

**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI**

**GIDA KAYNAKLI *ESCHERİCHIA COLI* KÖKENLERİNDE
TOKSİN GENLERİNİN MULTİPLEKS PCR YÖNTEMİYLE
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Cansu ÖNLEN**

**Danışman
Doç. Dr. Nizami DURAN**

HATAY-2013

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**GIDA KAYNAKLI *ESCHERİCHIA COLI* KÖKENLERİNDE
TOKSİN GENLERİNİN MULTİPLEKS PCR YÖNTEMİYLE
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Cansu ÖNLEN

Danışman
Doç. Dr. Nizami DURAN

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
1202Y0104 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2013

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**GIDA KAYNAKLI *ESCHERİCHIA COLI* KÖKENLERİNDE
TOKSİN GENLERİNİN MULTİPLEKS PCR YÖNTEMİYLE
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Cansu ÖNLEN

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 21/08/ 2012 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oyçokluğu/oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Doç Dr Nizami DURAN
Üye :Doç Dr Burçin ÖZER
Üye :DoçDrGülnaz ÇULHA

Bu tez, Enstitümüz Mikrobiyoloji (Tıp) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, tez konumun seçilmesinde, tez çalışmalarımın yönlendirilmesinde, sonuçların değerlendirilmesinde ve tez yazımı aşamasında büyük katkısı olan çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Nizami DURAN'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, eğitimimde emeği geçen değerli hocalarım Doç. Dr. Burçin ÖZER, Doç. Dr. Gülnaz ÇULHA, Yrd. Doç. Dr. Melek İNCİ ve Yrd. Doç. Dr. Erkan YULA'ya,

Eğitimim süresince destekleri ve güler yüzleri ile birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Uzm. Dr. Çetin KILINÇ, Uzm. Dr. Özgür PAŞA, Arş. Gör. Dr. Şeyda ÖZARSLAN, Arş. Gör. Dr. Gülcan ERKASLAN ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Yüksek lisans eğitimim süresince bir arada bulunduğum desteklerini her daim hissettiğim sevgili arkadaşlarım Hayat ASLAN, Naciye ERYILMAZ, Esra KARAYİĞİT, Suphi BAYRAKTAR, Mehmet ESATOĞLU, Ayla ANAR, Merve OCAK, Burcu GÜLKAN ve yüksek lisans eğitimi alan diğer tüm arkadaşlarıma,

Patoloji anabilim dalındaki değerli hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Yaşamım boyunca bugünlere gelmemde önemli pay sahibi olan, her zaman yanımda yer alarak maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili annem Nihal ÖNLEN, babam Yusuf ÖNLEN, ve canım kardeşim Şevval Sude ÖNLEN'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Enterohemorajik <i>Escherichiacoli</i> (EHEC) ve <i>E.coli</i> O157:H7	5
2.2.1. Gıdalarla Bulaşan EHEC Salgınları	8
2.3. <i>E.coli</i> O157:H7 Kaynak ve Rezervuarları	10
2.4. <i>E.coli</i> O157:H7'nin Üremesini ve Hayatta Kalmasını Etkileyen Faktörler	13
2.4.1. Sıcaklık	13
2.4.2. pH	14
2.4.3. Su Aktivitesi	15
2.4.4. Gıdaların İşlenmesi	15
2.5. <i>E.coli</i> O157:H7 Klinik Tablosu	17
2.6. <i>E.coli</i> O157:H7 Virulans Faktörleri	20
2.7. <i>E.coli</i> O157:H7 İnfeksiyon Mekanizması ve Patogenez	23
2.8. <i>E.coli</i> O157:H7 İmmunolojisi	27
2.9. Bulaş Yolları	27
2.10. Epidemiyolojisi	28
2.11. Tanı	30
2.12. Tedavi	31
2.13. Korunma	31
2.13.1. İnfeksiyonun Önlenmesinde Gıda Güvenliğinin Önemi	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Araç ve Gereçler	36
3.1.1. Araçlar	36
3.1.2. Kimyasal Maddeler	37
3.2. Örneklerin Toplanması ve Kültivasyon	37
3.3. Kullanılan Besiyerleri, Solüsyonlar ve Biyokimyasal Testler	39
3.3.1. EMB agar	39
3.3.2. MüllerHinton Buyyon	39
3.3.3. MüllerHinton Agar	39

3.3.4. TSI Agar	39
3.3.5. SIM Agar	40
3.3.6. Üre Besiyeri	41
3.3.7. Sitrat Besiyeri	41
3.3.8. Lizin Iron Agar	42
3.3.9. Metil Red-Voges Proskouver Besiyeri	42
3.3.10. 50X Tris-Asetat EDTA (TAE) Elektroforez Tamponu: 1 Litre	43
3.3.11. Yükleme (Loading) Tamponu (6X)	44
3.3.12. Triptik Soy Buyyon (Saklama besiyeri)	44
3.3.13. Fosfat Buffer Tamponu (PBS)	44
3.4. Genomik DNA Ekstraksiyonu	44
3.5. PCR Amplifikasyonu	46
3.5.1. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Tekniği ile Görüntülenmesi	49
3.6. Antimikrobilyallere Direncin Saptanması (Disk Difüzyon Yöntemi)	51
4. BULGULAR	54
4.1. Bakteriyolojik Bulgular	54
4.1.1. Glikoz, Sükroz ve Laktozun Kullanımı, H ₂ S Oluşturma	56
4.1.2. Üreaz Aktivitesi	56
4.1.3. İndol Oluşumu ve Hareket Testi	57
4.1.4. Sitrat Kullanımı	58
4.1.5. Lizin Dekarboksilaz	58
4.1.6. Metil Kırmızısı Testi	59
4.2. PCR Bulguları	60
4.3. E.coli O157:H7 İzolatlarında Antibiyotik Direnci	64
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ	75
7. KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	83

Şekiller Dizini

	Sayfa No
Şekil 2.1. <i>E.coli</i> O157:H7 enfeksiyonu ve birincil komplikasyonları	18
Şekil 2.2. <i>E.coli</i> O157:H7 enfeksiyonunun doğal seyri	18
Şekil 2.3. İshal sonrası HUS'un doğal seyri.....	20
Şekil 2.4. <i>E.coli</i> O157'nin bulaş yolları.....	28
Şekil 3.1. Servis edilmeden önce steril kaba alınmış salata örneği.....	38
Şekil 3.2.Zenginleştirme işlemi için 5 ml olarak steril cam tüplere konulmuş Müller Hinton Broth besiyerine salata inokulasyonu	38
Şekil 3.3. PCR cihazı (Thermalcycler, TechneFlexigene™, İngiltere).....	47
Şekil 3.4. Elektroferez ünitesi (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD).....	50
Şekil 3.5 Görüntüleme cihazı (Wealtec, Dolphin-View, ABD, UV Transillumunator)	51
Şekil 3.6. Müller Hinton Agar besiyerinde 24 sa. inkübasyon sonunda antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zon çaplarının görünümü	52
Şekil 4.1. Salata örneklerinin Müller-Hinton Broth besiyerinde 24 saatlik inkübasyonu sonundaki görünümü	55
Şekil 4.2. EMB agarda laktoz pozitif <i>E.coli</i> izolatlarının görünümü	55
Şekil 4.3. TSI agarda glikoz, laktoz ve sakkarozun fermente olması sonucu asit ürünlerin oluşumu ile besiyerinin renginin kırmızıdan sarıya dönmesi	56
Şekil 4.4. Christensen üre besiyerinde enzimi pozitif reaksiyonunun görünümü.....	57
Şekil 4.5. Triptofan besiyerinde pozitif <i>E.coli</i> 'de indol ve hareket testi	57
Şekil 4.6. Sitrat besiyerinde <i>E.coli</i> 'nin sitrat negatif testi reaksiyonunun gösterilmesi	58
Şekil 4.7. Lizin Iron Agarda <i>E.coli</i> 'nin lizin dekarboksilaz reaksiyonunun gösterilmesi.....	58
Şekil 4.8. Glikoz buyyonda <i>E.coli</i> 'nin pozitif metil kırmızısı testinin gösterilmesi.....	59
Şekil 4.9. <i>E.coli</i> için tipik IMVIC görüntüsü.....	59
Şekil 4.10. <i>E.coli</i> izolatlarında <i>hlyA</i> , <i>stx1</i> ve <i>stx2</i> toksin genlerinin sıklığı.....	60
Şekil 4.11. <i>E.coli</i> O157:H7 izolatlarında shiga toksin genlerinin (<i>stx1</i> ve <i>stx2</i>) sıklığı	61
Şekil 4.12. <i>HlyA</i> geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü-1.....	62
Şekil 4.13. <i>HlyA</i> geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü-2.....	62
Şekil 4.14. <i>stx1</i> (614 bp) ve <i>stx2</i> (779 bp) genlerinin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü-1	63
Şekil 4.15. <i>stx1</i> (614 bp) ve <i>stx2</i> (779 bp) genlerinin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü-2	63

Çizelgeler Dizini

Sayfa No

Çizelge 2.1. <i>E.coli</i> O157:H7 salgınlarıyla ilişkili şüpheli gıdalar	10
Çizelge 2.2. <i>E.coli</i> O157:H7 enfeksiyonunun ilerleyişinin şematik gösterimi	24
Çizelge 2.3. <i>E.coli</i> O157:H7 enfeksiyonuna yakalanma riskini azaltan işlemler.....	32
Çizelge 3.1. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine göre Mikrobiyolojik kriterler	36
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan oligonükleotid dizileri ve fragment büyüklükleri	46
Çizelge 3.3. <i>Stx1</i> ve <i>Stx2</i> gen bölgeleri için PCR karışımları.....	47
Çizelge 3.4. <i>HlyA</i> gen bölgeleri için PCR karışımları.....	48
Çizelge 3.5. <i>HlyA</i> gen bölgeleri amplifikasyonu için ısı döngüleri	48
Çizelge 3.6. <i>Stx1</i> ve <i>Stx2</i> gen bölgeleri amplifikasyonu için ısı döngüleri	49
Çizelge 3.7. Antibiyotik diskleriyle oluşan inhibisyon zonlarının değerlendirme kriterleri	53
Çizelge 4.1. Kirby-Bauer Disk diffüzyon yöntemine göre <i>hlyA</i> açısından pozitif <i>E.coli</i> O157:H7 suşlarının antibiyotik duyarlılık yüzdeleri.....	64
Çizelge 4.2. Shiga toksinleri açısından pozitif <i>E.coli</i> O157:H7 direnç paternleri.....	65
Çizelge 4.3. Kirby-Bauer Disk diffüzyon yöntemine göre <i>Stx</i> açısından pozitif <i>E.coli</i> O157:H7 suşlarının antibiyotik duyarlılık yüzdeleri.....	66

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

α	: Alfa
β	: Beta
μ l	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
A/E	: Bağlanma-Yok etme (<i>Attacing/Effacing</i>)
bp	: Baz çifti
CDC	: Hastalık kontrol ve önleme merkezi
CFU	: Koloni oluşturan birim
CLSI	: Klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ELISA	: Enzim işaretli antikor testi
Gb3	: Globotriaosilseramid
HC	: Hemorajik kolit
Hly-A	: Hemolizin A
HUS	: Hemolitik üremik sendrom
IMViC	: Indol Metil red-Voges Proskouver Sitrat
Kb	: Kilo baz
kDA	: Kilo dalton
kGy	: Kilo gray
LEE	: Enterosit efasman lokusu
ORFs	: Açık okuma bölgesi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PEGF	: Değişken alanlı jel elektroforezi
SMAC	: Sorbitollu Mac Conkey agar
STEC	: Shiga toksini üreten <i>Escherichia coli</i>
Stx	: Shiga toksini
Tir	: Translokeintimin reseptörü
TTP	: Trombotik trombositopenik purpura
TTSS	: Tip III salgı sistemi
VT	: Vero toksin
VTEC	: Verotoksijenik <i>E.coli</i>

ÖZET

Gıda Kaynaklı *Escherichia Coli* Kökenlerinde Toksin Genlerinin Multipleks PCR Yöntemiyle Araştırılması

Escherichia coli (*E. coli*) O157:H7 önemli bir insan patojenidir. Shiga toksin (*stx1* ve *stx2*) ve enterohemolizin (*hlyA*) üreten *E.coli* hayvansal kaynaklı gıdaların kontaminasyonu ile ortaya çıkan önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Bu çalışmada Hatay'da faaliyet gösteren lokantalardan alınan salata örneklerinde *E.coli* O157:H7 frekansı ile bu suşlarda *stx1* ve *stx2* toksin varlığının multipleks PCR yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 327 salata örneği dahil edildi. Mikrobiyolojik değerlendirme Türk Gıda kodeksi Mikrobiyolojik Kriterlerine uygun olarak yapıldı. Sınır değerler üzerinde *E.coli* izolasyonu yapılan örneklerde DNA izolasyonu yapıldı. Çalışmada 150 *E.coli* izolatında ait karakteristik virulans genlerinin (*stx1*, *stx2*, *hlyA*) varlığı multipleks PCR yöntemiyle araştırıldı. Ayrıca *E.coli* O157:H7 olarak tespit edilen tüm izolatlarda eritromisin, ampisilin, gentamisin, sefuroksim, streptomisin, tetrasiklin, sefoperazon, siprofloksasin ve streptomisin duyarlılıkları CLSI kriterleri doğrultusunda disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı. Çalışmaya dahil edilen 327 salata örneğinde 150 (%45.8)'sinde *E. coli* izolatı saptanmıştır. Bu 150 izolatın 32 (%21.3)'sinde multipleks PCR yöntemi ile *hly-A* geni varlığı tespit edilmiştir. Bu 32 *hly-A* pozitif izolattan 5 (%15.6)'inin *stx2*, 2 (%6.3)'sinin *stx1* ve 1 (%3.1) izolatın ise hem *stx1* hem de *stx2* geni açısından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Otuz iki *E.coli* O157:H7 suşunun tamamının eritromisine dirençli olduğu tespit edilmiştir. Eritromisin dışında en yüksek direncin ampisiline karşı (%68.8; 22/32) görüldüğü tespit edilirken, sefuroksim, siprofloksasin ve sefaperazona antimikrobiyal direnç tespit edilememiştir. Tüm kökenlerin bu üç antibiyotige (sefuroksim, siprofloksasin ve sefaperazon) karşı duyarlı oldukları saptanmıştır. Bunlar dışında streptomisin gentamisine ve tetrasiklinlere karşı antimikrobiyal direncin sırasıyla %15.6 (5/32), %6.3 (2/32) ve %3.1 (1/32) olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlarımız ilimizdeki lokantalardan alınan salata örneklerinden izole edilen *E.coli* suşlarının *stx1*, *stx2* ve *hlyA* gibi önemli virulans genlerine sahip olduğunu göstermiştir. Restoranlarda tüketilen salataların sağlık açısından potansiyel bir tehlike oluşturabileceği görülmektedir. Gıda kaynaklı *E.coli* O157:H7 enfeksiyonlarının önüne geçmek için salatalık malzemelerinin yıkanması ve hazırlanması hususunda yıkanma ve hijyen kurallarına uyulması önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: *E.coli* O157:H7, *stx1*, *stx2*, *hly-A*, PCR

ABSTRACT

Investigation of the Toxin Genes in Food-Borne *Escherichia coli* Strains by Multiplex PCR Technique.

Escherichia coli (*E. coli*) O157:H7 is important pathogen for human health. Shiga toxin (*stx1* and *stx2* genes) and enterohemolysin (*hlyA* gene) producing *E. coli* have emerged as human pathogens and contamination of foods of animal origin has been a major public health concern. It was aimed to determine the frequency of *E. coli* O157:H7 and the *stx1* and *stx2* gene in salad samples taken from various restaurant which is located in Hatay province. A total of 327 salad samples were included to the study. Microbiological evaluation was performed according to the Turkish Food Codex, Microbiological criteria. If the number of isolated bacteria were higher than the limit in the Turkish Food Codex and Codex Alimentarius, nucleic acid isolation was made. The presence of the virulence genes (*stx1*, *stx2*, *hlyA*) in a total of 150 *E. coli* isolates were searched by multiplex PCR methods. Antibiotic susceptibility to erythromycin, ampicillin, gentamicin, cefuroxime, streptomycin, tetracycline, cefoperazone, ciprofloxacin, and streptomycin was determined via disk diffusion tests with antibiotic-containing disks on Mueller-Hinton agar plate. The results were expressed as susceptible or resistant according to criteria are commended by the Clinical and Laboratory Standards Institute. A total of 327 salad samples were analyzed. *E. coli* O157:H7 was detected in 150 (45.8 %) out of 500 analyzed samples. Of these 150 isolates, the presence of *hly-A* gene has been detected in 32 (21.3%) samples by multiplex PCR technique. A total of five (15.6%) isolates in this 32 *hlyA* positive isolates had *stx2* gene, two (6.3%) of them had *stx1* gene and one (3.1%) of the isolates were found to be positive for both *stx1* and *stx2* genes. It was found that all *E. coli* O157:H7 isolates were resistant to erythromycin. While the highest rates of antibiotic resistance were observed for ampicillin (68.8%, 22/32) after erythromycin, any antibiotic resistance against to cefuroxime, ciprofloxacin, and cephaloperazone has not been identified. All isolates were found to be susceptible to these three antibiotics (cefuroxime, ciprofloxacin and cephaloperazone). Other than this, antimicrobial resistance to streptomycin, gentamicin, and tetracycline were determined 15.6% (5/32), 6.3% (2/32) and 3.1% (1/32), respectively. The results obtained in our province showed that *E. coli* strains isolated from salad samples were found to have important virulence genes such as *stx1*, *stx2*, and *hlyA*. Salads are consumed in restaurants could be found a potential threat to health. The results obtained in our province and food joints salad isolated from *E. coli* O157: H7 strains of different *stx1*, *stx2*, and just as important virulence genes were found to have *hlyA*. To prevent food-related *E. coli* O157:H7 infections, washing and food hygiene rules should be followed during the preparing the salad components.

Keywords: *E. coli* O157:H7, *stx1*, *stx2*, *hly-A*, PCR

1.GİRİŞ

Salatalar yüksek oranda mikroorganizma içermeleri ve patojen mikroorganizmaların hızla çoğalabilmeleri için oldukça uygun ortamlar olmaları nedeniyle halk sağlığı açısından riskli gıdalar kategorisinde değerlendirilmektedir.

Salatalarda *Esherichia coli* gibi barsak bakterileri başta olmak üzere *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Listeria* gibi önemli patojenler bulunabilmekte ve insanlarda ciddi hastalıklara yol açabilmektedirler. Taze hazırlanan sebze salataları özellikle marul, domates, salatalık, havuç gibi malzemeler doğası gereği yüksek mikrobiyal yüke sahiptirler. Sebzelerin hazırlanması sırasında doğranması ya da rendelenmesinin bu malzemelerin içerisinde bulunan mikroorganizmaların çoğalmasını tetiklediği ve hazırlama aşamasında bu işlemlerin kontaminasyon riskini arttırdığı bildirilmektedir (Gündüz 1999).

Salataların mikrobiyal florasını salata yapımında kullanılan malzemelerde (sebze, meyve, et, balık, turşu gibi) doğal olarak bulunan mikroorganizmalar ile salatanın hazırlanması, depolaması, taşınması gibi işlemler sırasında dış ortamdan bulaşan mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Genellikle salataların önemli bileşenlerini taze sebzeler oluşturmaktadır. Taze sebzeler yapısında yüksek oranda su ihtiva ettiklerinden oldukça çabuk bozulabilen özellikte olup, birçok patojen açısından, çok iyi gelişme koşulları ve kolay üremeleri açısından uygun ortamlardır. Salataların hazırlandığı malzemelerin doğal mikroflorası ve pH'sı değişse de tüketime hazır olan salataların içindeki canlı bakteri sayısının $10^6/g$ dolaylarında olduğu tahmin edilmektedir (Gündüz 1999).

