-607X(99)00023-2)
- Kuyucuoğlu Y, Şeker E, Uğuz C et al (2011) Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from calves and cattle. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 58: 255-260.
- Kwai LT, Ke XY (2009) Multiplex PCR for simultaneous detection of virulence Genes in *Escherichia coli*. *Malaysian Journal of Science* 28:1-14.
- Lahti E, Keshimaki M, Rantala L et al (2001) Occurrence of *Escherichia coli* O157 in Finnish cattle. *Veterinary Microbiology* 79 (3): 239-251. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00355-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00355-2)
- Lai Y, Rosenshine I, Leong JM et al (2013) Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cell Microbiology* 15:1796-808. DOI:10.1111/cmi.12179
- Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P (2003) Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary Microbiology* 91(1): 73-84. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00263-8
- La Ragione RM, Best A, Woodward MJ et al (2009) *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants. *FEMS microbiology reviews* 33(2):394-410. DOI:10.1111/j.1574-6976.2008.00138.x
- Laurelle L (1889) L Etude bacteriologique sur les peritonites par perforation. *Cellule* 5: 60 -123.
- Lengacher B, Kline TR, Harpster L (2010) Low prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in horses in Ohio, USA. *Journal of Food Protection* 73:2089-2092.
- Leomil L, Aidar-Ugrinovich L, Guth BEC et al (2003) Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. *Veterinary Microbiol* 97:103-109. DOI:10.1016/j.vetmic.2003.08.002
- Levine MM (1987) *E.coli* that cause: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enterohemorrhagic and Enteroadherent, *The Journal of Infectious Diseases* 155 (3):377-389. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/155.3.377>
- Liberatore AMA, Tomita SK, Vieira MAM (2007) Expression Of Aggregative Adherence To Hela Cells By *Escherichia coli* Strains Isolated From Sick Horses. *Brazilian Journal of Microbiology* 38(1):9-13. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000100003>
- Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ (2010) A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *Journal of microbiology and biotechnology* 20(1): 5-14.

- Liu W, Yuan C, Meng X et al (2014) Frequency of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from suckling pigs with diarrhoea in China. *The Veterinary Journal* 199 (2):286-289. DOI:10.1016/j.tvjl.2013.11.019
- Lopez-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N et al (2003) Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerging infectious diseases*. 9(1):127-31. DOI:10.3201/eid0901.010507
- Ludwig K, Sarkim V, Bitzan M (2002) Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* infection and antibodies against *Stx2* and *Stx1* in household contacts of children with enteropathic hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (5): 12-17. DOI: 10.1128/JCM.40.5.1773–1782
- Machado J, Grimont F, Grimont PA (1998) Computer identification of *Escherichia coli* rRNA gene restriction patterns. *Research in Microbiology* 149 (2): 119-135. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(98\)80027-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(98)80027-2)
- Mac Kenzie FM, Gould IM (1998) Extended spectrum β -lactamases. *Journal of Infection* 36: 255-258. [https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(98\)94027-0](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(98)94027-0)
- McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS et al (1995) A genetic locus of enterocyte e^oacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 1664-1668.
- Maddox TW, Clegg PD, Diggle PJ et al (2012) Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 1: Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Equine Veterinary Journal* 44: 289-296 DOI: 10.1111/j.2042-3306.2011.00441.x
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E et al (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:3140-3145.
- Mainil J (1993) Les coli bacillooses dans l'espece bovine, *Annales de Medecine Veterinaire* 137: 343-350.
- Mainil JG, Daube G (2005) Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *Journal of Applied Microbiology* 98: 1332-1344. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02653.x
- Makino S, Kobori H, Asakura H (2000) Detection and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. *Epidemiology and Infection* 125(1):55-61. DOI: 10.1017/S0950268899004100
- Maluta RP, Fairbrother JM, Stella AE et al (2014) Potentially pathogenic *Escherichia coli* in healthy, pasture-raised sheep on farms and at the abattoir in Brazil. *Veterinary Microbiology* 169 (1-2): 89-95. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.12.013
- Manzoor R, Shah MI, Asma-ul-husna, Wani SA et al (2015) Prevalence, serodiversity and antibiogram of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in diarrhoeic calves and lambs of Kashmir valley (J&K), India. *Journal of Applied and Natural Science* 7 (1): 477 -481.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases* 5(5):607-25. DOI:10.3201/eid0505.990502