Salataların mikroflorasının önemli bir bölümünü *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri oluşturmaktadır. Salatalarda koliform bakterilerin sayısının $10^5/g$ 'a kadar ulaşabildiği bildirilmektedir. Özellikle *E.coli*salatalarda en çok rastlanılan bakterilerden biridir. Bu mikroorganizmaların insanlarda patojenite oluşturabilmeleri mikroorganizma titrelerine bağlı olarak değişse de özellikle Enterohemorajik *E.coli* (EHEC) gibi bazı patojenlerin düşük dozlarda bile hayatı tehdit edebilen ciddi infeksiyonlara yol açabildikleri bilinmektedir (Gündüz 1999). Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların

başında *E.coli* gelmektedir. *E.coli* insanlar için en önemli patojenlerden biridir. *E.coli* birçok farklı serotipe sahip olup bu serotiplerden *E.coli* O157:H7 insan sağlığı açısından önemli morbidite ve mortalite sebebidir. *E.coli* O157:H7 ülkemizde olduğu gibi tüm dünyada halk sağlığı açısından önemli bir patojendir (Signorini ve Tarabla 2009, Fedio ve ark. 2011). *E.coli* O157:H7 toksin üreterek etki gösteren insan sağlığı açısından son derece önemli bir patojendir. Shiga toksin üreten (STEC) *E.coli* kökenleri arasında en önemli patojenlerden biridir. Özellikle O157 serogrup ciddi gıda kaynaklı salgınlara, sporadik hastalığa ve dünya çapında ölümlere yol açabilen kökendir. *E.coli*'nin O157:H7 serotipinin yol açtığı infeksiyonlar orta derecede sulu diyareden hemorajik kolit, hemolitik üremik sendrom ve trombositopenik purpura gibi çeşitli hastalıklara kadar farklılık gösterebilmektedir. STEC infeksiyonu genellikle karın ağrısı, kanlı ya da kansız diyare ile seyreder, daha az sıklıkla ciddi sistemik komplikasyonlara sebep olabilir. Komplikasyonlar bir çok yerde gelişen trombotik mikroanjiyopati ile ilgilidir, daha çok böbreklerde görülür ve akut böbrek yetmezliği, trombositopeni ve anemi ile karakterize hemolitik üremik sendrom (HUS) ile sonuçlanır. Santral sinir sistemi ve pankreas diğer sıklıkla etkilenen organlardır. HUS, çocuklardaki akut böbrek yetmezliğinin en önde gelen nedeni olarak kabul edilmektedir. Hastalığın tedavisi, hemodiyaliz ve destekleyici uygulamalardan ibarettir (Gordillo ve ark. 2011, Bandyopadhyay ve ark. 2012).

Bakteri enterohemolizin (*hlyA*) ve shiga toksin olarak bilinen sitotoksinleri önemli virülans faktörlerindedir. Enterohemolizin *hlyA* tarafından kodlanmakta olup eritrositleri lizi ederek mikroorganizmanın virülansına katkı sağlayabilmekte ve böylelikle barsakta bakterinin hayatta kalması için bakteriye demir kaynağı sağlamaktadır (Boerling ve ark. 1999, Rey ve ark. 2006).

Shiga toksinler ise konak protein sentezini inhibe etme yeteneğindeki toksinler olup ökaryotik hücre yaralanmasına ve ölümüne neden olabilmektedirler (Bentancor ve ark. 2012).

*E.coli*O157:H7'nin genellikle çiftlik hayvanlarının intestinal sistemine kolonize olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda süt veren sığırlarda *E.coli*O157:H7'nin primer taşıyıcısı olduğu gösterilmiştir (Rey ve ark. 2006, Hernández ve ark. 2007, Su ve ark. 2012). *E.coli*O157:H7 enfeksiyonlarının çoğu salgını az pişmiş et ve et ürünleri, pastörize edilmemiş günlük ürünler ile bu hayvanların dışkılarıyla kontamine olmuş sebzeler veya kontamine olmuş su ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Dontorou ve

ark. 2003, Hernández ve ark. 2007, Gordillo ve ark. 2011, Su ve ark. 2012). Ayrıca kişiden kişiye bulaşım da olabileceği gösterilmiştir (Liu ve Li 2002, Rey ve ark. 2006).

Dünyanın çeşitli ülkelerinde yapılan çalışmalarda gıda kaynaklı *E.coli*O157:H7 prevalansının %0.8-22.5 arasında değiştiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Walsh ve ark. 1997, Chinen ve ark. 2001, Samadpour ve ark. 2002, Mora ve ark. 2007). Ülkemizde ise gıda kaynaklı çalışmalarda prevalansın %1-7.6 arasında olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Sarımehmetoğlu ve ark. 1998, Ertaş ve ark. 2013).

E.coli O157:H7 gıda zinciri yoluyla taşınan önemli insan patojenleri olup düşük infeksiyon dozuna sahiptir. Mikroorganizma kontamine gıda veya dışkı örneklerinde düşük titrelerde bulunduğundan, mikroorganizmanın tanısında konvansiyonel yöntemlerle zorluklar yaşanmaktadır. Mikroorganizmanın tanısında kültür ve enzim işaretli antikor testi (ELISA) yöntemleri gibi çeşitli yöntemler kullanılmasına rağmen, gerek bu yöntemlerin uygulanabilirliği ve gerekse de duyarlılığındaki problemlerden dolayı günümüzde tanıda polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı moleküler teknikler *E.coli* O157:H7 izolatlarının hızlı ve doğru tanısı için tercih edilmektedir (Chapman ve ark. 2001, Daly ve ark. 2002, Gordillo ve ark. 2011, Fode-Vaughan ve ark. 2003, Su ve ark. 2012).

Mikroorganizmanın tanısını takiben patojenite göstergesi olan virülans genlerinin varlığının gösterilmesi oldukça önemlidir. *E.coli* O157:H7' nin shiga toksin-1 (*Stx1*), shiga toksin-2 (*Stx2*) ve *hlyA* gibi önemli virülans genlerinin tespiti için günümüzde en sık multipleks PCR yöntemleri tercih edilmektedir (Bai ve ark. 2010, Gordillo ve ark. 2011). Bu çalışmada Hatay'da faaliyet gösteren lokantaların halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlike oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi amacıyla, lokantalardan alınan salata örneklerinde *E.coli*O157:H7 prevalansı ve *E.coli*O157:H7 suşlarında Enterohemolizin *hlyA*, *Stx-1* ve *Stx-2* toksin varlığı multipleks PCR yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

E.coli 1980'e kadar enterik patojenlerin dışında apatojen olarak tanımlanmaktaydı. Ancak, enterik hastalıklar hakkında bilgiler arttıkça, araştırmacılar insan veya hayvanlara karşı patojeniteye neden olan kazanılmış virulans karakteristiğine sahip *E.coli* suşlarını izole etmeye başlamışlardır. Enteropatojenlerin bu sınıfındaki organizmaların önemli özelliği *Shigella dysenteria* serotip 1'in ekzotoksini gibi shiga toksinle yakından ilişkili toksinler üretmeleridir. Bu toksin aslında 20. yy'ın başlarında tanımlanmıştır. Konowalchuk 1977 yılında, Kanada'da kültürde Vero hücrelerini öldüren bir faktör üreten *E.coli*'nin bir grubunu tanımlamıştır ve buna verotoksin adını vermiştir. Bu toksini üreten mikroorganizmaya ise verotoksin üreten *E.coli* (VTEC) adını vermiştir. Bu toksinin birden fazla varyantının varlığı tespit edildiğinde, bu varyantlara verotoksin 1 (VT1), verotoksin 2 (VT2), verotoksin 3 (VT3) ve benzerleri gibi isimler verilmiştir. O'Brien ve arkadaşları 1980'lerin başında (O'Brien ve ark. 1982, O'Brien ve ark. 1984) shiga toksinle ilişkili toksin üreten bir kaç *E.coli* tanımlamıştır. Bu organizmalar çocuklarda kanlı ishal ile ilişkilendirilmiştir. Bu bilim adamları da bu organizmaları STEC olarak adlandırmışlardır. HUS; Conrad von Gasser tarafından 1955'te parçalanmış eritrositler, trombositopeni ve akut böbrek yetmezliği olan hemolitik anemi ile karakterize bir mikroanjiyopati olarak tanımlanmıştır. HUS'un nedeni ise, Karmali ve arkadaşlarının (Karmali ve ark. 1985) VTEC'in HUS ile ilişkili olduğunu gösterdiği 1985 yılına kadar belirsiz kalmıştır. *E.coli* O157:H7'nin insanlar için tam anlamıyla patojen olduğu 1982 yılında kanlı diyareye neden olduğu Michigan ve Oregon'daki iki büyük salgında sığır etinde yapılan incelemeler sonucu saptanmıştır (Riley ve ark. 1983). Araştırmacılar HUS vakası gösteren çocuklardan izole edilen *E.coli* suşunun Vero hücreleri için toksik olduğunu saptamıştır (Karmali ve ark. 1983). Ardından, araştırmacılar ilişkili veya benzer toksinleri yapan *E. coli*'yi tanımlayan birden fazla araştırmacı olduğunu fark etmiş ve aynı organizmaları tanımlamak için pek çok farklı terim kullanımının karışıklığa yol açtığını fark etmişlerdir. Tercih edilen mevcut terminolojiye göre; toksinlerin *Stx1*, *Stx2*, *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e* ve benzerleri olarak isimlendirilmesi ve STEC için shiga toksin üreten *E.coli* olarak isimlendirilmesi kabul görmüştür.

STEC şaşırtıcı bir biçimde bir dizi kombinasyonda toksin üretmektedir. Bazı suşlar sadece *Stx1*, bazıları hem *Stx1* hem de *Stx2*, birçoğu sadece *Stx2* ve birçoğu *Stx1*, *Stx2* ve *Stx2*'nin türevleri dahil olmak üzere birçok toksin üretmektedirler. *Stx2* varyantlarının ishal ve HUS'a neden olma ihtimalleri farklılık göstermektedir (Friedrich ve ark. 2002). Bu toksinler ayrıca diğer bazı enterik bakteriler tarafından da üretilmektedir. (*Citrobacter freundii* ve *Enterobacter cloacae* gibi) (Schmidt ve ark. 1993, Paton 1996). Bu organizmalar HUS'lu çocuklardan izole edilmiş olmasına rağmen önemi bilinmemektedir. Diğer enteropatojenlerin bir grubunda ise bu toksinlerin bulunmadığı gösterilmiştir. Tüm STEC'ler insanda hastalığa yol açabilme yeteneğindedirler. İnsanlarda hastalık yapan önemli tip (Ashkenazi ve ark. 1988, Bartlett ve ark. 1986) EHEC olarak isimlendirilmiştir. EHEC tipik olarak enterosit bağlanma mekanizmalarına sahiptir. Bağlanma mekanizması bakteri tarafından virulans proteinlerinin konak hücreye direkt olarak enjekte edilmesiyle şırınga benzeri bir yapının üretimini içermektedir. Sonuçta transmisyon elektron mikroskopunda görülebilir karakteristik bir bağlanma lezyonu oluşumu görülmektedir. EHEC'lerin çoğu bağlanma lezyonu üretmesine rağmen (Schmidt ve ark. 1999) bu olay tüm suşlarda görülmemektedir (Beutin ve ark. 2004, Vaz ve ark. 2004).

EHEC tipik olarak belirli serotiplere sahiptir. En yaygını *E.coli* O157:H7'dir. Çok sayıda STEC serotipi (100'ün üzerinde tanımlanmıştır) sığır ve diğer hayvanlardan izole edilebilirken HUS'a neden olmamaktadır. *Stx2* veya *Stx2c* üreten suşlar ishal veya HUS'lu hastalarda bulunurken, *Stx2d* ve *Stx2e* toksin varyantlarını üreten suşlar genellikle HUS olmayan bireylerde ishal ile ilişkilendirilmiştir. *Stx2f* üreten suşlar insanlar için non-patojenik olarak görünmektedir (Friedrich ve ark. 2002). Patojenik suşlar spesifik virulans faktörlerine, patojeniterine ve spesifik suşlara göre sınıflandırılmaktadır. Buna göre patojenik *E. coli*'ler EHEC'te dahil olmak üzere 6 sınıfta tanımlanmıştır: Bunlar; Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC), enteropatojenik *E.coli* (EPEC), enteroagregatif *E.coli* (EAEC), enteroinvaziv *E.coli* (EIEC), diffüz yapışık *E.coli* (DAEC) ve EHEC'tir.

2.2. Enterohemorajik *E.coli* ve *E.coli* O157:H7

E.coli doğumu takiben saatler içinde insan ve diğer hayvanların barsak sistemine kolonize olan fakültatif anaerob Gram (-) bir basildir. *E.coli*'nin suşlarının çoğu konağında

kommensal olarak bulunsa da, önemli bir kısımda patojendir. Patojen suşların bakteriyofajlar, plazmidler ve patojenite adaları aracılığıyla çeşitli virulans faktörlerini edindiği düşünülmektedir (Yoon ve Hovde 2008, Jores ve ark. 2004). EHEC genel hatlarıyla ürettikleri semptomların bir kombinasyonu ve sahip oldukları virulans faktörleri ile tanımlanmaktadır (Neill ve ark. 1994). EHEC'in sebep olduğu hastalıkta görülen semptom kanlı diyare ve hemorajik kolittir (HC). EHEC infeksiyonlarının çoğunda dışkıda kan görülse de tüm infeksiyonlarında dışkıda kan görülmeyebilmektedir. Bu durum genellikle *E.coli* O157:H7 infeksiyonlarında dışkıda bol kan görülürken, diğer EHEC serotiplerinin neden olduğu infeksiyonlarda ise dışkıda kan görülmemesi örneği ile açıklanabilmektedir.

EHEC klonal grubunun EPEC'ten türediği düşünülmektedir; çünkü bu 2 grubun bir kaç virulans mekanizmaları ortaktır (Whittam ve ark. 1993). Ancak, 2 önemli epidemiyolojik klinik tablodan dolayı EHEC şimdi patojenik *E.coli*'nin ayrı bir sınıfı olarak tanımlanmaktadır. Riley ve ark. (1983) ABD' deki 2 salgının bir nedeni olarak nadiren izole edilen bir *E.coli* serotipi O157:H7' yi tanımlamışlardır. Her iki vaka şiddetli karın ağrısı, sulu ishal ve hafif ateş veya ateşsiz semptomlar ile karakterize ayırt edici gastrointestinal hastalık ile seyretmiştir. Bu semptomlar HC yaygın olarak görülmektedir. Karmali ve ark. dışkıda fekal sitotoksin ve sitotoksin üreten *E.coli* ile HUS' un sporadik olgularını ilişkilendirmişlerdir. HUS genellikle kanlı ishalle seyretmekte ve akut böbrek yetmezliği, trombositopeni ve mikroanjyopatik hemolitik anemiye neden olabilmektedir (Nataro ve Kaper 1998, Karmali ve ark. 1983). EPEC'ten farklı olarak ishal olgularına neden olan enterik patojen *E.coli*' nin bu klinik tabloları yeni bir sınıfın (EHEC) tanımlanmasına yol açmıştır.

Bütün EHEC suşları VT1 ve VT2 olarak da adlandırılan *Stx1* ve/veya *Stx2* üretmektedirler. Shiga toksin üretebilme yeteneği muhtemelen direkt veya indirekt olarak Shigella'dan, bakteriofajla kazanılmaktadır. EHEC grubunun üyeleri Stx üretimine ek olarak virulansı kapsayan diğer bir çok mekanizmaya sahiptir.

Patojenik *E.coli* türleri arasında EHEC virulans özellikleri ve HUS gibi hayatı tehdit eden komplikasyonlar ile ilişkili olmasından dolayı belki en önemlisidir. Oysa, HC ile ilişkili olan EHEC serotipleri de bulunmaktadır (Robins 2005, Kaper ve ark. 2004, Yoon ve Hovde 2008)

Klinik olarak HC ile ilişkili en sık rastlanan EHEC serotipleri O157:H7, O157:H-, O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28'ları içermektedir (Yoon ve Hovde 2008); ancak *E.coli*O157:H7 çoğunlukla kanlı diyare ve HUS ile birlikte anılan bir çeşit EHEC prototipidir (Tarr ve ark. 2005). Somatik (O) antijen O157 ve flagellar H7 ile ifade edilmektedir. Serotip genel olarak insanlardan izole edilmektedir ve genellikle HUS ile ilişkilidir. O157 olmayan suşların neden olduğu HUS'larla ilgili klinik veriler nadir olarak görülmektedir. Son yıllarda, *E.coli*O157:H7 100'den fazla salgına neden olmuştur ve besin kaynaklı patojenler arasında en hızlı gelişen patojenlerden biri olarak gösterilmiştir.

*E.coli*O157:H7, İlk kez 1982 yılında kanlı diyareye neden olan patojen Michigan ve Oregon'daki iki büyük salgında sığır etinde yapılan incelemeler sonucu saptanmıştır (Riley ve ark. 1983) ve 1982'den beri dünya çapında salgınlar halinde görülmekte olan ABD, Kanada, Büyük Britanya ve Avrupa bölgelerinde HC ve HUS'un birincil sebebi olmuştur. Bu patojenin HUS vakalarının yaklaşık %85-95'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Almanya'da *E.coli*O157:H7'nin tüm HUS vakalarının yarısında HUS'la ilişkili olduğu saptanmıştır. Buna karşın Kuzey Amerika'da, *E.coli*O157:H7 HUS vakalarının %95'inin fazlasından izole edilmiştir (Tarr ve ark. 1990). Amerika'da *E.coli*O157:H7 yılda 1 milyondan fazla insanı infekte etmektedir. Bunlardan, %0.5'ine ciddi hastalık teşhisi konulmaktadır, %3'ü hastaneye yatırılmaktadır, %2.9'u ölümlerle sonuçlanmaktadır (Mead ve ark. 1999, Feng ve ark. 2007, Griffin ve ark. 1995). Bu durum EHEC'in çoğunlukla serotip O157:H7 karakteristiği temelinde sınıflandırılmasına yol açmıştır. Ancak diğer EHEC serotipleri arasında bu bölgelerde ve O157:H7 olmayan serotiplerin baskın olduğu coğrafik alanlarda bildirilmiştir. Örneğin, serotip O111:H-(H- hareketsizliği göstermektedir) ve O157:H- Avustralya'da oldukça yaygındır (Goldwater ve Bettelheim 1995) ve orta Avrupa'da yüksek oranda sorbitol-pozitif (sorbitol ihtiva eden kültür besiyerinde fermente olabilen) O157:H bildirilmiştir (Bitzan ve ark. 1993).

EHEC suşlarının diğer serotipleri ise O4:H-, O11:H-, O26:H11, O45:H2, O103:H2, O104:H21, O111:H8, ve O145:H- tır (Beutin ve ark. 1994, Tzipori ve ark. 1988). Vaka oranı az olmasına rağmen, özellikle çocuk ve gençlerde ciddi ve bazen ölümcül sonuçlar doğuran *E.coli*O157:H7 büyük salgınlara da yol açmasıyla en önemli gıda kaynaklı patojenler arasında gösterilmektedir.

2.2.1. Gıdalarla Bulaşan EHEC Salgınları

Kıyma etinin ABD'deki salgınlarla en sık ilişkili yiyecek olduğu bildirilmiştir (Griffin ve ark. 1991). Batı Amerika'da 1992-1993 salgınına da içeren büyük salgınlar 500'den fazla insanı etkilemiştir (CDC 1993). HC enfeksiyonlarının önemli bir kısmı sporadik olup salgınlarla ilişkili değildir. Kıyma etinin bu tür sporadik enfeksiyonlarda önemli bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Pai ve ark. 1988).

Batı ABD'deki *E.coli* O157:H7 salgını, salamurasız konservelenmiş salam ile ilişkilendirilmiş ve bu organizmanın asidik ve fermente edilmiş ette yaşayabilmek hastalığa sebep olabildiği gösterilmiştir (Tilden ve ark. 1996). Avustralya'daki bir HC ve HUS salgınının bozulmuş sucuk tüketiminden kaynaklandığı ve O111:H- ve O157:H-serotiplerinin hastalardan izole edildiği bildirilmiştir. Bir veya daha fazla Shiga toksin üretebilme yeteneğinde olan *E.coli* izolatları et, kümes hayvanları ve deniz ürünlerinden kolayca izole edilebilmektedir; ancak bu izolatların çoğunun patojenik EHEC'le ilişkili virulans faktörleri taşımadıkları bildirilmektedir (CDC 1995).

Dünya çapındaki EHEC salgınlarıyla ilişkili birçok gıda bulunmaktadır (Çizelge 2.1). Lokal ve genel salgınlar da pastörize edilmemiş elma suyu ve şarabın oldukça önemli olabileceği bildirilmiştir. Bin dokuz yüz seksen yılındaki bir HUS salgınının bugün taze elma suyuyla alakalı olduğu ve EHEC tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir. EHEC salgınlarının önemli bir kısmında kaynak belirlenememiş olsa da, lokantalarda gıda tüketimi ile spesifik olmayan bir ilişki sıkça kurulmuştur. Bu durum EHEC'in ikincil olarak insandan insana veya hayvandan insana yayılmasına kısmen bağlanabilmiştir. Örneğin, *E.coli* O157:H7'nin Shigella ile benzer şekilde enfeksiyon kaynağı olarak kreşlerle alakalı olabileceği bildirilmiştir. Bugüne dek en büyük *E.coli*O157:H7 salgını 1996'da Japonya'nın Sakai şehrinde gerçekleşmiştir (Watanabe ve ark. 1996). Çoğunluğu çocuk olan binlerce insan, okulda dağıtılan öğle yemeği sırasında kontamine olmuş turp filizinden hastalanmıştır. Amerika'daki en büyük salgın az pişirilmiş hamburgerlerin tüketimiyle gerçekleşmiştir. Bu salgından 732 insan etkilenmiştir. Bunların 55'inde HUS gelişmiştir (genellikle çocuklarda). Washington, Idaho, Nevada ve California'da 4 ölüm gerçekleşmiştir (Bell ve ark. 1994, Rump ve ark.). İskoçya'da, 1996'da Avrupa'nın en büyük salgınlarından birinde 501 insan patojenle infekte olmuştur ve 20'si bunun sonucunda ölmüştür. Şaşırtıcı bir şekilde *E.coli*O157:H7'nin tek bir kasaptan alınan dana

etinde olduğu saptanmıştır (Dundas ve ark. 2001). Almanya'da O157 hem insanlardan hem de hayvanlardan izole edilmiştir; ancak sadece bir iki salgın bildirilmiştir (Beutin ve ark. 1999). Almanya'daki en büyük HUS salgını 1994-1995'te kontamine olmuş sosislerin tüketilmesiyle gerçekleşmiştir. Yaklaşık 300-400 insan bu salgından etkilenmiştir, 28 HUS vakası görülmüştür (çocuklarda) ve ölen olmamıştır (Ammon A. ve ark. 1999). Bir sağlık merkezinde 1992 yılında 39 çocuk ve 2 yetişkinin dahil olduğu bir salgın görülmüştür (3 HUS ve 1 ölüm) (Reida ve ark. 1994). Amerika'da 2006'dan bu yana çok eyaletli 8 salgın gerçekleşmiştir. Sekiz salgından 5'i et ürünlerinin tüketilmesiyle ilişkilendirilmiştir (CDC 2010a). Buna karşın, et ürünlerinden daha az oranda salgına neden olan kurabiye hamuru (2009), ıspanak (2006) veya Almanya'da STEC *E.coli*O104:H4 suşu taşıyan çemen tohumu ve filizleri (BfR, BVL, RKI 2011), son zamanlarda görülen salgınların nedenleri arasındadır. *E.coli*O157:H7'nin baskın aracı sığır ürünleridir, buna rağmen, çiğ süt, sebze ve hatta su bu patojenin araçları arasında gösterilmektedir. *E.coli*O157:H7, bilinmeyen suşların yiyecekleri tehdit eden major patojenlere dönüşebileceğini gösteren önemli bir örnektir. Ayrıca nadiren görüldüğü düşünülen serotip O104:H4, dünya çapında görülen en büyük salgınlardan birine yol açmıştır. Almanya'da görülen bu salgında 4000'den fazla kişi hastalanmıştır ve 50 kişi ölmüştür (BfR, BVL, RKI 2011). Salgınları engelleyebilmek için, besinlerde ve insanlarda bulunan *E.coli*O157:H7 ve diğer STEC'lerin çok hızlı bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir. Çünkü hızlı ve doğru EHEC tanı yöntemleri hayat kurtarıcı olabilmektedir. Dünya çapında insan yaşamını tehdit eden salgınları önlemek için güncel ve gelişmekte olan patojenleri doğru şekilde tespit etmek önemlidir.

Gıda kaynaklı *E.coli*O157:H7 salgınlarının bulaşıcı dozunun (2-2.000 hücre) oldukça düşük olduğu bildirilmiştir. Bu durum organizmanın asit toleransı ile ilgili bir özelliğidir. Salgınla ilişkili *E.coli*O157:H7 suşlarının artmış asit toleransına sahip olduğu öne sürülmektedir (Buchanan ve ark. 1996). Ancak *E.coli*O157:H7'nin sorbitolu fermente edememesi virulansı ile ilişkili değildir (Fratamico ve ark. 1993).

Çizelge 2.1. *E.coli* O157:H7 salgınlarıyla ilişkili şüpheli gıdalar (Buchanan ve Doyle 1997)

Az pişmiş dana eti
Çiğ süt
Pastorize edilmemiş elma suyu/şarabı
Kurutulmuş salam
Marul
Gübrelenmiş bahçeden üretim
Ambalajlanmış patates
Turp filizi, yonca filizi
Yoğurt
Sandviçler
Su

2.3. *E.coli* O157:H7 Kaynak ve Rezervuarları

*E.coli*O157:H7'nin birçok rezervuar ve kaynakları tespit edilmiştir. Sığırlar *E.coli* O157:H7 açısından primer rezervuar olmalarına rağmen, keçi ve koyun gibi hayvanlar da bu patojen açısından taşıyıcı olabilmektedirler (TeinMüller ve ark. 2006). Bakteri; sığırın kalın barsak ve rektumunda kolonize olmaktadır, sığırlarda kolonizasyon oranının %10-80 arasında değiştiği bildirilmektedir. İlginç olarak sığırlar *E.coli*O157:H7 ile asemptomatik bir şekilde kolonizedir. Fakat bazen genç buzağılarda ilk başta ishale yol açabildiği, sonrasında ise asemptomatik tarzda kolonize oldukları bildirilmiştir. Sığırlardaki bu asemptomatik kolonizasyonun ve komplikasyonların gelişmemesinin sebebi olarak vasküler endotelial hücrelerin yüzeyindeki önemli bir reseptörün eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunun yanında son dönemlerde yapılan çalışmalarda *E.coli*O157:H7 kolonizasyonunun sığır ve diğer geviş getirenler için yararlı olabileceği bildirilmiştir (Hussein ve Sakuma 2005).

Sığırların aksine insanlar fekal-oral yol ile gıdalarla bulaşan *E.coli* O157:H7 infeksiyonuna duyarlıdır (Moxley 2004).

E.coli O157:H7'nin az pişmiş kıyma eti ve çiğ süt ile ilişkisi sığırın patojen rezervuarı rolünün araştırılmasına neden olmuştur. *E.coli*O157:H7'nin fekal yolla bulaşması ile ilgili pek çok araştırma aşağıdaki genel gözlemleri ortaya koymuştur:

- Genç hayvanlar yetişkinlerden daha sıkça *E.coli*O157:H7 taşıma eğilimindedirler (Zhao ve ark. 1995).
- Fekal atılım frekansı hayvandan hayvana oldukça yüksek oranda değişiklik göstermektedir (Zhao ve ark. 1995).
- *E.coli*O157:H7 tespit etmede kullanılan prosedürlerin hassasiyetleri arasındaki farklar sebebiyle, sığırlar arasındaki rapor edilmiş insidans geniş bir çeşitlilik göstermektedir.
- ABD'deki iki önemli araştırmanın sonuçlarına göre 965 mandıra buzağısının 31'i (%3.2) (Zhao ve ark. 1995) ve 11.881 besi sığırının 191'i (%1.6) *E.coli*O157:H7 açısından pozitif bulunmuştur. Buna ek olarak %0.4'lük oranda besi sığırlarının *E.coli*O157:H- açısından pozitif bulunduğu bildirilmiştir (USDA/APHIS 1995).
- Buzağı dışkıdaki *E.coli*O157:H7 seviyesi $<10^2$ CFU/g - 10^5 CFU/g arasında değişmektedir (Zhao ve ark. 1995).
- *E.coli*O157:H7'nin fekal yayılımı sık aralıklı ve birkaç haftadan birkaç aya kadar değişen kısa süreler içinde gerçekleşmektedir (Brown ve ark. 1997).
- Değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE) yöntemiyle *E.coli*O157:H7 suşlarının benzer genomik DNA profilleri farklı şehirlerdeki veya çiftliklerdeki buzağılardan izole edilebildiği bildirilmiştir (Faith ve ark. 1996).
- Birden fazla *E.coli*O157:H7 suşu aynı hayvanın dışkısından veya aynı ağıldaki farklı hayvanların dışkısından izole edilebilmektedir (Faith ve ark. 1996).

Buzağılar deneysel olarak *E.coli*O157:H7 ile enfekte edilmiş (Brown ve ark. 1997) ve sonuçlar aşağıdakileri açığa çıkarmıştır:

- *E.coli* O157:H7 buzağılarda patojenik değildir; 10^{10} CFU düzeyindeki mikroorganizma inokülasyonunun klinik açıdan hastalığın oluşmasını indüklediği görülmüştür.
- Dışkıdaki *E.coli* O157:H7 yayılımı inokülasyon sonrası ilk 14 günde önemli ölçüde azalmıştır (Örn; 48 saatte 10^4 ila 10^6 CFU/g'den 14 günde $5 \cdot 10^2$ CFU/g'a).

- *E.coli*O157:H7 gastrointestinal sistem ve ön mide ile sınırlıdır (rumen, omasum ve retikulum) ve distal bölgeler (distal ileum, proximalcecum, spiral kolon ve desendan kolon) lokalizasyonun başlıca yerleridirler.
- Açlık çoğunda olmasa da bazı hayvanların dışkıdaki *E.coli*O157:H7 seviyelerini arttırmaktadır.
- *E.coli*O157:H7 mukozal yüzeylere kolonize olmamaktadır.

Buzağı ve danaların 10^{10} *E.coli*O157:H7 ile oral inokülasyonu serum antikorlarında O157 antijenik lipopolisakkaritin ve daha düşük seviyelerde *Stx1*'in hızlı ve sürekli artışını indüklemektedir (Johnson ve ark. 1996). Ancak serolojik yanıtlar, sığırlar tarafından taşınmanın ortadan kalkması veya aynı suş ile tekrar enfeksiyona karşı buzağuları koruma ile ilişkili değildir. *E.coli*O157:H7'nin persiste olma yeteneği ve sığırın tekrar enfekte olması güçlü bir immün yanıtın oluşmasına sebep olmaktadır.

Yeni *E.coli*O157:H7 araştırmaları geyiğin bir patojen kaynağı olduğunu ve geyikle sığır arasında patojen transmisyonu olabileceğini belirlemiştir (Keene ve ark. 1997). Örneğin, kontamine geyik eti içeren yeni bir salgında, *E.coli* O157:H7 ile benzer özgün Değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE) profili, insan vakalarından, artan etten, aynı geyikten pişirilmemiş etten, gövdeyi kesmede kullanılan bıçaktan ve geyiğin saklanan parçalarından izole edilmiştir. Teksas'taki çiftliklerden alınan geyik ve sığır dışkı örneklerinde aynı Shiga toksini üreten *E.coli*O157:H7 izolatları elde edilmiştir (Rice ve ark. 1995).

Küçükbaş hayvanlardan koyunların da bir *E.coli*O157:H7 rezervuarı olduğu tanımlanmıştır. Sağlıklı koyunlarda yapılan altı aylık bir çalışma sonunda, Haziran ayında koyunların %31'inin pozitif olması, Ağustosta %5.7'sinin pozitif olması ve Kasımda hiçbirinin pozitif olmaması ile fekal yayılımın geçici ve mevsimlik olduğu açığa çıkarılmıştır. Koyun, çalışma boyunca hiçbir hastalık belirtisi göstermemiştir. Ağızdan alınan 10^9 *E.coli*O157:H7 uygulanan hayvanlar bakteriyi 92 güne kadar dışkıyla yaymıştır. Yayılım yapan koyun *E.coli*O157:H7'yi, inokülasyon yapılmamış ağıldaki diğer koyunlara bulaştırmaktadır. Diyet *E.coli*O157:H7'nin fekal yayılmasını etkilemektedir. *E.coli*O157:H7 negatif bir koyun tutulduğu yerden çıkarılınca ve besinleri yonca pelletlerinden adaçayı ve ot demetlerine değiştirilince koyunun bakteri yaymaya başladığı tespit edilmiştir (Kudva ve ark. 1996).

İçme ve eğlence suları pek çok *E.coli*O157:H7 enfeksiyon salgınının aracısı olmuştur (Dolye ve ark. 1997). Cabool, Missouri'de Aralık 1989- Ocak 1990 tarihleri arası meydana gelen, 4'ü ölüm, toplam 243 vakayı içeren büyük bir salgının şebeke suyunun kontaminasyonu sonucu oluştuğu bildirilmiştir (Swerdlow ve ark. 1992). Aşırı soğuk hava sebebiyle arızalanan iki ana su borusu ve topraktaki su sayaçlarının salgına katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Portland, Oregon'da 1991 yılında 21 *E.coli*O157:H7 enfeksiyonu vakasının göl kıyısı olan bir parkta yüzülmesinden kaynaklandığı gösterilmiştir (Keene ve ark. 1994). Tuvalet eğitimi bile almamış çocuklar dahil yüzenler, fekal kirlenmiş göl suyu yutmuşlardır. Suyun sığırlar arasında *E.coli*O157:H7 bulaşmasında rol oynadığı öne sürülmüştür (Faith ve ark. 1996).

2.4. *E.coli* O157:H7' nin Üremesini ve Hayatta Kalmasını Etkileyen Faktörler

Tüm bakteriler gibi gıdadaki *E.coli*O157:H7'nin hayatta kalma ve gelişimi sıcaklık, pH ve su aktivitesi gibi pek çok iç ve dış faktörün etkileşimine bağlıdır.

2.4.1. Sıcaklık

Sıcaklığa O157:H7 serotipleri dışında ki EHEC suşları, EHEC olmayan suşlarla aynı şekilde tepki vermektedir. *E.coli* diğer *Enterobacteriaceae* grubu üyelerinden (gram-negatif, katalaz-pozitif, oksidaz-negatif, fakültatif anaerobik aile) 44.5°C'de EC (*E.coli*) broth'ta üreme ve gaz üretimi temelinde ayrılmaktadır. Ancak pek çok O157:H7 izolatu, 44°C'nin üstünde iyi ürememektedir (Dolye ve M.P. 1984). *E.coli*O157:H7 üremesi için en üst sıcaklığın kültür besiyerine bağlı olduğu bildirilmiştir. Sözelimi 45°C beyin kalp infüzyonu (BHI) broth'ta bütün suşların iyi ürediği, fakat EC (*E. coli*) broth'ta 16 suşun 6'sının ümediği bildirilmiştir (Palumbo ve ark. 1995). Optimal koşullar sağlandığında *E.coli*O157:H7 için minimum üreme sıcaklığı yaklaşık 8-10°C'dir (Rajikowski ve ark. 1995). Sıcaklığın *E.coli* biyotip 1 ve EHEC'in ikisinin de gelişme oranlarına etkisi belirlenmiş ve gelişme kinetiklerini etkileyen pH, su aktivitesi ve sodyum nitratla sıcaklığın etkileşiminin nasıl olduğunu açıklayan matematiksel modeller geliştirilmiştir (Sutherland ve ark. 1995).

2.4.2. pH

Üreme oranı pH 5.5 ve 7.5 arasında benzer olup, düşük pH değerlerinde üreme hızla azalmaktadır. *E.coli* gelişimi için minimum pH'nın 4.0-4.5 olduğu bildirilmiştir (Buchanan ve ark. 1994). Bu durum pH'nın diğer üreme parametreleriyle etkileşimine bağlıdır, örneğin ilave stres üreme için minimum pH'yı arttırmaktadır. Asit tipi (organik ve inorganik) ve asit konsantrasyonu pH'nın *E.coli* gelişimi üzerindeki etkisini etkilemektedir.

Söz gelimi sığır etinde, *E.coli*O157:H7 üzerinde organik asitlerin inhibitör aktivitesinin ilişkisinin asetik > laktik \geq sitrik olduğu bildirilmiştir (Abdul-Raouf ve ark. 1993).

PH büyüme için gerekli olan minimum seviyenin altına düştüğü zaman *E.coli*O157:H7 popülasyonu zamanla azalmaya başlamaktadır. Pek çok salgının fermente sosis, elma şarabı ve elma suyu gibi asidik gıda içinde düşük seviyede hayatta kalan *E.coli*O157:H7 ile ilişkilendirildiği için, patojenin asidik gıdalarda hayatta kalması oldukça önemlidir. Patojenin mayonez (Zhao ve ark. 1994), sosis (Clavero ve ark. 1996), elma şarabı (Zhao ve ark. 1993), ve çedar peyniri (Reitsma ve ark. 1996) dahil çeşitli asitli gıdalarda birkaç haftadan birkaç aya kadar hayatta kaldığı deneysel olarak gösterilmiştir. Dondurucuda saklandığında bu gıdalarda mikroorganizmanın hayatta kalma süresi büyük ölçüde uzamaktadır. Örneğin, patojen 25°C'de elma şarabında sadece 2-3 gün hayatta kalırken, bu süre 8°C'de 10-31 güne kadar uzamaktadır (Zhao ve ark. 1993). EHEC suşlarının yüksek derecede asit toleransı vardır, 37°C'de ve pH 2.5'te; 2-7 saat bırakıldığında hemen hemen hiç değişmeden hayatta kalabilmektedirler (Buchanan ve ark. 1996). Ancak asite duyarlı EHEC suşlarının varlığı da tespit edilmiştir. Diğer yandan asit-toleranslı, enterohemorajik olmayan suşlar da belirlenmiştir, yani bu durum patojenik izolatlar için benzersiz bir karakteristik özellik değildir.

E.coli'de asit toleransının, gelişme evresine bağlı ve indüklenebilir karmaşık bir olgu olduğu düşünülmektedir. Gelişmenin durağan evresindeki *E.coli* hücreleri aside büyüme evresindeki hücrelerden oldukça fazla tolerans göstermektedir. Bu artan tolerans *rpoS* sigma faktör operonuyla regüle edilen genlerin ekspresyonu ile ilişkilidir (Cheville ve ark. 1996). Bir çalışmada *E.coli*'de asit direncinin oksidatif, arginine bağlı ve glumata bağlı üç mekanizması incelemiş ve üçünün de mikroorganizmanın tam asit toleransına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. (Lin ve ark. 1996).

E. coli'deki asit toleransının induksiyonu asidik gıdalar içinde hayatta kalmasını arttırabilmektedir (Cheville ve ark. 1996, Leyer ve ark. 1995). Eğer hücreler dondurucuda depolanırsa, asit toleranslı durum uzun süre (≥ 28 gün) devam etmektedir. Asit toleransı induksiyonu organizmanın diğer streslerle hayatta kalabilme yeteneğini de arttırmaktadır. Yeni araştırmalar asit toleransı induksiyonunun mikroorganizmanın ısıtılmaya, radyasyona ve antimikrobiyallere direncini de arttırdığını ortaya koymuştur (Rowbury 1995). *E. coli*'nin ayrıca bir indüklenebilir alkali toleransı cevabına sahip olduğu bulunmuştur (Rowbury ve ark. 1996).

2.4.3. Su Aktivitesi

Su aktivitesinin *E.coli* O157:H7'nin hayatta kalma ve gelişmesine etkisi üzerine araştırmalar ilk olarak sodyum kloridin etkisi üzerine yoğunlaşmış olsa da *E.coli* O157:H7'nin diğer *E.coli*'lere benzer şekilde davrandığı düşünölmektedir. Sodyum klorür (NaCl) konsantrasyonu (%0.5-5.0) ile sıcaklık, pH ve sodyum nitrat (NaNO₂)'ın *E.coli* O157:H7'nin gelişme kinetiği üzerine etki ve etkileşimleri için bir matematiksel model geliştirmiştir (Buchanan ve ark. 1994). Nem tutucu olarak mannitol, sorbitol ve sükrözün etkilerini karşılaştırılmış ve nem tutucu farklarının sınırlı a_w değerlerde oluşurken nem tutucu arasındaki farkların a_w 0.98'de minimal olduğu sonucuna varılmıştır (Buchanan ve ark. 1997). Yüksek NaCl seviyesinde üreyen *E.coli* termotoleransı ve hidrojen peroksit (H₂O₂) direncinin artışı ile ilişkili *rpoS* geni ekspresyonunu indöklmektedir (Hengge-Aronis ve ark. 1993). *E.coli* O157:H7 özellikle soğutma sıcaklığında kurutulduğunda haftalarca hayatta kalabilmektedir (Bağı ve ark. 1993).