- Medina A, Horcajo P, Jurado S et al (2011) Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* strains from ruminants. *J Vet Diagn Invest*, 23 (1): 91-95. DOI:10.1177/104063871102300114
- Melton-Celsa AR, O'Brien AD (1998) Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. Editors: KAPER JB, OBRIEN AD, *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp: 121-128
- Melton-Celsa AR (2014) Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiology spectrum* 2(3):EHEC-0024-20. DOI:10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013
- Miko A, Delannoy S, Fach P et al (2013) Genotypes and virulence characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104 strain from different origins and sources. *International journal of medical microbiology* 303(8): 410-421. Doi: 10.1016/j.ijmm.2013.05.006.
- Milnes AS, Stewart I, Clifton-Hadley FA et al (2008) Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, Salmonella, thermophilic Campylobacter and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. *Epidemiology and infection* 136(6):739-751. DOI:10.1017/S0950268807009223
- Montenegro Ma, Buelte M, Trumpf T et al (1990) Detection and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (6): 1417- 1421.
- Moon HW, Nagy B, Isaacson RE et al (1977) Occurrence of K99 antigen on *Escherichia coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99+ enterotoxigenic *E. coli* from calves and pigs. *Infection and Immunity*15: 614- 620.
- Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA et al (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infection and Immunity* 41: 1340-1351.
- Morato EP, Leomil L, Beutin L et al (2009) Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. *Zoonoses Pub Health* 56(5): 229-237. DOI:10.1111/j.1863-2378.2008.01190.x
- Moreno AC, Filho AF, Gomes Tdo A (2010) Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 66(1):50-57. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2008.03.017
- Moseley SL, Echeverria P, Seriwatana J et al (1982) Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. *Journal of Infectious Diseases* 145 (6): 863-869. <https://doi.org/10.1093/infdis/145.6.863>
- Moxley RA, Smith DR (2010) Attaching-effacing *Escherichia coli* infections in cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animals Practice* 26 (1): 29-56. DOI: 10.1016/j.cvfa.2009.10.011
- Murray PR, Baron EJ, Phaller MA (1995) *Manual of Clinical Microbiology*, 6th edition. American society for microbiology, Washington, DC, pp:1482.
- Münnich A, Lübke-Becker A (2004) *Escherichia coli* infections in newborn puppiesclinical and epidemiological investigations. *Theriogenology* 62 (3-4): 562-575. DOI:10.1016/j.theriogenology.2003.11.012

- Nagy B, Fekete PZ (1999) Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Veterinary Research* 30: 259-284.
- Nakazato G, Gyles C, Ziebell K et al (2004) Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Veterinary Microbiology* 101 (4): 269-277. DOI:10.1016/j.vetmic.2004.04.009
- Nakazawa M and Kai A (1994) Properties of verocytotoxin producing *Escherichia coli* of bovine origin in Japan. *The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases* 68 (11): 1437-1439.
- Nandy RK, Barari SK, Ghose AC (1994) Expression of antigenically distinct fimbriae with hemagglutination and Hela cell adherence properties by an enteroaggregative *E.coli* strain belonging to the enteropathogenic serogroup, FEMS Immunology and Medical Microbiology 9 (2): 143-150. DOI: 10.1111/j.1574-695X.1994.tb00485.x
- Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clinical Microbiology Reviews* 11 (1): 142-201.
- Nataro JP, Levine MM (1994) *Escherichia coli* diseases in humans. Editors: GYLES CL *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, CAB International, Wallingford, pp: 285-333.
- Nguyen TD, Vo TT, Vu-Khac H (2011) Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *Journal of Veterinary Science* 12 (2): 159-164. DOI: 10.4142/jvs.2011.12.2.159
- Nguyen TV, Le Van P, Le Huy C et al (2005) Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol* 43(2): 755-760. DOI:10.1128/JCM.43.2.755-760.2005
- Nielsen EM, Engberg J, Fussing V et al (2000) Evaluation of Phenotypic and Genotypic Methods for Subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from Humans, Poultry, and cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 38(10):3800.
- Njoroge S, Muigai AW, Njiruh PN et al (2013) Molecular Characterisation And Antimicrobial Resistance Patterns Of *Escherichia Coli* Isolates From Goats Slaughtered In Parts Of Kenya. *East African Medical Journal* 90(3):72-83.
- Norrung B, Buncic S (2008) Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Science* 78 (1-2): 14-24. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.07.032
- Oporto B, Esteban JI, Aduriz G et al (2008) *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* in healthy cattle, sheep and swine herds in Northern Spain. *Zoonoses and Public Health* 55(2):73-81. DOI:10.1111/j.1863-2378.2007.01080.x
- Orden JA, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Cid D et al (1998) Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and eae-positive non-VTEC in 1-30-days-old diarrhoeic dairy calves. *Veterinary Microbiology* 63(2-4): 239-248. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00218-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00218-1)
- Orden JA, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Cid D (1999) Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. *Veterinary microbiology* 66(4):265-273.
- Orden JA, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Garcia S et al (2000) In vitro susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic dairy calves to 15 antimicrobial agents. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 47 (5): 329-335. DOI:10.1046/j.1439-0450.2000.00356.x

- Orskov F, Orskov I (1984) Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods in Microbiology*. 14: 43-112.
- Osek G (2003) Development of a multiplex PCR approach for identification of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains, their major virulence factors gene. *Journal of Applied Microbiology* 95: 12-17. DOI:10.1046/j.1365-2672.2003.02091.x
- Osek J, Winiarczyk S (2001) Prevalence of *eae* and shiga toxin genes among *Escherichia coli* strains isolated from healthy calves. *Journal of veterinary medicine Series B* 48 (1): 67-72. DOI: 10.1046/j.1439-0450.2001.00416.x
- Otawa K, Sato M, Sasaki T (2004) Genetic analysis of shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates from cattle in a limited region. *Animal Science Journal* 75: 261-269. DOI: 10.1111/j.1740-0929.2004.00185.x
- Özkök S (2001) Kedi ve Köpeklerden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının biyokimyasal, patojenite ve toksijenite özelliklerinin araştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 48: 1-5.
- Panchaud Y, Gerber V, Rossano A, Perreten V (2010) Bacterial infections in horses: a retrospective study at the University Equine Clinic of Bern. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 152(4): 176-182. Doi: 10.1024/0036-7281/a000040
- Paton JC, Paton AW (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews* 11(3): 450- 479.
- Peacock E, Jacob VW, Fallone SM (2001) *Escherichia coli* O157:H7: etiology, clinical features, complications and treatment. *Nephrology Nursing Journal* 28(5), 547-557.
- Peeters JE (1994) *Escherichia coli* infections in rabbits, cats, dogs, goats and horses. Editor: Gyles CL. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, CAB International, Wallingford, pp. 261-283.
- Pichner R, Sander A, Steinruck H (2005) [Occurrence of Salmonella spp. And shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in horse faeces and horse meat products]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 118:321-325 (In German).
- Pitout JD (2010) Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs* 70(3): 313-333. DOI:10.2165/11533040-000000000-00000
- Pitout JD (2012) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. *Front Microbiology* 3(9):1-7. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00009
- Platell JL, Cobbold RN, Johnson JR et al (2011) Commonality among Fluoroquinolone-Resistant Sequence Type ST131 Extraintestinal *Escherichia coli* Isolates from Human and Companion Animals in Australia. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 55(8):3782-3787. DOI: 10.1128/AAC.00306-11
- Pohl P (1991) Les *Escherichia coli* verotoxigenes isolees des bovines. *Annales De Medecine Veterinaire* 135:569-576.
- Pohl P, Oswald E, Muylem KV et al (1993) *E.coli* producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. *Veterinary Research* 24 (4): 311-315.
- Pruimboom-Brees IM, Morgan TW, Ackermann MR et al (2000) Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157, H7 Shiga toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(19): 10325-10329. DOI:10.1073/pnas.190329997

Puno-Sarmiento J, Leonardo M, Carolina C (2013) Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Veterinary Microbiology* 166 (4): 676-680. DOI:10.1016/j.vetmic.2013.07.007

Qadri F, Svennerholm AM, Faruque ASG (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews* 18(3): 465-483. DOI: 10.1128/CMR.18.3.465-483.2005

Quinn PJ, Carter ME, Markey B et al (2000) *Clinical Veterinary Microbiology*. 9th edition, MOSBY Press, Edimburgh, London, pp: 209-236.