2.4.4. Gıdaların İşlenmesi

*E.coli*O157:H7'nin varlığı geleneksel ısı teknikleri kullanımı ile kolayca kontrol edilebilmektedir. Ancak organizmanın hayatta kalabilecek çok düşük dozu bile infeksiyöz olabilmeye yeterli olabilmektedir. *Coxiella burnetti*'yi elimine etmek için tasarlanan mandıra pastörizasyon işlemleri *E.coli* O157:H7'yi ortadan kaldırmak için de yeterli olabilmektedir. Benzer şekilde pastörizasyon işlemleri meyve suları içindeki *E.coli* O157:H7'nin kontrolü için de yapılmaktadır.

D-değeri (ondalık azalma süresi veya popölasyonun %90'ını yok etmek için gereken zaman) çeşitli kıyma et ve kümes hayvanı ürünlerinde birkaç farklı sıcaklıkta

tespit edilmiştir (Ahmed ve ark. 1995, Doyle ve ark. 1984, Line ve ark. 1991). Örneğin, kıyma et ürünlerinde serotip O157:H7 için $D_{60^{\circ}\text{C}}$ değerlerinin 0.4-0.8 dk arasında değiştiği bildirilmiştir.

D-değeri kıyma et ürünleri arasında bazı derecelerde değişmektedir, ancak termal direnç yağ içeriğinden çok fazla oranda etkilenmektedir. Yani daha yüksek yağ içeriği, daha fazla termal direnç anlamına gelmektedir. Elma suyunda (pH 4.0) *E.coli*O157:H7 için $D_{60^{\circ}\text{C}}$ 'nin 0.4 dk. olduğu bildirilmiştir (Splittstoesser ve ark. 1995). Isı şokunun termal direnci ve anaerobik inkübasyonun ısınan hücrelerin düzelmesini arttırdığı bildirilmiştir. (Murano ve ark. 1993). Soğutucuda tutulan hücrelerin donmuş durumdan direkt ısıtılan hücrelerden daha hassas olduğu bildirilmiştir (Jackson ve ark. 1995). Artan pH değerleri (pH 10-11) *E.coli*O157:H7'nin termal yıkımını arttırmaktadır (Teo ve ark. 1996). Çiğ sütle ilişkili salgın araştırmaları süt ürünleri içindeki *E.coli* O157:H7 varlığına yönlendirmiştir. *E.coli* O157:H7'nin bulaşan sütte peynir (Arocha ve ark. 1992) ve çedar peynirinin (Reitsma ve ark. 1996) üretimi esnasında dahi canlılığını devam ettirdiği bildirilmiştir. Mikroorganizma sütün pastörize edilmesi ile kolayca inaktive edilmekte ve çedar peynirinin yıllanması esnasında titrelerinin düştüğü bildirilmiştir.

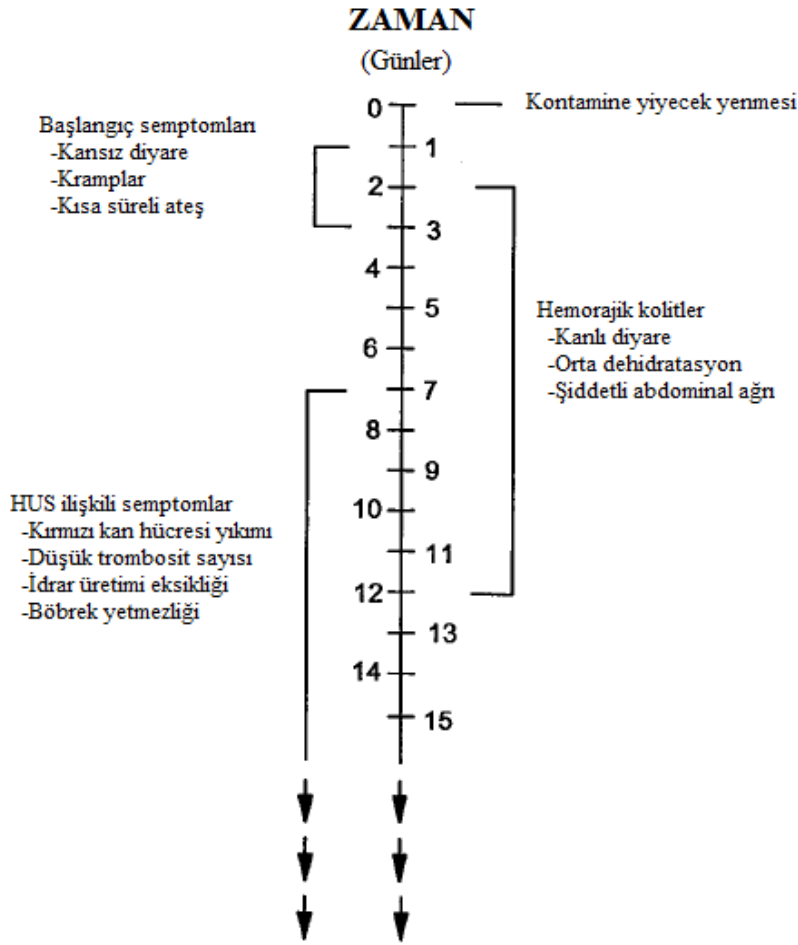
Gıdanın çiğ karakterini korurken *E.coli*O157:H7'yi giderebilen veya kontrol edebilen termal işlemlere alternatif yöntemler halen araştırılmaktadır. Özellikle et ve kümes ürünleri için uygulanan yöntemlerden birisi iyonize radyasyon yöntemidir. Patojen nispeten radyasyona duyarlı olup 1.5-3.0 kGy radyasyon-pastörizasyon dozunun kıyma ette mikroorganizmanın eliminasyonu için yeterli olduğu bildirilmiştir (Clavero ve ark. 1994, Thayer ve ark. 1993). Radyasyon inaktivasyonu sıcaklığa bağlı olup kıyma et donma ısılarında ışınlandığı zaman yüksek dozda radyasyon gerektirmektedir. Yeni çalışmalardan (Buchanan ve ark., yayımlanmamış bilgi) elma şarabının düşük dozda ışınlanmasının etkili olduğu bildirilse de meyve ve sebze ışınlanmasının *E.coli*O157:H7'yi kontrol yeteneği üzerine çok az veri bulunmaktadır.

E.coli O157:H7 ile ilgili gıda işleme araştırmaları hayvan kaynaklı ürünlerde yoğunlaşmışken meyve ve sebze ile ilişkilendirilen salgın sayısı artmaktadır. Üremeyi destekleyen sıcaklıklarda depolanma halinde *E.coli*O157:H7 suşlarının pek çok sebze ürettiği bildirilmiştir. (Abdul-Raouf ve ark. 1993). Üretimde yaygın olarak kullanılan değişen atmosferlerde paketleme, *E.coli* O157:H7 üremesini inhibe etmektedir. (Abdul-Raouf ve ark. 1993, Hao ve ark. 1993).

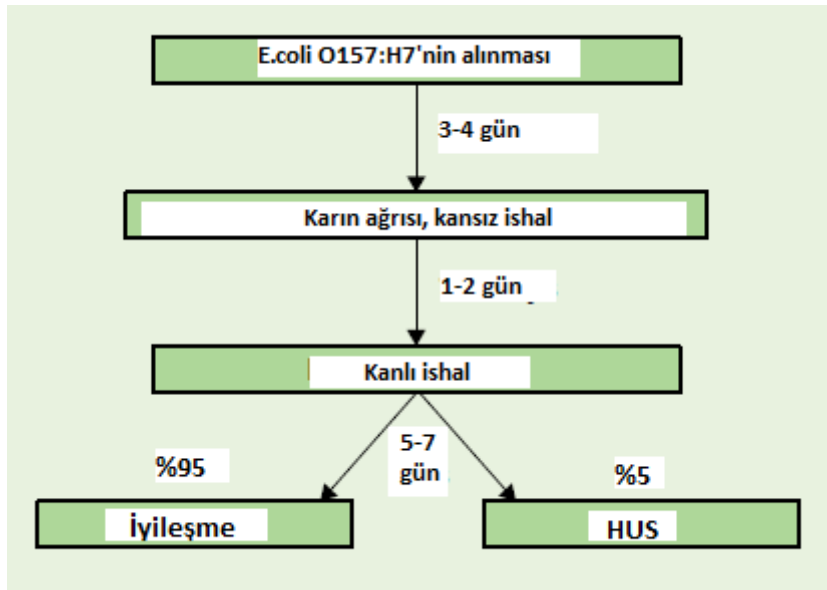
Gıda işlenmesi ve hazırlık uygulamaları *E.coli*O157:H7 infeksiyonuna karşı katkıda bulunabilmektedir. Dana kıyması ile ilişkili *E.coli*O157:H7 salgınlarında az pişirme önemli bir faktördür. Yemek servisi ve ev hazırlığında gıda işleme prosedürlerine uymanın *E.coli* O157:H7 infeksiyonunu önlemede önemli olduğu bildirilmektedir. Enfekte olmuş gıda işleyicileri *E.coli*O157:H7 infeksiyonları için odak oluşturabilmekte, özellikle infeksiyonun ilk 48 saati içinde hastalık semptomları hala nispeten hafif olan veya görülür şekilde kanlı dışkıya sahip olmayan bireyler önemli infeksiyon odağı olabilmektedirler.

2.5. *E.coli*O157:H7 Klinik Tablosu

E.coli O157:H7 infeksiyonlarının semptomları belirgin olmasına rağmen, herhangi bir fazda diğer hastalıklarla karıştırılabilmektedir (Tarr 1995). *E.coli* O157:H7 oral yolla vücuda alındığında konakta bir toksik-infeksiyon başlatabilmektedir (Riley 1987, Yoon ve Hovde 2008). Patojene ilk maruziyetten sonra 1-8 gün kuluçka dönemini takiben belirti ve bulgular gelişmeye başlamaktadır (Şekil 2.1, Şekil 2.2). Bazı durumlarda ise 1-2 gün içinde, hastalık HC'ye ilerleyebilmektedir (Riley 1987, Yoon ve Hovde 2008). *E.coli* O157:H7 ile infekte bazı bireyler asemptomatik olmasına rağmen veya infeksiyonun hafif klinik bulguları ile seyretmesine rağmen infeksiyon gelişen tipik olgularda genellikle bulantı ve kusmaya eşlik eden karın ağrısı ve sulu ishalin geliştiği görülmektedir. İshal; başlangıcından 24- 48 saatte şiddetini arttırmakta ve 4-10 güne kadar belirgin kanlı ishale dönüşmektedir ve bu durum vakaların %80'inde görülmektedir. Bu noktada ağır kanlı ishal ile bağlantılı olarak şiddetli karın krampları ortaya çıkmaktadır. Ayrıca ateşin olmayış veya sadece çok düşük dereceli ateş varlığı HC'nin bir başka özelliğidir.



Şekil 2.1. *E.coli* O157:H7 enfeksiyonu (Hemorajik kolitler) ve birincil komplikasyonları (Hemolitik Üremik Sendrom, HUS) (Buchanan ve Doyle 1997)

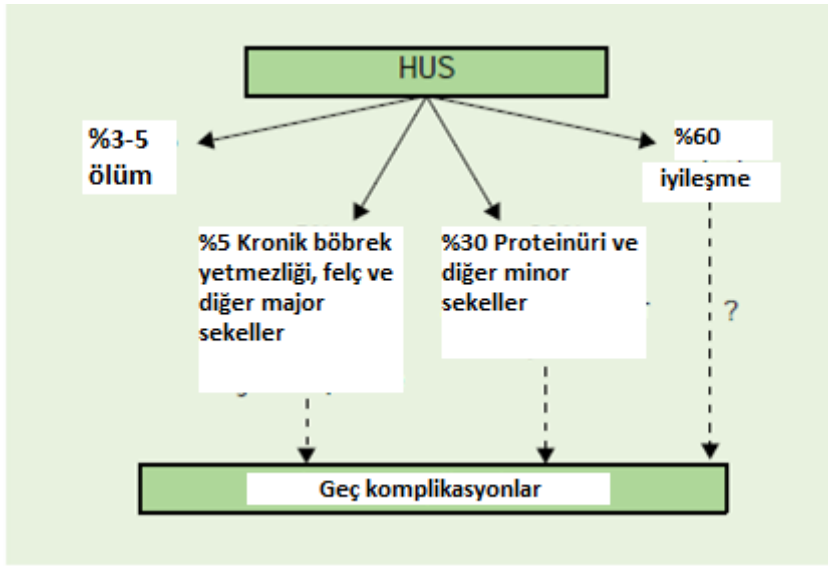


Şekil 2.2. *E.coli* O157:H7 enfeksiyonunun doğal seyri (Mead ve Griffin 1998)

Hastalık şiddetli ağrılarla seyretmesine rağmen genellikle kendi kendini sınırlamakta ve yaklaşık 1 hafta içinde kendi kendine düzelmektedir. Ayrıca HC belirtileri öncelikle Shiga toksin adı verilen güçlü sitotoksin nedeniyle olduğu için antibiyotik tedavisi özellikle *E.coli* O157:H7'nin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde hastalığın ve komplikasyonların şiddetini arttırabilmektedir (Ceponis ve ark. 2005, Bielaszewska ve Karch 2005). Bu nedenle *E.coli* O157:H7 infeksiyonunda antibiyotik tedavisi genellikle önerilmemektedir; çünkü antibiyotikler barsak kommensal bakterilerini ortadan kaldıracığı gibi shiga toksin salınımını da arttırmaktadır. Artan konsantrasyondaki shiga toksin daha sonra dolaşıma girebilmekte ve böbrek hasarına veya diğer önemli sistemik etkilere yol açabilmektedir. Fakat antibiyotik tedavisi verilmemesi de özellikle çok genç veya yaşlı popülasyon için sadece HC'nin bir sonucu olarak ciddi komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir (Ceponis ve ark. 2005).

HC, başta HUS olmak üzere ciddi komplikasyonlara yol açabilmektedir. HUS öncelikle çocukları ve yaşlıları etkileyen bir böbrek hastalığı olup çocukluk çağı akut böbrek yetmezliğinin en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir. HC gelişen hastaların %5-10'unda HUS geliştiği tahmin edilmektedir (Yoon ve Hovde 2008). HUS gelişen kişiler arasında mortalite oranının %3-5 gibi oranlarda seyrettiği bildirilmiştir (Şekil 2.3). HUS'un başlangıcı genellikle gastrointestinal semptomların başlangıcından yaklaşık olarak bir hafta sonra ortaya çıkmaktadır. HUS gelişen hastaların çoğunda diyaliz, transfüzyon veya böbrek nakli gerektiren durumlar gibi ciddi ve kalıcı böbrek hasarları meydana gelmektedir. HUS böbrek endotel hücrelerini tutmakta, akut böbrek yetmezliği, üremi, azalmış trombosit sayısı (trombositopeni) ve kırmızı kan hücrelerinin introvasküler yıkımı yani mikroangiopatik hemolitik anemi, gelişmesiyle ayırt edilmektedir. Ayrıca solukluk, idrar oluşturmada eksiklik (oligo-anüri), üremi ve ödem HUS'un karakteristik semptomları arasında sayılabilmektedir. Böbrekte meydana gelen hasardan başlıca shiga toksinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu sitotoksinler kan damarlarını kaplayan glomerüllerde, trombosit ve fibrinin damar içi pıhtılaşmasına neden olmakta ve glomerüler endotel hücrelerinde protein sentezini durdurmaktadır. Bu koagülasyon glomerülleri tıkamakta ve akut böbrek yetmezliğine yol açan tüm filtrasyonu azaltmaktadır (Rile 1987, Winn ve ark. 2006, Lippincot ve ark. 2008, Kaper 1998). HUS ile ilişkili diğer komplikasyonlar arasında inme, koma, kolon perforasyonu, pankreatit ve hipertansiyon yer almaktadır. Vakaların yaklaşık %15'inde erken kronik böbrek yetmezliği gelişmektedir.

HUS hastalarında, insüline bağlı diabet de görülebilmektedir. Az sayıda HUS hastasında tekrarlar görülebilmektedir (Siegler ve ark. 1993).



Şekil 2.3. İshal sonrası HUS'un doğal seyri (Mead ve Griffin 1998)

Nadiren HC trombotik trombositopenik purpura (TTP) olarak bilinen; HUS ile bazı semptomları benzeyen hastalığa da dönüşebilmektedir. TTP çocuklardan ziyade yetişkinleri daha sık etkilemesinin dışında HUS ile benzerdir. Ek olarak HUS böbrekte tahribat yaparken, TTP'de şiddetli baş ağrısı, kasılmalar, uyuşukluk ve ensefalopatinin eşlik ettiği nörolojik semptomlar görülmektedir (Yoon ve Hovde 2008).

2.6. *E.coli* O157:H7 Virulans Faktörleri

*E.coli*O157:H7 infeksiyon dozunun diğer enterik patojenlerden daha düşük (1-100 cfu/ml) olduğu bildirilmiştir. Düşük bulaşıcı doz, *E.coli*O157:H7'nin güçlü virulansına örnek teşkil etmektedir ve bu mikroorganizmanın virulansı öncelikli olarak 3 büyük virulans faktörün faaliyetlerinden kaynaklanmaktadır (Welinder ve Kaijser 2005).

İlk ve günümüze kadar bilinen en önemli virulans faktörü *Stx-1* ve *Stx-2* adı verilen shiga toksinlerin (*Stxs*) birinin veya her ikisinin üretilmesidir (Orth ve Wurnzer 2006). Bu *Stx*'ler ökaryotik hücreleri etkilediği bilinen en güçlü sitotoksinler arasında yer almaktadır. Her *Stx* tek bir A altbirimden (32 kDal) ve beş B altbirimden (7.7 kDal) oluşan 70.000 daltonluk bir proteindir (Robins 2005). Bu nedenle AB5 toksin ailesinin üyeleridir. B alt unit konağın çeşitli endotel ve epitel hücrelerinin yüzeyinde yer alan

globotriaosylceramide (Gb3) reseptörlerine bağlanmaktadır (Robins-Browne 2005). A altbiri ise 28S ribozomu inaktive eden N-glikosidaza sahip olup protein sentezini engellemektedir. *Stx1*, *Shigella dysenteriae* tarafından üretilen *Stx* ile hemen hemen aynı olup (Riley 1987) sadece bir aminoasit bakımından farklılık göstermektedir (Robins-Browne R. 2005). Oysa *Stx2* bu iki toksinden çok daha fazla virulan özelliğindedir (Bielaszewaka ve Karch 2005). Örneğin, *E.coli* O157:H7 *Stx*'lerden birini veya ikisini üretebilmektedir; sadece *Stx2* üretimi yapan suş, tek başına *Stx1* üreten veya aynı anda hem *Stx1* hem de *Stx2* üreten suştan daha virulan özellik göstermektedir (Li ve Hovde 2007). Hem *Stx1* hem de *Stx2*'ye sahip olan *E.coli*'nin bir suşu ile oral olarak infekte edilmiş farede, *Stx2* üretiminin mortalite sebebi olduğu bildirilmiştir (Wadolowski ve ark. 1990). Sadece *Stx2* üreten STEC insanlarda HUS gelişmesinin en önemli sebebi olarak görülmektedir (Ostroff ve ark. 1989). Bunun yanında, *Stx1*, *Stx1c* ve *Stx1d* ayrıca *Stx2*, *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2d* (aktive edilebilir), *Stx2e* ve *Stx2f* dahil olmak üzere her bir *Stx*'in çeşitli değişik formlarının olduğu bildirilmiştir (Chart 2000). Bu varyantların gücü yanında aktivitelerinde de farklılık bulunmaktadır. Örneğin, *Stx2e* genelde domuza etki etmekte ve Gb4 reseptörlerine bağlanmaktadır (Li ve Hovde 2007). *Stx2c* ve *Stx2d* ise daha yaygın olarak insanlarda HC ve HUS'a neden olmaktadır. Bu toksinler ayrıca tümör nekroz faktörü (TNF- α) gibi sitokin salarak indirekt olarak hücrelere zarar verebilmektedir. Ancak üretilen *Stx* tipi doğrudan hastalığın şiddetini etkilemesine rağmen, insanlardan izole edilmiş non-patojenik, *stx*-pozitif izolatlarda görüldüğü gibi tek başına *Stx*'lerin üretimi bir toksikoinfeksiyon oluşturmak için yeterli değildir (Welinder ve Kaijser 2005). Ayrıca, LEE (*locus of enterocyte effacement*) yardımı ve pO157 plazmidini gerektirmektedir.