Rajkhowa S , Hussain I, Rajkhowa C (2009) Detection of heat-stable and heat-labile enterotoxin genes of *Escherichia coli* in diarrhoeic faecal samples of mithun (*Bos frontalis*) calves by polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* 106: 455-45. DOI:10.1111/j.1365-2672.2008.04013.

Rasko DA, Webster DR, Sahl JW et al (2011) Origins of the *E.coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *The New England Journal of Medicine* 365:709-717. DOI:10.1056/NEJMoa1106920

Rippinger P, Bertschinger HU, Imberechts H et al (1995) Designations F I 8ab and F I 8ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 88133 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. *Veterinary Microbiology* 45 281-295.

Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ et al (2006) Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(25): 9667-9672. DOI: 10.1073/pnas.0602359103

Roderova M, Halova D, Papousek I et al (2016) Characteristics of Quinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Humans, Animals, and the Environment in the Czech Republic. *Frontiers in microbiology* 7: 2147. Doi: 10.3389/fmicb.2016.02147

Runnels PL, Moon HW, Schneider RA (1980) Development of resistance with host age to adhesion of K99+ *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. *Infection and immunity* 28(1):298-300.

Salmon RL, Farrell ID, Hutchison JGP et al (1989) A christening party outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O157: H7. *Epidemiology and Infection* 103(2): 249-254. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268800030600>

Salvadori MR, Valadares GF, Leite DS et al (2003) Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 34(3): 230-235. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822003000300009>

Sancak AA, Rutgers HC, Hart CA et al (2004) Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. *The Veterinary Record* 154(4): 101-106. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.154.4.101>

Sawant AA, Hegde NH, Straley BA et al (2007) Antimicrobial-Resistant Enteric Bacteria from Dairy Cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 73(1): 156-163. Doi:10.1128/AEM.01551-06

Scheutz F, Strockbine NA (2001) Genus I: *Escherichia*. Editors: GARRITY G, BRENNER DJ, KRIEG NR et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: Part B: The Gammaproteobacteria*, Baltimore: Williams & Wilkins, pp: 607-624.

Schilling AK, Hotzel H, Methner U et al (2012) Zoonotic agents in small ruminants kept on city farms in southern Germany. *Applied and environmental microbiology* 78(11):3785-3793. DOI:10.1128/AEM.07802-11

Schroeder C, Zhao C, Debroy C et al (2002) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Applied Environmental Microbiology* 68(2): 576-581. DOI: 10.1128/AEM.68.2.576-581.2002

Sepehriseresht S, Salehi ZT, Sattari M et al (2009) Detection of shigatoxigenic *Escherichia coli* from fecal samples of calves and cattle by molecular and serological methods. *Comparative Clinical Pathology* 18 (1): 53-57. DOI: 10.1007/s00580-008-0755-x

Shaheen HI, Kamal KA, Wasfy MO et al (2003) Phenotypic diversity of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) isolated from cases of traveler's diarrhea in Kenya. *International Journal of Infectious Diseases* 7: 35-38. DOI: 10.1016/S1201-9712(03)90040-3

Shahrani M, Dehkordi FS, Momtaz H (2014) Characterization of *Escherichia coli* virulence genes, pathotypes and antibiotic resistance properties in diarrheic calves in Iran. *Biological Research* 47 (1): 28. DOI:10.1186/0717-6287-47-28

Shulman ST, Friedmann HC, Sims RH (2007) Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician. *Clinical Infectious Diseases* 45:1025-9. DOI:10.1086/521946

Sidjabat-Tambunan H, Bensink JC (1997) Verotoxin-producing *Escherichia coli* from the faeces of sheep, calves and pigs. *Australian Veterinary Journal* 75 (4): 292-293. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1997.tb10100.x

Singh P, Sha Q, Lacher DW et al., (2015) Characterization of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and deer in a shared agroecosystem. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 5: 29. Doi:10.3389/fcimb.2015.00029

Sirot D (1995) Extended-spectrum plasmid mediated beta-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 36: 19-34.

Smith-Palmer A, Locking M, Reilly B et al (2005) Cluster of *E. coli* O157 infections in Scottish tourists returning from southwest Turkey. *Euro surveillance* 10(8): E050818.2.

So M, Dallas WS, Falkow S (1978) Characterization of an *Escherichia coli* plasmid encoding for the synthesis of heat-labile toxin: molecular cloning of the toxin determinant. *Infectious Immunity* 21: 405- 411.

Sofos JN, Belk K E, Smith GC (1999) Processes to reduce contamination with pathogenic microorganisms in meat. *Proc. 45th Intl. Congress of Meat Sci. and Tech.*, August 1-6, Yokohama, Japan. pp. 596-605.

Solecki O, MacRae M, Strachan N et al (2009) *E. coli* O157 from sheep in northeast Scotland: prevalence, concentration shed, and molecular characterization by multilocus variable tandem repeat analysis. *Foodborne Pathog Dis* 6(7):849-854. DOI:10.1089/fpd.2008.0216

Songer JG, Post KW (2005) *Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease (Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi)*. Çeviren: Ilgaz AA, Seyyal AK, Özgür NY et al, 1. Baskı, Nöbet Tıp Kitabevleri, İstanbul, s:113

Southwood LL (2006) Principles of antimicrobial therapy: what should we be using? The Veterinary clinics of North America. Equine practice 22(2): 279-296. DOI:10.1016/j.cveq.2006.04.004

Spratt BG (1999) Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. Current Opinion in Microbiology 2(3):312-316. DOI:10.1016/S1369-5274(99)80054-X

Stevens MP, Frankel GM (2013) The Locus of Enterocyte Effacement and Associated Virulence Factors of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Editors: SPERANDIO V, HOVDE CJ (2015). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 97-130. DOI:10.1128/microbiolspec.EHEC-0007-2013

Suojala L, Kaartinen L, Pyorala S (2013) Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis - an evidence-based approach. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 36: 521-531. DOI: 10.1111/jvp.12057

Tahamtan Y, Hayati M, Namavari MM (2010) Prevalence and distribution of the *Stx1*, *Stx2* genes in Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) isolates from cattle. Iranian Journal of Microbiology 2 (1): 8-13.

Tan KE, Ellis BC, Lee R et al (2012) Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeast: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. Journal of Clinical Microbiology 50(10):3301-3308. Doi:10.1128/JCM.01405-12

Thomas KM, McCann MS, Logan A et al (2009) Tracking verocytotoxigenic *Escherichia coli* (O157, O111, O26, O103 and O145) in the beef chain, An international conference organised by ProSafeBeef, March 25th to 26th 2009, Dublin, Advancing Beef Safety through Research and Innovation, pp: 91.

Tobe T, Hayashi T, Han CG et al (1999) Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor. Infection and Immunity 67: 5455-5462.

Tolun V, Anđ-Küçüker M, Diren Ş et al (2001) Detection of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in stool samples of patients with diarrhea by PCR. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 31: 174-177.

Trevena WB, Hooper RS, Wray C et al (1996) Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O 157 associated with companion animals. The Veterinary Record 138 (16): 400.

Turkyılmaz S, Eskiizmirliler S, Tunaligil S et al (2013) Identification, characterization and molecular epidemiology of *Escherichia coli* isolated from lamb and goat kids with diarrhea. Acta Veterinaria Brno 82 (4): 357-362. DOI: 10.2754/avb201382040357

Turutoğlu H, Öztürk D, Güler L et al (2007) Presence and characteristics of sorbitol-negative *Escherichia coli* O157 in healthy sheep faeces. Veterinarni Medicina 52 (7): 301-307.

Tzipori S, Withers M, Hayes J et al (1984) Attachment of *E. coli*-bearing K88 antigen to equine brush-border membranes. Veterinary Microbiology 9 (6): 561-570. DOI: 10.1016/0378-1135(84)90018-X

Van Duijkeren E, van Asten AJ, Gaastra W (2000) Characterization of *Escherichia coli* isolated from adult horses with and without enteritis. *The Veterinary Quarterly* 22(3):162-166. DOI:10.1080/01652176.2000.9695048

Vettorato MP, Leomil L, Guth BEC, et al (2003) Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Microbiology* 95(1-2):103-109. Doi:10.1016/S0378-1135(03)00153-6

Vo AT, van Duijkeren E, Fluit AC et al (2007) Characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from horses. *Veterinary microbiology* 124(3-4) 248-255. DOI:10.1016/j.vetmic.2007.04.027