LEE özel virülans faktörlerinin bir dizisini kodlayan DNA'nın bir parçası olan bakteriyel bir patojenite adasıdır. Genel olarak LEE dahil patojenite adaları lateral gen transferi yoluyla bakteriler arasında transfer edilmekte, bakteriyel kromozomun içine yerleşmekte ve genel virülansı arttırmaktadır (Jones ve ark. 2004). LEE *E.coli* O157:H7'nin yanı sıra diğer patojenik *E.coli*'lerde de mevcuttur ve ökaryotik hücrelerin kolonizasyonu için gerektirmektedir (Jones ve ark. 2004). Bir dizi önemli bileşen LEE içinde kodlanmaktadır. Bunlar; Tip III salgı sistemi (TTSS), bir adezin proteini olarak bilinen intimin, transloke intimin reseptörü (Tir) ve bir çok efektör proteinleri kapsamaktadır (Welinder-Olsson ve Kaijser 2005).

İntimin, LEE bölgesinde bulunan *eae* kromozal geni tarafından kodlanan 94-97 kDa büyüklüğünde adezyondan sorumlu bir dış membran proteindir. *Eae* geni tarafından kodlanan bu önemli yapışma faktörü barsak fırça sınırında *attaching ve effacing* (A ve E) lezyonlarına aracılık etmekte ve Tir ile etkileşime girmektedir (Yu ve Kaper 1992).

Tir bakteri tarafından sentezlenmekte olan 78 kDa ağırlığında bir protein molekülüdür. Bu molekül hücre içine girmeden önce fosforilasyonu uğramamıştır; fakat hücreye girdikten sonra fosforilasyona uğramakta ve 90kDa büyüklüğünde bir proteine dönüşmektedir. Daha sonra intimin ile bağlanmakta ve konak-bakteri arasında sinyal iletiminde rol oynamaktadır. Ayrıca A/E lezyon oluşumunda da rol almaktadır (Law 2000). LEE içinde kodlanan bileşenlerin ekspresyonu zor bir şekilde düzenlenmekte ve ortam koşulları çoğul düzenleyiciler ve *quorum sensing*'ten etkilenmektedir.

Histopatolojik olarak A/E lezyonu fırçamsı yüzey mikrovillinin yok edilmesiyle ve konak epitel hücrelerine yakın bakteriyel bağlanma ile ayırt edilmektedir. A/E lezyonunun oluşumu LEE içinde kodlanmış çok alt birimli kompleks bir yapıya sahip olan TTSS tarafından kordine edilmektedir (Kaper ve ark 2004, Jersse ve ark. 1990). TTSS'nin LEE tarafından kodlanmış her alt birimi tam ve işlevsel bir sistem oluşturmak için sistematik bir şekilde bir araya getirilmektedir (Kaper ve ark 2004). Bu sistem en sonunda konak hücre membranında bir gözenek oluşturmakta ve bakteriyel efektör proteinlerin bakteri hücresinden konak hücre içine geçebilmesinde bir portal veya kanal olarak hizmet etmektedir. Efektör proteinler konak hücreye girdiğinde aktin polimerizasyonunu zorlayan, mikrovillusların bozulmasına neden olan ve sitoiskeleti yeniden düzenleyen çok sayıda proteinin fosforilasyonunu ve sinyal transdüksiyonunu etkilemektedir (Amstrong ve ark. 1996). Aktin düzenlenmesinin ardından bakteri, konak hücre zarı içinde gömülü olan ve intimin adezin proteini için reseptör olarak hizmet veren TTSS aracılığıyla Tir adı verilen proteini transfer etmektedir. İntimin Tir ile etkileşime girdikten sonra bakteri hücresinin konak hücreye yakın bağlanma işlemi gerçekleşmekte ve barsaklarda bakteri kolonizasyonu başlamaktadır (Frankel ve Phillips 2008). LEE'ye ek olarak, pO157 plazmidi de *E.coli* O157:H7'nin virulansında ve patojenitesinde rol oynamaktadır (Lim ve ark. 2007).

pO157 plazmidi diğer plazmidlere kıyasla *E.coli* O157:H7'de oldukça yaygın olup hemen hemen tüm suşların pO157 içerdiği kabul edilmektedir. *E.coli* O157:H7 patojenitesiyle ilgili olarak pO157'nin özel fonksiyonları büyük ölçüde bilinmemekte ve

çoğu zaman bilimsel literatürlerde tartışılmaktadır (Yoon ve Hovde 2008). Bazı araştırmalarda pO157'nin konak hücreye bakterinin bağlanmasını kolaylaştıran ve güçlendiren fimbria ifadesinin yer aldığı ileri sürülmektedir. Bunun aksine bir kısım araştırmalarda ise pO157'nin bakteri adezyonu üzerinde çok az bir etkiye sahip olduğu belirtilmektedir. pO157 plazmidi yaklaşık 90kb'dır ve 100 açık okuma bölgesi (ORFs) içermektedir. Ayrıca pO157'nin TTSS, enterohemolizin, serine-proteaz, katalaz-peroksidaz, lenfosit inhibitörü, potansiyel adezinler ve diğerlerini kodladığı bilinmektedir. Bu bileşenlerin fonksiyonu ve etkisi tam olarak bilinmemektedir (Yoon ve Hovde 2008).

Stx üreten EHEC grubu için diğer bir karakteristik özellik; hemolizini (enterohemolizin adı da verilen) kodlayan genleri içeren 60-MDa büyüklüğünde bir virulans plazmididir (Schmidt ve ark. 1995). Rolünün ne olduğu bilinmemesine rağmen plazmid-kodlu enterohemolizin varlığı EHEC'in karakteristiğidir.

2.7. *E.coli* O157:H7 İnfeksiyon Mekanizması ve Patogenez

Kontamine gıdaların alınını takiben, *E.coli* O157:H7 insan midesinin asit ortamına dayanmakta ve zorlu ve karmaşık bir infeksiyon süreci başlamaktadır (Çizelge 2.2) (Orth ve Wurznner 2006). Bakterinin alınımından itibaren *E.coli* O157:H7 inkübasyon periyodu 8 saat ile 16 gün arasında sürmektedir. Fakat tipik kuluçka süresi 3-4 gündür (Phillips 1999). Bu süre boyunca bakteri yapışma, kolonizasyon ve *Stx*'lerin salınımı ve üretimi de dahil olmak üzere infeksiyonun çeşitli aşamalarında ilerleme kaydetmektedir.

İlk olarak *E.coli* O157:H7 konak epitel hücrelerinin mikrovilluslarına yapışmaktadır. Bunun sonucunda bakteri ve konak hücre arasındaki ilişki LEE üzerinde yer alan TTSS genlerinin ekspresyonuna neden olmaktadır. TTSS genlerinin sentezlenmesine takiben, TTSS proteinleri sistematik bir şekilde bir araya toplanmaktadır (Kaper ve ark. 2004). İlk olarak membrana bağlı proteinler birleşmekte ve konak hücre membranında ekstraselüler kanal ve por oluşturan proteinler tarafından takip edilen TTSS'nin temeli oluşmaktadır. Çok sayıda efektör protein birleştiğinde bu proteinler TTSS kanalı ve konak hücre sitoplazması arasında gidip gelmektedir. Efektör proteinler sitoplazmayı işgal ettikten sonra bakteri tutunmasını sağlamak için konak hücrenin normal sinyal transdüksiyon yapısını değiştirmektedirler (Mainil ve ark. 2005).

Çizelge 2.2. *E.coli* O157:H7 infeksiyonunun ilerleyişinin şematik gösterimi (Robinson ve McKillip 2010).

Ağız yoluyla alınma



Mikrovilluslara tutunma



TTSS ekspresyonu



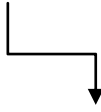
Mikrovillusu yok etme ve Hücre iskeletini yeniden düzenleme



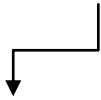
Tir ve intimin ilişkisi



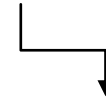
A/E lezyonlarının oluşması ve yapışması



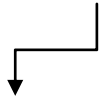
Stx'lerin salınımı



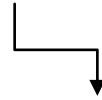
Barsak epitel hücrelerine bağlanma



Translokasyon ve böbrek hücrelerine bağlanma



HC ve lokal belirti-semptomlar



HUS

Sinyal transdüksiyonundaki değişiklikler bakteriyel efektör proteinlerin faaliyetleri ve selektif fosforilasyon ile gerçekleştirilmektedir. Efektör proteinler aktin polimerizasyonunu ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini mecbur kılmaktadır (Frankel ve Phillips 2008). Yeniden düzenlenme konak hücre mikrovilluslarının yok olmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu noktada, bakteri eş zamanlı olarak sıkı bağlanma için hazırlanırken konak hücreye yüzeysel olarak yapışabilmektedir. Bakteri hücresinin konak hücreye sıkıca bağlanması için LEE tarafından kodlanan intimin ve Tir'in düzenlenmesi

gerekmektedir (Welinder ve Kaijser 2005). Sıkı bağlanmada kritik bir öneme sahip bir dış membran proteini olan intimin varlığı ve uygun aktivitesi ile A/E lezyon oluşumu gerçekleşmektedir. Tasarlanmış bir ototransport sisteminin bakteri hücresinin dış membranı içine intiminin taşınması ve yerleştirilmesinden sorumlu olduğuna inanılmaktadır ve daha sonra intiminin dış membranda β -varil konformasyona adapte olduğuna inanılmaktadır (Kaper ve ark. 2004). İntiminin N-terminali yüksek ölçüde korunmuş olmasına rağmen C-terminali, N-terminaline kıyasla biraz daha fazla değişkendir. Günümüzde intiminin yaklaşık olarak 14 alt tipi tanımlanmaktadır (Mainil ve ark. 2005) ve her bir varyant çeşitli gastrointestinal hücreler için farklı doku tropizmi göstermektedir (Garmendia ve ark. 2005). Diğer taraftan, Tir eşsizdir, çünkü bakteri hücresi tarafından kendi kendine üretilen bir protein reseptörüdür (Frankel ve Phillips 2008) ayrıca A/E (bağlanma ve bozma) bakterinin ayırt edici bir özelliği olarak görünmektedir.

İnfeksiyon sırasında bakteri hücresinde Tir sentezlenmekte ve sonra konak epitel hücresine transloke olmaktadır (Frankel ve Phillips 2008, LeBlanc 2003). Translokasyondan sonra Tir kendiliğinden plazma membranı içine girmekte ve epitel hücre yüzeyine sunulduğu gibi keskin bir halka yapısını benimsemektedir (Frankel ve Phillips 2008). Bakteri hücre yüzeyinde yer alan intimin hücre içine girdiğinde Tir ile birleşmekte ve konak hücre iskeletinin bir daha çok büyük bir şekilde yeniden düzenlenmesine neden olmaktadır. Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi esas karakteristik A/E lezyonlarını oluşturmakta ve bakteri hücresinin konak hücreye sıkı bir şekilde tutunmasını sağlamaktadır. Bunun sonucunda daha fazla *E.coli* O157:H7 konak epitel hücrelerine sıkı bir şekilde tutunmakta ve A/E lezyonları oluşturmaya devam etmektedir. Böylece bakteri barsak sisteminin normal mikroflorasını istila etmeye başlamakta ve konağa başarılı bir şekilde kolonize olmaktadır (Leblanc 2003). Bu sayede *E.coli* O157:H7 kolonizasyonu sürekli olarak devam etmekte ve konakta büyük hasarlar oluşturmaktadır. Başarılı bir şekilde kolonizasyondan sonra konak içine yerleşen *E.coli* O157:H7 barsak lümeninde *Stx* üretimini başlatmakta ve toksin salgılamasına neden olmaktadır (Welinder ve Kaijser 2005).

STEC'in çeşitli suşları tarafından üretilen toksin miktarı değişkenlik göstermektedir (Marques ve ark. 1986). Bu değişkenliğin sebebinin ne olduğu anlaşılamamıştır. Shiga toksinin asıl önemi vasküler endotelial hücrelere zarar vermesinden kaynaklanmaktadır. *In vivo* olarak gerçekleştiği bilinmesine rağmen toksinin barsaktan vasküler endotelyuma

gidebileceği birkaç mekanizma tarif edilmiştir. Her *Stx* tek bir A altbiriminden ve 5 B altbirimden oluşmaktadır. *Stx*'lerin B alt üniteleri epitel yüzeyi üzerinde kendilerine karşılık gelen Gb3 reseptörlerine ve LEE tarafından kodlanmış efektör proteinlerin aksine endotel hücrelere de bağlanmaktadır (Welinder ve Kaijser 2005). *Stx*'lerin A alt birimi reseptör aracılı endositoz yoluyla konak hücrede içselleştirilmekte ve golgi aygıtına transfer edilmektedir, burada bir serin proteaz olan furin tarafından A alt birimi parçalanmaktadır (Mainil ve Daube 2005, Robins 2005). Ardından A alt birimi endoplazmik retikulumla gidip gelmektedir, burada aktif fragment serbest kaldığı için kritik disülfüt bağı indirgenmektedir. Aktif fragment seçici bir şekilde büyük ribozomal alt birimin 28S rRNA'sında adenin rezidüsünü depurine eden bir N-glikosidaz RNA gibi (ribozomu oluşturan RNA'dan bir adenin molekülünün kesilmesi) işlev görmektedir. Bu durum ribozoma bağlanma nedeniyle uzama faktörü 1 ve 2'yi yasaklamakta ve konak hücrede protein sentezini inhibe etmektedir. Sonuç olarak konak hücre apoptozise zorlanmaktadır ve apoptozisin hastalığın lokal semptomları ile sonuçlandığına inanılmaktadır.

Ayrıca, *Stx*'ler barsak epitel hücrelerinden kan dolaşımı içine geçebilmektedir (Welinder ve Kaijser 2005). Burada, *Stx*'ler glomerüler endotel hücreler üzerindeki Gb3 reseptörüne bağlanmaktadır. *Stx*'ler glomerüler hücrelere hasar vermekte ve glomerül içinde trombosit ve fibrin birikmesine neden olmaktadır. Sonuçta trombosit ve fibrin birikmesi böbrek filtrasyonunu azaltmakta ve HUS için karakteristik akut böbrek rahatsızlığına neden olmaktadır.

HUS'ta meydana gelen temel olaylar için en akla yatan hipotez ise proinflatuar sitokinlerin upregülasyonunu takiben barsak kolonizasyonun gerçekleşmesi ve bu sitokinlerin vasküler endotel hücrelerinde Gb3 reseptörlerini up-regüle etmesidir. Toksin alımını; protein sentezinin inhibisyonu, hücre hasarı/ölümünün ve normal endotel hücre fonksiyon kaybı takip etmektedir. Vasküler bütünlüğün ve fonksiyonların bozulması intravasküler koagülopati ve hemolitik anemiye yol açmaktadır. Bu süreç glomerüler trombüs ve böbrek yetmezliği ile sonuçlanmaktadır. Son veriler böbrek hasarı öncesinde koagülopati olduğu görüşünü desteklemektedir. Trombin üretimi ve fibrinolizin inhibisyonu HUS gelişmesinden önce gerçekleşmektedir (Chandler ve ark. 2002).

E.coli O157:H7 infeksiyonlarında genellikle HUS gelişme riski düşük (yaklaşık %5-8) görünse de, salgınlar sırasında HUS gelişme riskinin değişebildiği bildirilmektedir.

E.coli O157:H7 olağandışı virulan bir serotip olmasına rağmen diğer birçok serotipin HUS'lu çocuklardan izole edildiği bildirilmiştir (Paton ve ark. 1996, Tanaka ve ark. 1989). Non-O157 suşlarının HUS ve HC'den ziyade sulu ishal gibi daha hafif seyirli hastalıklara yol açtığı bildirilmektedir (Huppertz ve ark. 1996). Bazı çalışmalarda O157 suşunun HUS geliştirme riskinin %1.2'ler seviyesinde düşük oranda seyrettiği gösterilmiştir (Fukushima ve ark. 1999). Halbuki *E.coli O157:H7* ile infekte çocuklarda bu riskin %21'lere kadar çıktığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Wall ve ark. 1996). Bir *E.coli O157* salgını sırasında yetişkinlerde HUS gelişme oranının %22 olduğu ve yüksek mortaliteyle seyrettiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar suşlar ve suşların virülanslarıyla ilişkili sonuçlardır. Her bir serotipin toksin tipi *in-vivo* olarak üretilen toksin miktarı, mikroorganizmanın kolonize olma kapasitesi, toksin üretimi ve etki süresi gibi farklılıklar göstermektedir. Bunun yanında mikroorganizmalara karşı gelişen bağışıklık, konak yanıtları ve konak genetik yatkınlığı gibi birçok konak faktörünün HUS gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir (Newburg ve ark. 1993, Watarai ve ark. 2001).

2.8. İmmünoloji

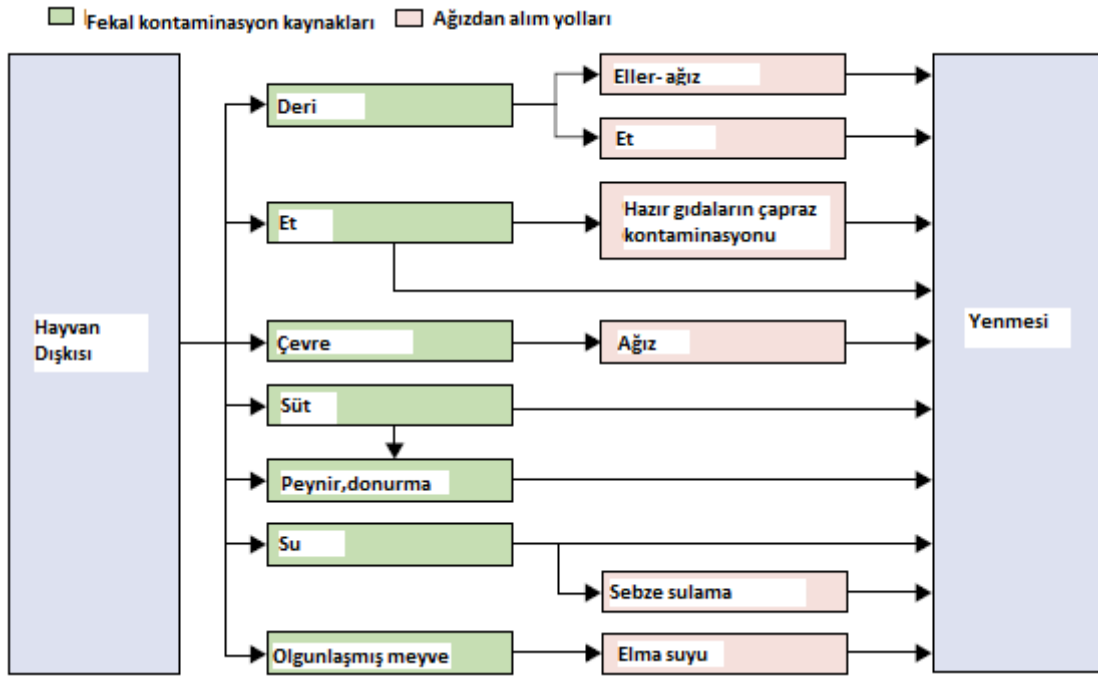
Tipik olarak *Stx1* veya *Stx2*'ye karşı düşük düzeyde humoral yanıt oluşmaktadır. Birçok bakteriyel protein salgısal IgA salgılanmasını engellemektedir. Özellikle EspA mukozal bağışıklık sistemi tarafından rutin olarak kabul edilmektedir (Noguera ve ark. 2003). EspA bakteri injeksiyon sistemi ve konak hücre yüzeyi arasında bir tüp oluşturmakta ve bu proteine karşı oluşan antikorların konak hücre temasının engellenmesinde görev yaptığı düşünülmektedir.

Bazı çalışmalarda pro ve anti inflamatuvar sitokinlerde bir dengesizliğin olduğu gösterilmiştir. Yüksek IL-6/IL-10 ve IL-6/IL-1 i reseptör antagonist oranlarının vasküler endotelial yaralanma şiddeti ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (Litalien ve ark. 1999). Bu bulgular HUS gelişiminde sitokinlerin rolünü göstermektedir (Westerholt ve ark. 2003).

2.9. Bulaş Yolları

Sığır *E.coli O157:H7*'nin birincil rezervuarı olduğu için sığır kaynaklı gıdalar, özellikle az pişmiş kıyma ve pastörize edilmemiş süt en önemli bulaş kaynaklarıdır (Clark 2001). Bunun yanında infeksiyon odağı olarak diğer potansiyel kaynaklar arasında hayvan dışkılarıyla atılan *E.coli O157:H7* ile doğrudan veya dolaylı olarak temas eden tarım

ürünleri veya su gibi gıdaların alınması bulunmaktadır (Şekil 2.4). Ayrıca *E.coli* O157:H7 enfeksiyonunun en sık bakım evlerinde kişiden kişiye direkt temas ile bulaşabildiği bildirilmektedir. Son olarak mikroorganizma çevre koşullarına oldukça dirençli olduğundan ve uzun süre hayatta kalabildiğinden, *E.coli* O157:H7 çevreden de bulaşabilmektedir. Örneğin gübrede ve su kanalı sedimentlerinde aylarca hayatta kaldığı bulunmuştur (Nataro ve Kaper 1998). *E.coli* O157:H7'nin direkt temas, indirekt temas veya çevre ile temas yoluyla yayılabildiği bildirilmiştir (Yoon ve Hovde 2008, SteinMüller ve ark. 2006). EHEC' in neden olduğu hastalıkları doğuran araçların geniş spektrumlu olması salgın araştırmalarından tespit edildiği gibi 100 organizmadan daha az olduğu belirlenmiş olan düşük enfeksiyon dozu ile açıklanabilmektedir (Nataro ve Kaper 1998).



Şekil 2.4. *E.coli* O157'nin Bulaşma araçları (Pennington 2010)

2.10. Epidemiyoloji

STEC birçok hayvandan, yiyeceklerden ve sudan izole edilebilmektedir. İnsan enfeksiyonlarının çoğunun kontamine hamburger tüketimiyle ilişkili olduğu bildirilmektedir. Bu organizmalar nispeten çevre koşullarına dirençli ve işlenmiş gıdalarda ve elma suyunun asit ortamında hayatta kalabilmektedirler. İnek gübresi ile gübrelenmiş sebzeler kontamine olabilmekte ve bu sebzelerin tüketimiyle de insanda enfeksiyon

meydana gelebilmektedir. Hastalık oluşturmak için gerekli inokulum miktarı oldukça düşüktür. İnfeksiyon oluşumu için 100 basilden az bir titrede mikroorganizmanın yeterli olabileceği bildirilmektedir. Bu nedenle kişiden kişiye bulaş da görülebilmektedir. Aile çalışmaları bir çocuğun infekte olduğunda diğer aile üyelerinin hasta veya kolonize olmasının muhtemel olduğunu göstermiştir. Hatta kirli göllerde yüzme yaşamı tehdit eden hastalıklara neden olabilecek kadar organizmanın alımı ile sonuçlanabilmektedir.

E.coli O157:H7 infeksiyonu mikroorganizmanın fekal atılımın süresinin uzamasıyla ilişkilidir. Karch ve arkadaşları (1995) 53 infekte çocuk arasında yapılan bir çalışmada, HC ve HUS' da organizmanın atılımının ortamala süresini sırasıyla 13 (2 ila 62 gün) ve 21 (5 ila 24 gün) gün olduğunu göstermişlerdir. Bazı hastalarda patojen atılımının aralıklarla gerçekleştiği bildirilmiştir. Pai ve ark. (1998) O157'nin uzun bir süre dışkı atılımının da olmasına rağmen, bu hastaların yaklaşık yarısının 10 gün boyunca kültür-negatif olduğunu bildirmişlerdir. Non-O157 patojenlerinin atılım süresiyle ilgili oldukça az sayıda veri bulunmaktadır. Pai ve arkadaşlarının (1988) non-O157 ile infekte 4 hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada tanının konmasından sonraki 18, 21, 24 ve 41. günlerinde dışkıda mikroorganizma atılımının olmadığını bildirilmişlerdir.

Yaş ve semptomlar arasında çarpıcı bir ilişki dikkat çekmiştir. Altı aylıktan daha küçük çocuklar neredeyse hiç klinik hasta değildirler. Bebeklerde hastalık olmamasının transplasental immunité, insan sütü koruyucu faktörleri (Newburg ve ark. 1992, Ashkenazi S ve ark. 1991) veya yaşamın erken döneminde mikroorganizma kolonizasyonu için gut reseptörlerinin eksikliği ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Ashkenazi ve ark. 1991). Dünyanın çoğu yerinde HUS'un pik insidansı 6-48 aylık yaş aralığındaki hastalarda görülmektedir. Halbuki bazı çocuklarda genç yaşlarda (16-19 yaşları) bile HUS gelişiminin görüldüğü bildirilmiştir. Sağlıklı genç erişkinlerde HUS gelişmesi riski oldukça düşüktür. Gençler gibi yaşlıların da HUS geliştirme risklerinin olduğu veya ileri yaşlarda trombotik trombositopenik sendromu görülebildiği bildirilmiştir.

Çoğu bakteriyel enteropatojenlerde olduğu gibi hastalık sıcak aylarda daha sık görülme eğilimindedir. EHEC ile kontamine gıdaların tüketiminin tüm yıl boyunca yapılabildiği düşünüldüğünde bunun sebebinin ne olduğu belli değildir.

2.11. Tanı

Klinik tablo tanıda oldukça önemlidir. Genç bir çocukta ateş yokluğunda dizanteri veya kanlı ishalin varlığı şüpheleri arttırmalıdır. Lökositozu gösteren bir kan sayımı mikroanjiyopati gelişimi açısından dikkat çekmelidir. Parçalanmış eritrositler, anemi ve trombositopeni varsa, mikroanjiyopatik hemolitik anemiyi düşündürmelidir. Bazı çocuklarda HUS'u tanımlayan böbrek yetmezliğinin asla görülmemesi oldukça önemlidir. Çocuklarda bu duruma hastalığın atipik formada gelişmesi denmektedir (Lopez ve ark. 1995).

Dışkı örneklerinin değerlendirilmesi hemorajik kolit tanısını doğrulamak için gereklidir. Kültür, MacConkey ve Sorbitol besiyerinin yanı sıra rutin besiyeriyle yapılmalıdır. Seçilen ortam ilgili patojene göre değişmektedir. Örneğin sorbitollü-MacConkey (SMAC) agar *E.coli* O157:H7'nin izolasyonunda sıkça tercih edilmektedir. Çünkü sorbitolü fermente etmeyen bu türde çok az sayıda bulunan patojenlerden sadece biridir. Sorbitol fermantasyonu yapmayanlar renksiz veya saydam koloniler olarak görünürler. Diğer *E.coli* türleri sorbitol fermantasyonundan dolayı kırmızı renkte koloniler oluşturacaklardır. Fekal *E.coli*'lerin yalnızca yaklaşık %5'i sorbitolü fermente edemezken, neredeyse tüm *E.coli* O157:H7'nin hemen hemen tamamı bu özellikte mikroorganizmalardır (Ammon ve ark. 1999). Ancak bu yöntemler özellikle düşük titredeki patojenlerin tespitinde duyarlı yöntemler değildir (Gracias ve McKillip 2004). Tarama testleriyle yapılan çalışmada O157'yi düşündüren bir sonuç elde edilmişse, mutlaka sonuç toksin veya toksin genlerinin varlığı veya LPS tiplerinin gösterilmesi gibi konfirme edici testlerle doğrulanmalıdır. Hastalığın geç dönemlerinde veya hastaya antibiyotik tedavisi başlandıktan sonra dışkı kültürlerinin yapılması faydasız olabilmektedir.

Kültür yöntemleri düşük titredeki patojenlerin tespitinde duyarlı olmadıkları için (Gracias ve McKillip 2004) genellikle moleküler-bazlı teknikler kullanılmaktadır. Moleküler tabanlı teknikler hassas ve nispeten hızlı yöntemlerdir (Gracias ve McKillip 2004). Moleküler bazlı teknikler seçicilik özellikleri, duyarlılık özellikleri ve hızlı sonuç vermelerinden dolayı oldukça avantajlı yöntemlerdir. PCR (Osek 2003, Brian ve ark. 1992), PFGE, ribotiplendirme yöntemleri (Ito ve ark. 2003, Ann 2003) veya *multilocus variable number tandem repeats* analizi gibi moleküler biyolojik teknikler herhangi bir salgın durumunda tanıda kullanılabilen faydalı yöntemlerdendir.

Non-O157 EHEC tanısında, ticari olarak temin edilebilen enzim immunoassayler veya lateks aglütinasyon testleri gibi yöntemlerle dışkıda toksin varlığının gösterilmesi gerekmektedir. LPS antijenlerine karşı antikorlar dışkı kültürü negatif olan bir çocuğun tanısının doğrulanmasında yardımcı olabilmektedir. *E.coli* O157:H7 bakteri türünün belirlenmesinde bir dizi ticari alternatif mevcuttur. Ticari alternatifler kromojenik agar, petrifilm dahil kuru plak sayma ürünleri, biyoluminesens testler, ticari olarak üretilen hazır kitler (Gracias ve McKillip 2004) ve hazır yapılmış petri kaplarını içermektedir (Weber Scientific 2009).

2.12.Tedavi

Günümüzde HC'nin HUS'a ilerlemesi önlenememektedir. *In vitro* veriler antibiyotik kullanımının EHEC'in toksinlerinin üretimini arttırdığını göstermektedir (Walterspiel ve ark. 1992). Ayrıca retrospektif çalışmalarda HUS gelişme riskinin antibiyotik tedavisiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu tür çalışma verilerinin doğruluğu tartışılmaktadır. Günümüzde mevcut verilere dayalı hiçbir öneri yapılamamaktadır. Tedavide antibiyotiklerin yararlı mı yoksa zararlı olup olmadığını bilinmemektedir. Gerek *in vitro* ve gerekse hayvan modeli çalışmalarında tedavide azitromisinin oldukça faydalı olabileceği gösterilmiştir (Ohara ve ark. 2002). Retrospektif çalışmalar bu durumu doğrular nitelikte olsa da, antibiyotik kullanımından kaçınılmalıdır. EHEC ilişkili HC'si olan bir çocuk renal veya hematolojik anormallikler açısından yakından takip edilmelidir. Kan sayımı, renal fonksiyon ölçümleri ve idrar analizi çocuk iyileşene kadar sık sık yapılmalıdır. HUS'un tanımlanmasındaki başarısızlık felaketle sonuçlanabilmektedir.

Çocuk HUS geliştirdiğinde, anemi, trombositopeni ve komplikasyonları ve böbrek yetmezliği için destekleyici tedaviler hedeflenmektedir. Bu destekleyici tedaviler diyaliz ve kan nakli ile gerçekleşmektedir. Nadiren görülen pankreatit, felç, koma, peritonit, kolon nekrozu ve diğer komplikasyonlarda bu hastalıklarla ilişkili özel tedavi yöntemleri gerekli olabilmektedir.

2.13.Korunma

EHEC ilişkili HC'nin erken tanımlanmasının en önemli yanlarından biri halk sağlığı yetkililerini salgın konusunda bilgilendirmektir. Epidemiyolojik çalışmalar korunmada

kontamine gıdaların toplanmasının, infeksiyonun kaynağı olan mezbahaların kapatılmasının ve uygun gıda işleme konusunda kamu bilincinin artırılmasının önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca yeterli pişirme süresi ve sıcaklığı, çiğ ve pişmiş gıdalar arasındaki çapraz kontaminasyonun önlenmesi ve uygun soğuk depolama *E.coli* O157:H7 ile ilişkili riskleri azaltmada anahtar faktörler olarak belirtilmiştir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. *E.coli* O157:H7 infeksiyonuna yakalanma riskini azaltan işlemler (Buchanan ve Doyle 1997)

Etlerin iyi pişirilmesi (minimum 160°F)
Sadece pastörize edilmiş süt ve elma suyunun içilmesi
Meyve ve sebzelerin iyi yıkanması
Özellikle sığır, geyik, keçi ya da köpeklere dokunulduktan sonra ellerin iyi yıkanması
İshal çocuk veya yetişkin bakımı yapıldıktan ve bebek bezleri değiştirildikten sonra ellerin iyi yıkanması
Sebze ve meyve yetiştirirken geviş getiren hayvanların taze gübrelerinin kullanılmaması
Sığırlar tarafından kullanılan göllerde veya havuzlarda yüzmekten ve patojen eliminasyonu yapılmamış yüzey suyunun içmekten kaçınılması

HC'li çocuklarda toksin bağlayıcı ajanların kullanımı çok dikkat çekmiştir. Sonuç olarak olasılıkla en etkili müdahalenin renal yaralanma anından önce koagulopatiji tersine çevirmeye yönelik tedavi olduğu düşünülmektedir.

İnfeksiyonu engellemek için pek çok bariyere ihtiyaç duyulmaktadır. Süt pastörizasyonu ve su klorlama gibi engellerin bazıları etkili bir şekilde toplu nüfusu korumaktadır. Fakat çapraz bulaşmayı önleyen el yıkama ve iş uygulamaları insan davranışı temeline dayanmaktadır.

*E.coli*O157:H7 ile gerçekleşen gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesi oldukça zorluk göstermektedir. Mikroorganizmanın bulaşıcı dozunun oldukça düşük olması sebebiyle birçok geleneksel yöntemde olduğu gibi patojen gelişmesini önlemek yerine mikroorganizmanın varlığını elimine etmeye veya azaltmaya yönelik yöntemler tercih edilmektedir. İyi pişirilmeden tüketilen çiğ gıdalar (örn: kıyma) veya *E.coli*O157:H7'yi yok etmeyi sağlayan belirgin bir işlem uygulanmayan hazır yemek ürünleri (Örn: mayalanmış sosis, elma şarabı) mikroorganizmanın en önemli bulaş kaynaklarını oluşturmaktadır.

*E.coli*O157:H7'nin antimikrobiyel gıda katkı maddelerine karşı herhangi bir artan direnç göstermediği bildirilmiştir.

2.13.1.*E.coli* O157:H7 infeksiyonunun önlenmesinde gıda güvenliği önemi

Tüketicilere sunulan pek çok et ürününden kıyma ABD’de bir hayli tüketilen en popüler üründür. Ancak kıyma tarihte ve günümüzde *E.coli* O157:H7 infeksiyonunun en yaygın aracıdır. Risk değerlendirmesinin yapıldığı bir çalışmada kıyma paketlerinin %2.9’unun *E.coli* O157:H7 ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Kontamine kıymanın neden olduğu tüketici sağlığı hasarını ve finansal zararı önlemek için *E.coli* O157:H7 sıfır tolerans politikası artık gıda endüstrisinde yürürlüğe girmiştir (SteinMüller ve ark. 2006).

Kıyma ve diğer et ürünleri gıda işletme tesislerinde *E.coli* O157:H7 ile kontamine olabilmektedir. Sığırlar en sonunda kesildikleri yer olan işletme tesislerine alınır. Sığır kas ve yağ dokuları sağlıklı hayvanlarda sterildir; fakat deriler steril değildir ve genellikle işleme sırasında *E.coli* O157:H7 ile kontamine olmaktadır (SteinMüller ve ark. 2006). Örneğin *E.coli* O157:H7 sığırın kolonunda doğal olarak kolonizedir, fakat kesim sırasında *E.coli* O157:H7 kesilmiş sığır etine bulaşabilmekte ve kontaminasyona neden olabilmektedir. Ayrıca et hayvan dışkı ile temas, çevredeki bitkiler veya işletme tesislerindeki sağlıklı çalışanlar gibi diğer durumlarda da kontamine olabilmektedir. Ayrıca modern üretim metodları da tek bir sığır sürüsü içinden alınan kıymanın büyük sayıda et ile birleştirilmesiyle *E.coli* O157:H7 kontaminasyonu yayılmaktadır. Kontaminasyonun şiddeti, barsaktaki kolonizasyon miktarına, fekal atılıma ve çalışanların genel hijyenine bağlıdır. Kirliliğin ortadan kaldırılması gerekliliği veya en azından kirlilik miktarının azaltılması inkar edilemez (Mainil ve Daube 2005). Bakteriyel kontaminasyonu ortadan kaldırmada gıdaların titizlik içinde işlenmesi gerekmektedir. Kontaminasyonu önlemek için kullanılan en yaygın yöntemler arasında ısıtma, dondurma veya gıda ürünlerini kurutma, ozmatik veya asidik şoka tabi tutma ya da bir tür karışım içinde bekletme sayılabilmektedir. Bu yöntemler arasında asidik şokun oldukça kullanışlı bir yöntem olduğu bildirilmektedir (Kolling ve Matthews 2001). Organik asit uygulaması gıda işleme konusunda en yaygın kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Organik asitler birden fazla göreve hizmet etmektedir. Söz gelimi organik asitler gıda koruyucu olarak veya gıda işlenmesi sırasında bakteriyel kontaminasyonu azaltmak için tasarlanmış kimyasal yöntemler olarak işlev yapmaktadırlar. Et işlenmesi sırasında kimyasal kontaminasyonu azaltmak için organik asitler taze kesilmiş etin yüzeyine uygulanmaktadır (Carlson ve ark. 2008, Nou ve ark. 2003).

Kullanımı onaylanmış pek çok organik asitten, genellikle laktik asit en çok tercih edilendir. Çünkü laktik asit gıda sektöründe *Generally Regarded as Safe* (GRAS) etiketlidir. Düşük bir pH değerine sahip olan ve bir dezenfektan olarak hizmet eden laktik asit uygulandığında et yüzeyi üzerinde ince bir film oluşturur. Burada laktik asit çözülmemiş formda polar olmayan membranı geçerek bakteri hücresi içine girmektedir. Laktik asit bakteri içine girdiğinde hücreler içinde birikmeye başlamakta, hücre içi pH'ını düşürmekte ve kritik metabolik reaksiyonları inhibe etmektedir. Ancak laktik asit uygun bir dezenfektan olmasına rağmen etkinliği orjinal kirlenme miktarına, et yüzeyindeki bakterinin adhezyon gücüne ve etten bakteriyi uzaklaştırabilme yeteneğine bağlıdır (Brul ve Coote 1999, Diez ve Russell 1997).

Gıda ürünleri tüketici pazarlarına sevk edilmeden önce kalite-kontrol ölçümleri boyunca kontaminasyon açısından denetlenmelidir. Kalite kontrolün önemi nedeniyle bakteriyel kontaminasyonu tespit etmede kullanılan yöntemler hassas ve seçici olmalıdır. Ayrıca gıda işleme tesislerinin dinamik ihtiyaçlarını karşılamak için çok yönlü olmalıdır. Günümüzde kalite kontrol testleri için moleküler bazlı ve konvansiyonel teknikler bulunmaktadır (Gracias ve McKillip 2004).