Vu-Khac H, Cornick NA (2008) Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. *Veterinary microbiology* 126:356-363. DOI:10.1016/j.vetmic.2007.07.023

Wani SA, Bhat MA, Samanta I et al (2003) Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from calves and lambs with diarrhoea in India. *Letters in Applied Microbiology* 37(2): 121-126. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2003.01364.x

Wani SA, Samanta I, Munshi ZH et al (2006) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* in healthy goats in India: occurrence and virulence properties. *Journal of Applied Microbiology* 100(1): 108-113. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02759.x

Wani SA, Hussain I, Fayaz I et al (2009) Subtype analysis of *Stx1*, *Stx2* and *eae* genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and typical and atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) from lambs in India. *The Veterinary Journal* 182: 489-490. Doi:10.1016/j.tvjl.2008.07.017

Wastlhuber UH, Baljer G, Daimon H et al (1988) Comparative studies of plasmid distribution in *Escherichia coli* (*E. coli*) strains from healthy and diarrheic dogs and their owners. *Journal of Veterinary Medicine. Series B.* 35: 218-229.

WHO (2016) Antibiotic resistance. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/> October 2016

Wilkerson C, Samadpour M, Van Kirk N et al (2004) Antibiotic resistance and distribution of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* O157:H7 isolates from humans and bovines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(3): 1066-1067. Doi: 10.1128/AAC.48.3.1066-1067.2004

Willshaw GA, Smith HR, Cheasty T et al (2001) Use of strain typing to provide evidence for specific interventions in the transmission of VTEC O157 infections. *International Journal of Food Microbiology* 66 (1-2): 39-46. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00511-0

Witold AF, Carolyn JH (2011) *Escherichia coli* O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection. *Foodborne Pathogens and Disease* 8(4): 465-487. DOI: 10.1089/fpd.2010.0673

Wolk M, Ohad E, Shpak B et al (1992) A survey of enterotoxigenic *E.coli* from calves and lambs in the region of the Western Galilee in Israel during winter 1989-1990. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 47 (1): 7-10.

Yıldız C, Öztürk C, Emekdaş G (2005) Investigation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 in cases with gastroenteritis. *İnfeksiyon Dergisi* 19; 189-192.

- Yilmaz A, Gun H, Ugur M et al (2006) Detection and frequency of VT1, VT2 and *eaeA* genes in *Escherichia coli* O157 and O157:H7 strains isolated from cattle, cattle carcasses and abattoir environment in Istanbul. *The International Journal of Food Microbiology* 106 (2): 213-217. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.018
- Younis K, Badour M, Ibrahim MS (2015) Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in pet animals and its antibiotic resistance in Alexandria governorate. *Alexandria Journal of Veterinary Science* 45: 113-118. DOI: 10.5455/ajvs.181517
- Yuluo WU, Hinenoya A, Taguchi T et al (2010) Distribution of Virulence Genes Related to Adhesins and Toxins in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy Cattle and Diarrheal Patients in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* 72 (5): 589-597. DOI: 10.1292/jvms.09-0557
- Zahraei Salehi T, Safarchi A, Rabbani Khorasgani M (2006) Identification of virulence genes in isolated *Escherichia coli* from diarrheic calves and lambs by multiplex polymerase chain reaction. *Pakistan Journal of Biological Science* 9 (2): 191-196. DOI: 10.3923/pjbs.2006.191.196
- Zschock M, Hamann HP, Kloppert B et al (2000) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. *Letters in Applied Microbiology* 31 (3): 203-208. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00789.x