Konvansiyonel teknikler kalite kontrol için uygun maliyetli ve alışılmış bir yöntem olup gıda endüstrisi için oldukça faydalıdır (Gracias ve McKillip 2004). Bu kategoriye standart plak ekim yöntemleri ve klasik mikrobiyolojik yöntemler girmektedir. Katı ve sıvı olmak üzere çeşitli besiyerleri kalite kontrol prosedürlerinde kullanılmaktadır. Bugüne kadar geleneksel plak yöntemleri gıda işleme sırasında kalite kontrolün vazgeçilmez yöntemlerinden olmuşlardır (Sandel ve ark. 2003). Moleküler tabanlı teknikler hassas ve nispeten hızlı yöntemlerdir (Gracias ve McKillip 2004). Bu kategoride bulunan teknikler arasında PCR ve DNA bazlı teknikler bulunmaktadır. Moleküler bazlı teknikler seçicilik özellikleri, duyarlılık özellikleri ve hızlı sonuç vermelerinden dolayı oldukça avantajlı yöntemlerdir. Ancak bu moleküler bazlı teknikler klasik plak tekniklerinden oldukça pahalı yöntemlerdir. Ayrıca daha yeni ve aşına olunmayan tekniklerdir. Bu yüzden kalite kontrol prosedürleri içine moleküler temelli yaklaşımların entegrasyonu gıda işletme tesislerinin genel ihtiyaçlarına ve kaynaklarına bağlıdır. Son olarak günümüzde *E.coli* O157:H7 dahil birçok bakteri türlerinin belirlenmesinde bir dizi ticari alternatif mevcuttur. Ticari alternatif

yöntemler faydalı yöntemler olmasına rağmen, maliyet gibi problemlerden dolayı kullanımı sınırlı yöntemlerdendir (Gracias ve McKillip 2004).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışmaya 01.07.2012-01.01.2013 tarihleri arasında Hatay'da çeşitli lokanta, kafeterya ve büfelerden tüketime sunulan salata örneklerinden izole edilen 150 *E.coli* izolatu dahil edilmiştir. Bu izolatlar arasında EHEC (*E.coli* O157:H7) sıklığı ve *hly-A*, *stx1* ve *stx2* virülans faktörlerinin varlığı açısından değerlendirilmiştir. Çalışmaya 327 salata örneği dahil edildi. Türk Gıda kodeksi Mikrobiyolojik Kriterlerine uygun olarak patojen değerin üzerinde *E.coli* izolasyonu yapılan örneklerden izole edilen *E.coli* suşları değerlendirmeye alındı (Çizelge 3.1)

Çizelge 3.1. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine göre Mikrobiyolojik Kriterler

Gıda	Mikroorganizmalar	Numune alma planı		Limitler (¹)	
		n	c	m	M
Tüketime hazır her türlü salata, şarküteri ürünleri ve soğuk mezeler vb.	<i>E. coli</i>	5	2	<10 ¹	10 ¹
	<i>S. aureus</i> (⁴)	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	0/25 g-mL	
	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	0/25 g-mL	

¹Aksi belirtilmedikçe limit kob/g-mL olarak değerlendirilir. kob:Koloni oluşturan birim (katı besiyerinde)

n: Partiden bağımsız ve rasgele seçilen numune sayısını,

c: m ve M arasında olmasına izin verilen maksimum numune sayısını (M değeri taşıyabilecek en fazla numune sayısını),

m: (n-c) sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla mikrobiyolojik değeri,

M: c sayıdaki numunenin bu değeri aşması halinde uygunsuz olup kabul edilemez olduğunu gösteren mikroorganizma sayısını,

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Araçlar

- Etüv (Heal Force HF90, Çin)
- Santrifüj (NF 048; Nüve, Türkiye)
- PCR Cihazı (Thermal cycler, Techne Flexigene™, İngiltere)

- Elektroforez ünitesi (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD)
- UV Transillumunator (Wealtec, Dolphin-View, ABD)
- Otomatik pipetler (Discovery, Transferpette, Almanya)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Agaroz (Sigma, ABD)
- DNA Ladder (100 bp, Fermentas, EU)
- Etil Alkol (Merck, Almanya)
- Etidium Bromid (Sigma, ABD)
- Potasyum dihidrojen fosfat, KH_2PO_4 (Sigma, ABD)
- Proteinaz K (Sigma, ABD)
- Potasyum klorür, KCl (Sigma, ABD)
- Sodyum hidrojen fosfat, Na_2HPO_4 (Sigma, ABD)
- Sodyum klorür, NaCl (Sigma, ABD)
- TAE Elektroforez Tamponu 50X
- GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis, ABD)

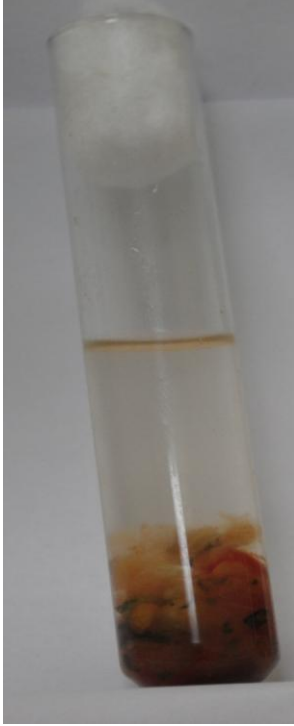
3.2. Örneklerin Toplanması ve Kültivasyon

Salata örnekleri servise hazırlandıktan hemen sonra (servis edilmeden önce) steril kaplara aseptik koşullara dikkat edilerek, her örnekten 250 g alındı (Şekil 3.1). Salata örneklerinin alımı sırasında örnek alınmadan önce salatanın karıştırılmış olmasına dikkat edildi. Çalışmada toplam 150 farklı lokantadan salata örneğinin mikrobiyolojik analizi gerçekleştirildi. Örnekler alındıktan sonra soğuk zincir altında Bakteriyojji laboratuvarına getirildi. Alınan örnekler, bekletilmeden homojenize edildikten sonra her örnekten 1 gr olacak şekilde tartılarak çoğaltma besiyerlerine (Müller Hinton Broth) ekildi.



Şekil 3.1. Servis edilmeden önce steril kaba alınmış salata örneği.

Laboratuvara getirilen örnekler öncelikle zenginleştirme işlemi için 5'er ml olarak steril cam tüplere konulmuş olan Müller Hinton Broth besiyerine inoküle edilerek 37°C'de 48 saat inkübe edildi (Şekil 3.2). Kırk sekiz saat sonunda çoğaltma besiyerinden mikropipetle 100 µl alınarak Endo agar ve EMB agar besiyerlerine pasajları yapıldı. Plaklar 37°C'de 48 saat inkübe edilerek değerlendirildi.



Şekil 3.2. Zenginleştirme işlemi için 5 ml olarak steril cam tüplere konulmuş Müller Hinton Broth besiyerine salata inokulasyonu.

Üreyen mikroorganizmaların izolasyon ve identifikasyonunda karbonhidratları kullanım özelliği, üreaz aktivitesi, sitrat kullanımı, hareket özelliği ve indol oluşturma gibi özellikleri açısından SIM, metil kırmızısı, sitrat agar, üreaz agar, lizin iron agar ve TSI (Three Sugar Iron besiyerlerine) agara ekilerek identifikasyon işlemi yapıldı. *E.coli* olarak tiplendirilen izolatlar istenilen örnek sayısına ulaşıncaya kadar içerisinde %20 oranında gliserol bulunan buyyonda -70 °C’de muhafaza edildi.

3.3. Kullanılan Besiyerleri, Solüsyonlar ve Biyokimyasal testler

3.3.1. Eosin Metilen-Blue Agar

Ticari olarak toz halde temin edilen EMB agar (EMB-Agar, bioMerieux, Fransa) 36 gr tartılarak bidistile su ile 1000 ml’ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildikten sonra 9 cm çapında steril petri plaklarına döküldü. Besiyeri katılaştıktan sonra izolasyon ve identifikasyon için kullanıldı.

3.3.2. Müller Hinton Broth

Ticari olarak toz halde temin edilen Müller-Hinton Broth besiyeri (Müller Hinton Broth, bioMerieux, France) 21 gr tartılarak bidistile su ile 1000 ml’ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Sterilazyondan sonra oda ısısında 30 dk bekletilen besiyeri 16x100 mm çapındaki tüplere 5 ml halinde porsiyonlar hazırlandı.

3.3.3. Müller Hinton Agar

Ticari olarak toz halde temin edilen Müller-Hinton agar besiyeri (MH-Agar, BioMerieux, Fransa) 38 gr tartılarak bidistile su ile 1000 ml’ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Sterilazyondan sonra oda ısısında 30 dk bekletilen besiyeri 9 cm çapında steril petri plaklarına dökülerek katılaşmaya bırakıldı.

3.3.4. TSI agar:

Test için ticari olarak temin edilen Triple Sugar Iron Agar (TSI) besiyeri (Merck, Almanya) kullanıldı. Besiyerinden 65 gr tartılıp bidistile su ile 1000 ml’ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Sterilazyondan sonra oda ısısında 30 dk bekletilen besiyeri 16x100 mm çapındaki deney tüplerine 10 ml olacak şekilde

porsiyonlanarak dağıtıldı. Tüplerin dip kısmında 2.5-3 cm'lik bir dik kısım ve üstte bir yatık kısım kalacak şekilde tutularak soğutuldu. Saf kültürlerden iğne uçlu öze ile dip kısma batırılarak sonra eğik kısmın yüzeyine çizme şeklinde ekimleri yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda glikozu fermente eden bakterilerin oluşturdukları asit ile besiyeri içinde bulunan fenol kırmızısı indikatörünü etkileyerek sarı renge dönüştürmektedirler. Bakteriler TSI agarın dip kısmında zayıf oksijenlenen bölgede glikozu fermentasyonla parçaladıklarından respiratif yoldan parçaladıkları besiyeri yüzeyine göre dipte daha fazla asit oluşturmaktadırlar. Bunun yanında bakteriler besiyerindeki peptonun oksidatif dekarboksilasyonundan alkali ürünler de oluşturmaktadırlar. Oluşan bu alkali ürünler besiyeri yüzeyindeki glikozdan oluşturulan asitleri nötralize etmektedirler. Bu nedenle, glikozu fermente edip laktoz ve sücrozu parçalamayan bakterilerin besiyerinin dip kısmında sarı yatık kısmında ise kırmızı renk oluşturdukları tespit edilmektedir. Eğer bakteri, laktoz ya da sücroz veya her ikisini de fermente ederse, besiyerinde bol miktarda asit ürün meydana geleceğinden oluşan alkali ürünler ne dipteki ne de yatık bölgedeki asidi nötralize etmeye yetmemektedirler. Bu nedenle laktozu, sücrozu ya da her ikisini fermente edebilen bakteriler hem dipte hem de yatıkta sarı renk oluşturmaktadırlar. *E.coli* hem laktozu hem de sücrozu fermente edebildiğinden tüplerde bol miktarda asit ürünlerin oluştuğu ve oluşan bu alkali ürünlerin hem tüpün dibinde hem de yatık kısmında sarı renk değişikliği meydana getirdikleri tespit edildi. Ayrıca besiyerinde hava kabarcıklarının oluşması, besiyerinde *E.coli*'nin gaz oluşturması sonucu Thiosulfatın ferric amonium sülfata etki ederek siyah renkli H₂S ve hidrojen sülfür meydana getirdiği şeklinde yorumlandı.

3.3.5. SIM Besiyeri

Test için ticari olarak temin edilen SIM besiyeri (SIM Medium, Merck, Almanya) kullanıldı. Besiyerinden 30 gr tartılıp bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Sterilazyondan sonra oda ısısında 30 dk. bekletilen besiyeri 16x100 mm çapındaki deney tüplerine 10'ar ml porsiyonlanarak hazırlandı. Bakteri ekimleri hazırlanan bu besiyerlerine yapılarak kültür tüpleri 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besiyeri üzerine 0.3 ml Kovacs (n-Butanol;

hydrochloric acid; 4-dimethylaminobenzaldehyde) ayıracı (GBL Europe, Hollanda) ilave edildi.

İndol testi triptofan bulunan bir besiyerinde bakterilerin, triptofanı enzimatik hidrolize uğratarak indol oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek amacıyla yapılan bir testtir. Bu testte *Escherichia coli* triptofanı parçalayarak pirüvik asit, amonyak ve indole dönüştürmektedir. Oluşan indol gazı, 4-dimethyl-aminobenzaldehyde ile reaksiyona girerek vişne çürüğü rengine dönüşmektedir. Kovacs ayıracı ilave edildikten sonra üst kısımda kırmızı halka oluşumu pozitif reaksiyonun, sarı-kahverengi ise negatif reaksiyonun göstergesidir.

3.3.6. Üre Besiyeri

Test için ticari olarak toz halde temin edilen Üre agar (Urea agar, Merck, Almanya) kullanıldı. Besiyerinden 21 gr tartılıp bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika otoklavlandı. Sterilazyondan sonra 45-51°C' ye soğutuldu ve 50ml/lt' de steril edilmiş %40 üre solüsyonu (Merck, Almanya) eklendi. Üre solüsyonu eklenen besiyeri 16x100 mm çapında ki deney tüplerine 5'er ml dökülerek yüksek dip kısım ve eğri yüzey olacak şekilde katılaşmaya bırakıldı. Bakteriler besiyerinin yüzeyine ekildi, 35 °C'de 48 saat inkübe edilerek değerlendirildi.

Üreaz, ürenin hidrolizini katalize eden bir enzimdir. Üreaz testi bakterilerin üreaz aktivitesini belirlemek için yapılır ve bu amaçla içerisinde ayraç olarak fenol kırmızısı bulunan Christensen üre besiyeri kullanıldı. Bazı bakteriler sentezledikleri üreaz enzimi ile üreyi hidroliz ederek amonyak ve karbondioksit oluştururlar. Amonyak amonyum karbonata dönüşmekte ve ortam alkalileşmektedir. Besiyerinin renginin pembeye dönüşmesi, üreaz enziminin varlığını göstermektedir.

3.3.7. Sitrat Besiyeri

Test için ticari olarak toz halde temin edilen Simmons sitrat agar (Simmons-Citrat-Agar, Merck, Almanya) kullanıldı. Besiyerinden 22.5 gr tartılıp bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Sterilazyondan sonra oda ısısında 30 dk bekletilen besiyeri 16x100 mm çapındaki deney tüplerine 10'ar ml dökülerek yüksek dip kısım ve eğri yüzey olacak şekilde katılaşmaya bırakıldı. Bakterinin

saf kültüründen sitratlı agar besiyerine yüzeyine ekimleri yapılarak 35°C’de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

Bazı bakteriler karbon ve enerji kaynağı olarak yalnızca sodyum sitratın bulunduğu besiyerlerinde üreme yeteneğindedirler. Bakteri tarafından sitratın kullanılması, sitrat besiyerinde alkali ürünler oluşması ile karakterizedir. Besiyerinde karbon kaynağı olarak sodyum sitrat, nitrojen kaynağı olarak amonyum fosfat bulunmaktadır. Sitrat kullanan bakteriler ayrıca amonyum tuzlarından nitrojen açığa çıkarmaktadırlar. Bu reaksiyonda amonyak oluşmakta ve besiyeri alkalileşmektedir. Besiyerinde ayraç olarak bulunan bromtimol mavisinden dolayı alkalileşen ortamda yeşil renkli olan besiyeri deniz mavisini bir renge dönüşmektedir.

Çalışmada Besiyerinin renginin deniz mavisine dönmesi pozitif sonuç olarak yorumlandı. Mavi renk oluşmaksızın üremenin gözle görünür olması bakterinin üremesinin logaritmik fazda olduğunu düşündürdü. Bu ise ancak karbon ve azotun asimilasyonu ile mümkün olabilmektedir. Besiyerinin renginin değişmemesi, üremenin olmaması negatif sonuç olarak değerlendirildi.

3.3.8. Lizin Dekarboksilaz Testi

Test için ticari olarak temin edilen Lisin Iron Agar (LIA, Merck, Almanya) kullanıldı. Besiyerinden 32 gr tartılıp bidistile su ile 1000 ml’ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Sterilazyondan sonra oda ısısında 30 dk bekletilen besiyeri 16x100 mm çapındaki mm çapındaki deney tüplerine 10’ar ml dökülerek yüksek dip kısım ve eğri yüzey olacak şekilde katılaştırıldı. Lisin Iron Agar besiyerine ekim, yatık agar yüzeyine sürme ve dibine daldırma şeklinde yapıldı ve ekimlerden sonra kültür tüpleri 37 °C’de 48 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda besiyerinin dik kısmında viyole renk oluşumu lizin dekarboksilaz pozitif, siyah renk oluşumu hidrojen sülfür pozitif, sarı renk oluşumu ise lizin dekarboksilaz negatif olarak değerlendirildi.

3.3.9. Metil Red- Voges-Proskauer besiyeri

Test için ticari olarak temin edilen Metil Red-Voges Proskauer besiyeri (MR-VP broth, Merck, Almanya) kullanıldı. Besiyerinden 17 g tartılıp bidistile su ile 1000 ml’ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Sterilazyondan sonra oda

ısısında 30 dk. bekletilen besiyeri 16x100 mm çapındaki deney tüplerine 5'er ml olacak şekilde posiyonlandı. MR-VP besiyerine ekim, besiyerine daldırma şeklinde yapılarak, ekimleri yapılan besiyerlerinin inkübasyonu ise 35°C'de 48 saat tutularak gerçekleştirildi. Ticari olarak hazır bulunan metil kırmızısı indikatörü (Merck, Almanya) kullanıldı.

Bazı bakteriler besiyerinde bulunan glikozu kullanarak çeşitli organik asitler oluşturmakta ve sonuçta ortamın pH'sını düşürmektedirler. Bu özellikten faydalanarak izolatların glikozdan asit oluşturup oluşturmadığını belirleyebilmek amacı ile metil red testi yapıldı. Bu teste kullanılan metil-red indikatörü pH 6.2'de sarı, pH 4.2 ve daha düşük pH'larda ise kırmızı bir renk oluşturmaktadır.

Bazı bakteriler karbonhidratları parçalayarak asetoin (asetil metil karbinol) oluşturmaktadırlar. Asetoin, potasyum hidroksid (KOH) varlığında okside olarak diasetil meydana getirmektedirler. Bu ürün ise α -naftol ile reaksiyona girdiğinde kırmızı bir renk oluşturmaktadırlar.

İzolatların MR-VP besiyerine ekimlerini takiben besiyerlerinin inkübasyonu ise 35°C'de 48 saat inkübe edilerek yapıldı. İnkübasyondan sonra ortama α -naftol ve KOH içeren Voges-Proskauer ayracı (Merck, Almanya) ilave edildi. Besiyerinin hava ile temas etmesi için çalkalandıktan sonra, 15 dakika içerisinde kırmızı renk oluşması testin pozitif olduğunu, renk değişikliğinin olmaması ise testin negatif olduğunu gösterdi.

3.3.10. 50X TAE Elektroforez Tamponu: 1 litre

-242 gr Tris Base (Sigma)

-57.1 ml Glasiyal asetik asit

-100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) (Sigma)

Tris base, 600 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra glasiyal asetik asit ve son olarak EDTA eklendi. Son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. TAE 50X olacak şekilde stok solüsyon olarak hazırlandı ve 1xTAE olacak şekilde sulandırılarak kullanıldı.

3.3.11. Yükleme (Loading) Tamponu (6X)

- 40 gr süzkroz
- 0.25 gr Bromfenol mavisi

Yukarıda miktarları verilen maddeler karıştırılarak 100 ml olacak şekilde distile su içinde çözdürüldü. Porsiyonlanarak -20 °C'de muhafaza edildi.

3.3.12. Triptik Soy Buyyon (Saklama Besiyeri)

Ticari olarak temin edilen Triptik Soy Buyyon besiyeri (Tryptic Soy Broth, Merck Almanya) 3 gr tartılarak bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Sterilazyondan sonra oda ısısında 30 dk bekletilen besiyerine 25 ml gliserol eklendi. Daha sonra 1'er ml olarak eppendorf tüplere porsiyonlanarak bakteri izolatlarının derin dondurucuda saklanması için kullanıldı.

3.3.13.Fosfat Buffer Tamponu (PBS)

- 8.0 gr NaCl
- 0.2 gr KCl
- 1.15 gr Na₂HPO₄
- 0.2 gr KH₂PO₄

tartılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. pH'sı 7.2 olacak şekilde ayarlanarak +4°C'de saklanır.

3.4. Genomik DNA ekstraksiyonu

E.coli izolat sayısı hedeflenen sayıya ulaştığında izolatların nükleik asit ekstraksiyon işlemlerine geçildi. Genomik DNA ekstraksiyonu için ticari olarak temin

edilen GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis, Amerika) kullanıldı. Ekstraksiyon adımları aşağıdaki şekilde uygulandı.

- Saklama besiyeri içinde -70°C 'de bulunan bakteriler EMB'ye pasaj çekildi ve 37°C 'de 48 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda saf olarak bulunan tek bir koloniden alınarak steril kapaklı santrifüj tüplerine 1-3 ml konulmuş olan Müller Hinton Broth besiyerine ekim yapıldı ve 37°C 'de 48 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda tüpler 3500 devirde 15 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında süpernatant kısım döküldü.
- Tüplerde bulunan pelletin üzerine 1000 μl serum fizyolojik konuldu ve vorteks, pipetaj yapıldı.
- 6000 g' de 2dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant kısım döküldü.
- Pellete 100 μl Buffer R1 eklendi ve hücrelerin tamamı pipetaj yapılarak resüspanse edildi.
- Hücre süspansiyonu içine 10 μl (50mg/ml) lizozim enzimi eklendi, vorteks yapıldı ve 37°C ' de 20 dakika inkübe edildi.
- 10.000g'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatantın tamamı uzaklaştırıldı.
- Pellete 180 μl Buffer R2 resüspanse edildi ve 20 μl Proteinaz K eklendi. Vortekslendi. 65°C , 1000 rpm' de 20 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda tüplere 400 μl Buffer BG eklendi ve homojen bir solüsyon elde edilene kadar tüp birkaç kez alt üst edilerek iyice karıştırıldı. 65°C ' de 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda tüplere 200 μl %100'lük etil alkol eklendi ve hemen vortekslendi.
- Ependorf tüplerde bulunan bu karışım toplama tüpünün içine yerleştirilmiş spin kolona aktarıldı.
- 10.000g' de 1 dakika santrifüj edildi. Sıvı içeren alttaki tüp atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.