7 TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Patojenik <i>E. coli</i> alt gruplarıyla ilişkili bazı özellikler ve semptomlar	6
Tablo 2: İnsanlarda diyarejenik <i>E. coli</i> suşlarının klasifikasyonu.....	8
Tablo 3: <i>E. coli</i> patotipleri ve tipik virulens faktörlerinin dağılımı	14
Tablo 4: <i>E. coli</i> izole edilen hayvan türleri ve illere göre dağılımı.....	33
Tablo 5: <i>E. coli</i> izole edilen hayvanlara ait genel bilgiler	34
Tablo 6: <i>E. coli</i> izole edilen hayvanlara ait genel bilgiler	44
Tablo 7: Referans Suşlar	44
Tablo 8: Multipleks PCR protokolü	54
Tablo 9: DNA amplifikasyon parametreleri.....	55
Tablo 10: Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar pozitif örnekler.....	57
Tablo 11 : Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar sonuçları..	58
Tablo 12: Sığır, at, koyun, keçi, kedi ve köpeklerden elde edilen <i>E. coli</i> virulens genlerinin dağılımları	60
Tablo 13: Sığır, koyun, keçi, at, kedi ve köpeklerden elde edilen <i>E. coli</i> virulens genleri dağılımları ve oranları	62
Tablo 14: Virulens genlerinin varlığına göre sığırlardan izole edilen <i>E. coli</i> patotipleri..	62
Tablo 15: Virulens genlerinin (Ergin/Genç/Gastroenteritisli/Sağlıklı) varlığına göre sığırlardan izole edilen <i>E. coli</i> virulens genleri	63
Tablo 16: Virulens genlerinin varlığına göre koyunlardan izole edilen <i>E. coli</i> patotipleri.....	64
Tablo 17: Virulens genlerinin (Ergin/Genç/Gastroenteritisli/Sağlıklı) varlığına göre koyunlardan izole edilen <i>E. coli</i> virulens genleri	64
Tablo 18: Virulens genlerinin varlığına göre keçilerden izole edilen <i>E. coli</i> patotipleri ..	66
Tablo 19: Virulens genlerinin (Ergin/Genç/Gastroenteritisli/Sağlıklı) varlığına göre Keçilerden izole edilen <i>E. coli</i> virulens genleri.....	66
Tablo 20: Virulens genlerinin varlığına göre köpeklerden izole edilen <i>E. coli</i> patotipleri.....	67

Tablo 21: Virulens genlerinin (Ergin/Genç/Gastroenteritisli/Sağlıklı) varlığına göre köpeklerden izole edilen *E. coli* virulens genleri68

Tablo 22: *E. coli* patotiplerinin ilgili virulens genlerinin varlığına göre hayvanlardaki dağılım oranı69



8 ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar'da sorbitol pozitif <i>E. coli</i>	58
Şekil 2: Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) Agar'da sorbitol negatif <i>E. coli</i>	59
Şekil 3: Wellcollex <i>E. coli</i> O157:H7	59
Şekil 4: Sığırlara ait izolatlardan elde edilen <i>E. coli</i> virulens genlerinin multipleks PCR görüntüsü.....	63
Şekil 5: Koyunlara ait izolatlardan elde edilen <i>E. coli</i> virulens genlerinin multipleks PCR görüntüsü.....	65
Şekil 6: Keçilere ait izolatlardan elde edilen <i>E. coli</i> virulens genlerinin multipleks PCR görüntüsü.....	67
Şekil 7: Köpeklere ait izolatlardan elde edilen <i>E. coli</i> virulens genlerinin multipleks PCR görüntüsü.....	68

9 SİMGELER ve KISALTMALAR

Amerika Birleşik Devletleri	ABD
American Type Culture Colection	ATCC
Attaching/ Effacing	A/E
Avrupa Birliği	AB
Baz çifti (Base pair)	Bp
Bundle Forming Pilus	<i>bfp</i>
Center for Disease Control and Prevention	CDC
Cytotoksik Nekrotizan Faktör	CNF
Çoklu İlaç Direnç (Multidrug Resistance)	MDR
Deoksinükleotitfosfat	dNTP
Deoksiribonükleik asit	DNA
Diarragenic <i>E. coli</i>	DEC
Difüz Adherent <i>E. coli</i>	DAEC
Dünya Sağlık Örgütü	WHO
<i>E.coli</i> Attaching and Effacing Protein	<i>eae</i>
Ekstraintestinal Patojen <i>E. coli</i>	ExPEC
Enteroggregative <i>E. coli</i>	<i>EaggEC</i>
Enterocyte Effacement Lokusu	LEE
Enterohemolizin	<i>Ehly</i>
Enterohemorajik <i>E. coli</i>	EHEC
Enteroinvasiv <i>E.coli</i>	EIEC
Enteropatojenik <i>E. coli</i>	EPEC
Enteropatojenik <i>E. coli</i> Adherence Factor	EAF

Enterotoksijenik <i>E. coli</i>	ETEC
Enzyme Linked Immunosorbent Assay	ELISA
Eosine Methylen Blue	EMB
<i>Escherichia coli</i>	<i>E.coli</i>
Etilen Diamin Tetraasetik Asit	EDTA
Extended-spectrum beta-lactamases	ESBL
Florokinolonlara karşı gelişen dirençler	FQR
Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar	GSBL
Gram	gr
Hemorajik Kolit	HC
Hemorajik Üremik Sendromu	HUS
Hidrojen Sülfür	H ₂ S
Isıya dayanıklı (Heat Stable)	ST
Isıya dayanıksız (Heat Labile)	LT
İdrar Yolu Enfeksiyonları	UTI
İnfektif doz	I _D
Kanlı Agar	KA
Kedilerde Enteropatojenik <i>E. coli</i>	CEPEC
Kilodalton	kDa
Köpeklerde Enteropatojenik <i>E. coli</i>	DEPEC
MacConkey	MC
Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu	
İyonizasyonu-Uçuş Süresi	MALDI-TOF
Magnezyum Klorür	MgCl ₂
Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide	MUG

Metil Red	MR
Mikrolitre	μ l
Mililitre	ml
Milimolar	mM
Multipleks Polimeraz zincir reaksiyonu	m PCR
Multiloküs sekans tiplendirme	MLST
Neonatal menenjit <i>E. coli</i>	NMEC
Nonmotile	NM
Patojenik <i>E. coli</i>	PE
Pikomol	pmol
Polimeraz zincir reaksiyonu	PCR
Pulsed-Field Jel Elektroforez	PFGE
Santigrat derece	$^{\circ}$ C
Sefiksim Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey	CT-SMAC
Shiga toksijenik <i>E. coli</i>	STEC
Shiga toksin	<i>Stx</i>
Tris-Acetate-EDTA	TAE
Thrombotic Thrombocytopenic Purpura	TTP
Tryptose Soya Agar	TSA
Tryptone Soya Broth	TSB
Ultraviolet	UV
Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi	
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	U.Ü.V.F.M
Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi	
Araştırma Uygulama Merkezi	U.Ü.A.U.M

Üropatojenik *E. coli*

UPEC

Voges Porskauer

VP

Verotoksijenik *E. coli*

VTEC



10 EKLER

Bu tez çalışması Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri bölümü tarafından KUAP (V) - 2014/43 no'lu projesi ile desteklenmiştir.



11 TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca akademik bilgilerini benimle paylaşan ve benimde bu yolda sağlam adımlarla ilerlememi sağlayan, desteklerini benden esirgemeyen sağıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Esra BÜYÜKCANGAZ'a ve yetişmemede büyük emekleri olan Anabilim Dalımızın değerli Öğretim Üyeleri Prof. Dr. K. Tayfun ÇARLI, Prof. Dr. Aysin ŞEN, Prof.Dr. Mihriban ÜLGEN, Prof. Dr. Cengiz ÇETİN, Doç. Dr. Serpil KAHYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Hüban GÖÇMEN, Araş. Gör. Burak MAT, Araş. Gör. Emel BIYIKLI, Araş. Gör. Özge YILMAZ'a ve çalışmam boyunca yardımlarını gördüğüm Tekn. Ayşe UYAR'a desteklerinden ötürü teşekkürlerimi sunuyorum.

Akademik ilerlememde en büyük dayanağım olan, her zaman ve her koşulda yanımda olup maddi manevi desteklerini benden esirgemeyen, başarılarımla gurur duyan annem Alzihal'a ve Babam Khider'e ve kardeşlerim Elwaleed, Wisal, Elnazeer, Elmutasim ve Elmamoun'a teşekkürlerimi sunuyorum. Bana huzurlu, mutlu ve sevgi dolu bir hayat veren eşim Samah, oğlum Khalid ve kızım Azza'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

12 ÖZGEÇMİŞ

25/11/1975 tarihinde Sudan'da doğdum. 2001 yılında Khartoum Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden mezun oldum. 2003 yılında Khartoum Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım ve 2006 yılında mezun oldum. 2008 yılında Bahry Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'nın Bursu ile Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda 2012 yılında doktora eğitimime başladım. Evli ve iki çocuk babasıyım.



13 İTHAF

Tez çalışmamı, yetişmemde sonsuz emek ve özveri sahibi olan aileme, hocalarıma ithaf ediyorum.