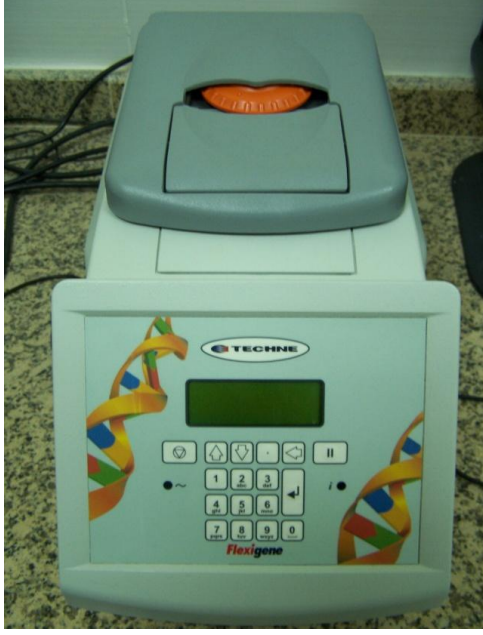
- 750 µl yıkama tamponu eklendi ve 10.000g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- Kalan ethanolu uzaklaştırmak için 10,000g' de 1 dakika santrifüj edildi.
- Spin kolon 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpe transfer edildi.
- Mikrosantrifüj tüpe transfer edilen spin kolon üzerine 50-100 µl 70°C' ye ısıtılmış Elution Buffer eklendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
- 10,000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Spin kolon atıldı ve mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda genomik DNA elde edildi.

3.5. PCR Amplifikasyonu

Ekstrakte edilen genomik DNA örneklerinden ticari olarak elde edilen *HlyA*, *Stx-1*, *Stx-2* primerleri kullanılarak ısı döngü cihazında PCR amplifikasyonu yapıldı (Çizelge 3.2, Şekil 3.3).

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan oligonükleotid dizileri ve fragment büyüklükleri.

Primer	Hedef gen	Primer dizisi (5'-3')	Fragment boyutu (bp)	Referans
HlyA	hlyA-F	GTA GGG AAG CGA ACA GAG	361	Wang et. al., 1997
HlyA	hlyA-R	AAG CTC CGT GTG CCT GAA	361	Wang et. al., 1997
Stx1	stx1-F	ACA CTG GAT GAT CTC AGT GG	614	Manna et. al., 2006
Stx1	stx1-R	CTG AAT CCC CCT CCA TTA TG	614	Manna et. al., 2006
Stx2	stx2-F	CCA TGA CAA CGG ACA GCA GTT	779	Manna et. al., 2006
Stx2	stx2-R	CCT GTC AAC TGA GCA CTT TG	779	Manna et. al., 2006



Şekil 3.3. PCR amplifikasyonunda kullanılan ısı döngü (Thermal cycler, Techne Flexigene, İngiltere) cihazı.

Çalışmada PCR karışımı 25 µl olacak şekilde ayarlandı (Çizelge 3.3, Çizelge 3.4).

Çizelge 3.3. Stx-1 ve Stx-2 gen bölgeleri için PCR karışımları

Bileşen	Her örnek için µl hacim
Distile su	12µl
Buffer	2.5µl
dNTP	1µl
Taq DNA Polimeraz	0.5µl
MgCl ₂	4µl
Stx-1 forward (F)	1µl
Stx-2 F	1µl
Stx-1 reverse (R)	1µl
Stx-2 R	1µl
Genomik DNA	1µl
Toplam	25µl

Çizelge 3.4. Hly-A gen bölgeleri için PCR karışımları.

Bileşen	Her örnek için µl hacim
Distile su	14µl
Buffer	2.5µl
dNTP	1µl
Taq DNA Polimeraz	0.5µl
MgCl ₂	4µl
O157-3	1µl
O157-4	1µl
Genomik DNA	1µl
Toplam	25µl

Daha sonra aşağıdaki PCR döngüsü uygulandı (Çizelge 3.5, Çizelge 3.6).

Çizelge 3.5. *hlyA* gen bölgeleri amplifikasyonu için ısı döngüleri.

Aşama	Tanımlama	Sıcaklık	Süre	
1	İlk denatürasyon	94 °C	4 dk.	
2	Denatürasyon	94 °C	45 sn.	} 30 döngü
	Bağlanma (Annealing)	61 °C	1 dk.	
	Uzama	72 °C	1 dk.	
3	Son uzama (final extension)	72 °C	7 dk.	
4	Bekleme	+4 °C	∞	

Çizelge 3.6. *stx1*, *stx2* gen bölgeleri amplifikasyonu için ısı döngüleri.

Aşama	Tanımlama	Sıcaklık	Süre	
1	İlk denatürasyon	94 °C	4 dk.	
2	Denatürasyon	94 °C	45 sn.	} 30 döngü
	Bağlanma (Annealing)	61 °C	1 dk.	
	Uzama	72 °C	1 dk.	
3	Son uzama (final extension)	72 °C	7 dk.	
4	Bekleme	+4 °C	∞	

3.5.1. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Tekniği ile Görüntülenmesi

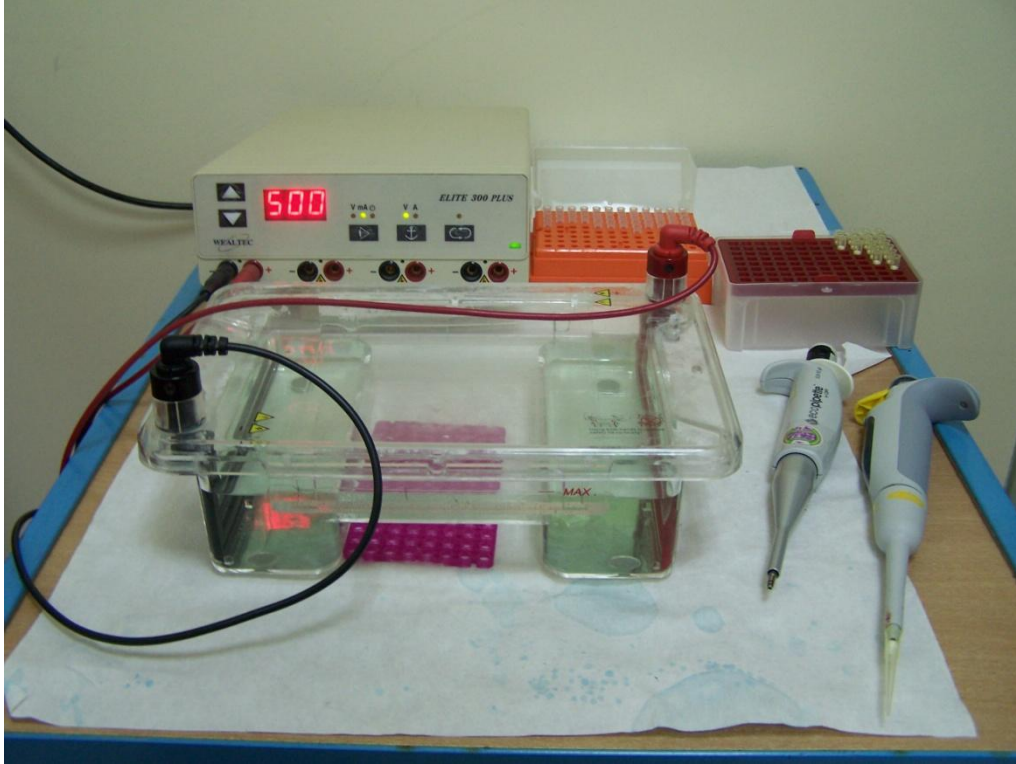
PCR işleminden sonra amplifikasyon ürünlerinin varlığı % 2'lik agaroz jelde yürütülerek araştırıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu kullanıldı. TAE 50X olacak şekilde stok solüsyon olarak hazırlandı ve 1xTAE olacak şekilde sulandırılarak kullanıldı.

- 50X TAE Elektroforez Tamponu: 1 litre
- 242 gr Tris Base (Sigma)
- 57.1 ml Glasiyal asetik asit
- 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) (Sigma)

242 Gram Tris base 600 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra glasiyal asetik asit eklendi. En son olarak EDTA eklendi ve son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

1. Elektroforez için stok TAE solüsyonundan 1xTAE olacak şekilde distile su ile dilüe edildi.
2. 1 gr agaroz tartılarak 100 ml'lik bir erlenmayere konuldu, 50 ml 01X TAE tamponu eklendi (%2'lük agaroz) ve 10 mg/ml'lik etidyum bromid'den 4 µl ilave edildi.

3. Mikrodalga fırında 1-2 dk kaynatıldı.
4. Elektroforez tarakları jel dökme kabına, tabanda 1mm boşluk kalacak şekilde ayarlanarak yerleştirildi.
5. Yaklaşık 60° C'ye kadar soğutulan agaroz jeli, jel kabına dökülüp donması için oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.
6. Taraklar dikkatlice çıkartılarak jel kabı elektroforez tankına (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD) yerleştirildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Elektroforez ünitesi.

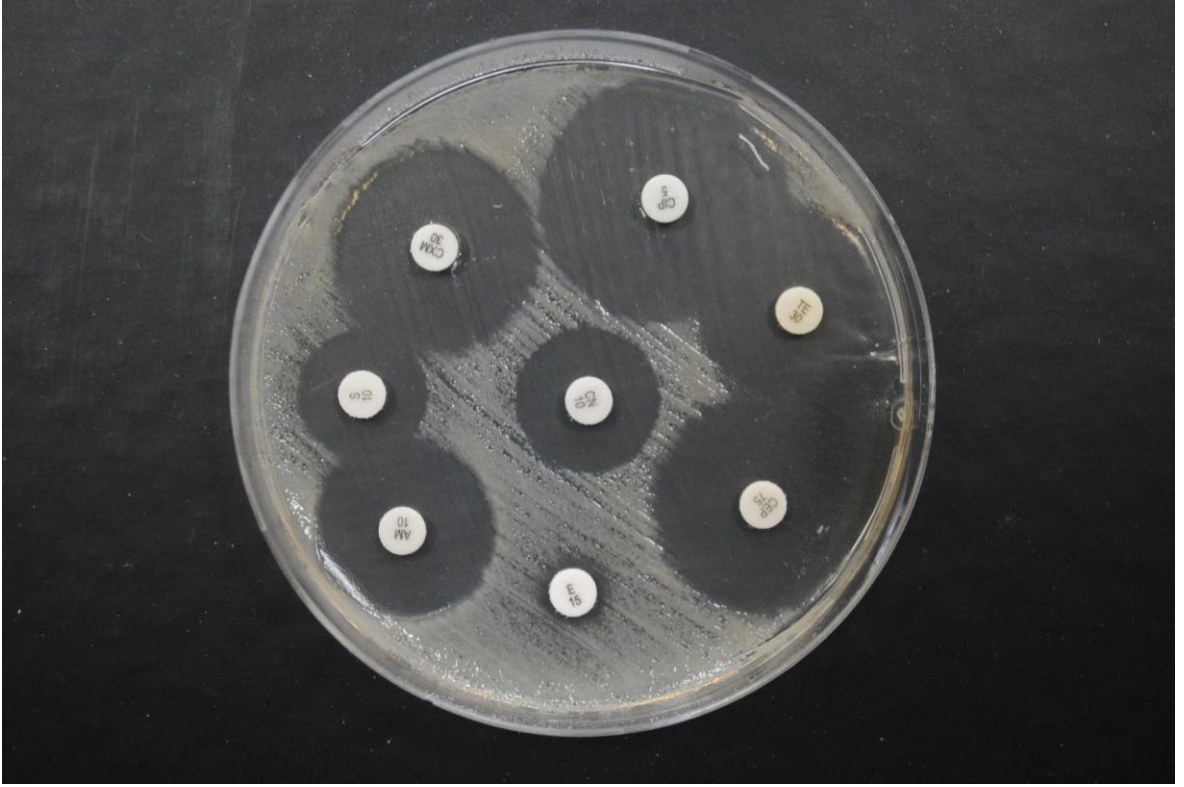
7. Amplifiye edilen örneklerden 7'şer μl 3 μl yükleme tamponu ile karıştırılarak jelde açılan kuyucuklara yerleştirildi.
8. Yükleme sırasında DNA marker (100 bp'lik, Fermentas) kullanıldı.
9. Jele elektrik akımı (15 Volt/cm) verilerek 30 dk elektroforez yapıldı.
10. Yaklaşık 30 dk sonra yürütme işlemi durdurularak jel görüntüleme cihazı (Wealtec, Dolphin-View, ABD) ile bantların varlığı incelendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Görüntüleme (UV Translimunatör) cihazı.

3.6. Antimikrobiyallere Direncin Saptanması (Disk Difüzyon Yöntemi)

İzolatların 24 saatlik saf kültürlerinden 0.5 McFarland bakteri süspansiyonu ayarlanarak steril eküvyon yardımı ile daha önceden 4 mm kalınlığında dökülerek hazırlanmış olan Müller-Hinton agar yüzeyine bakteri süspansiyonu homojen olarak yayıldı. Antibiyotik diskleri disklerin merkezi birbirlerinden en az 2.5 cm ve petri kenarından 1.5 cm olacak şekilde (Kirby-Bauer yöntemi) yerleştirildi. Her bir suş için bir Müller Hinton Agar besiyerine antibiyotik diskleri yerleştirilerek test yapıldı. Plakaların inkübasyonu 37°C’de 24 saat süre ile yapıldıktan sonra disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonu esas alınarak değerlendirildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Müller Hinton Agar besiyerinde 24 sa. inkübasyon sonunda antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zon çaplarının görünümü

İzolatların *in vitro* antibiyotik duyarlılıkları “Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemi” (Bauer ve ark. 1966) ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına uygun olarak yapıldı. Antibiyotikduyarlılık testinde eritromisin (15µg), ampisilin(10 µg), gentamisin (10 µg), sefuroksim (30 µg), streptomisin (10 µg), tetrasiklin (30 µg), sefaperazon (30 µg), siprofloksasin(5 µg) ve streptomisin (10 µg) olmak üzere toplam 8 farklı antibiyotik diski (Oxoid, İngiltere) kullanıldı. Elde edilen sonuçlar CLSI kriterlerine göre yorumlandı (Çizelge 3.7) (CLSI 2007).

Çizelge 3.7: Antibiyotik diskleriyle oluşan inhibisyon zonlarının değerlendirme kriterleri

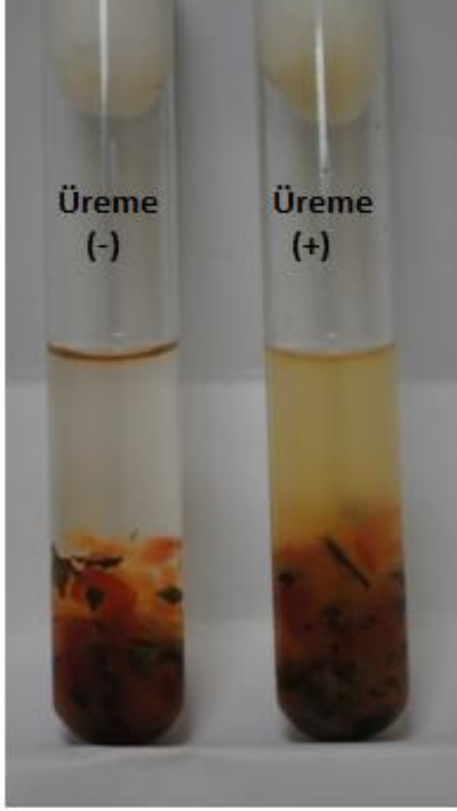
Antimikrobik Ajan	Kısaltması	μg	Dirençli mm	Orta duyarlı mm	Duyarlı mm
Ampisilin	AM	10	≤ 13	14-16	≥ 17
Eritromisin	E	15	≤ 13	14-22	≥ 23
Gentamisin	CN	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Sefoperazon	CEP	75	≤ 15	16-20	≥ 21
Sefuroksim	CXM	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Streptomisin	S	10	≤ 11	12-14	≥ 15
Siprofloksasin	CIP	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Tetrasiklin	TE	30	≤ 14	15-18	≥ 19

4.BULGULAR

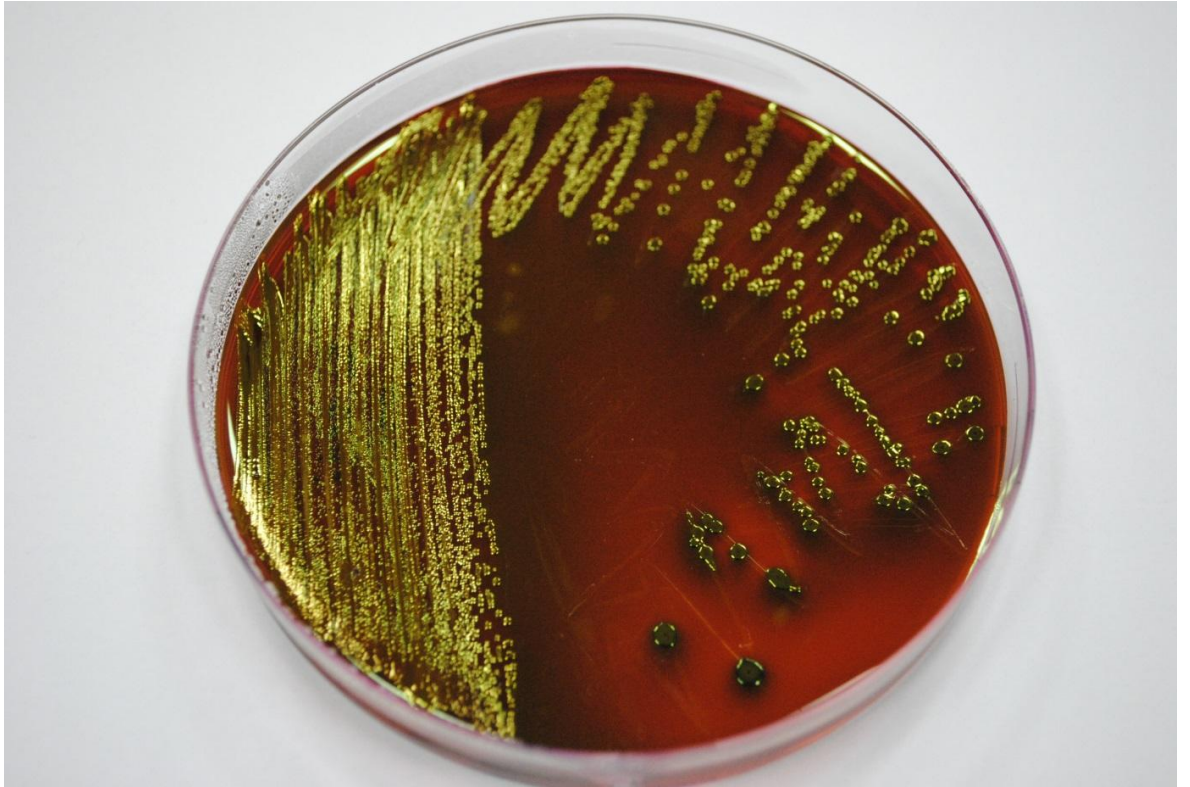
Bu çalışmada, Hatay'da bulunan lokanta, kafeterya ve büfe gibi yerlerde tüketime sunulan salata örneklerinden aseptik şartlarda 250 gr alınarak soğuk zincir altında MKÜ Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji-Bakteriyoloji laboratuvarına getirildi. Salata örneklerinden üreme gerçekleşen 150 adet salata örneğinin *E.coli* açısından mikrobiyolojik analizi gerçekleştirildi. *E.coli* O157: H7 tiplendirilmesi *E.coli* O157:H7'ye özgü *hly-A* geni varlığı belirlenerek PCR yöntemiyle yapıldı. *E.coli* O157:H7 olarak tiplendirilen örneklerde DNA izolasyonu ve DNA izolasyonunu takiben uygun *stx1* ve *stx2* primerleri yardımıyla aranan toksin gen bölgelerinin PCR amplifikasyonları yapıldı. Amplifiye edilen ürünler %2'lik agaroz jelde yürütülerek araştırıldı. *E.coli* O157:H7 olarak tiplendirilen izolatların disk difüzyon yöntemi ile Eritromisin, Ampisilin, Gentamicin, Siprofloksasin, Tetrasiklin, Streptomisin, Sefaperazon, Sefuroksim antibiyotiklere karşı CLSI kriterleri baz alınarak direnç patternleri belirlendi.

4.1. Bakteriyolojik Bulgular

Çalışmada salata örnekleri 5 ml Müller-Hinton Broth besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda (Şekil 4.1) katı agara (EMB ve/veya Endo agar) ekimleri (Şekil 4.2), saflaştırma işleminden sonra tiplendirilme işlemi şeker kullanımı (glukoz, laktoz, sakkaroz), indol testi, metil kırmızısı testi/voges proskauer testi, sitratı karbon kaynağı olarak kulanma, üreaz aktivitesi, hareketlilik gibi biyokimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından değerlendirilerek tiplendirildi. Bütün testler CLSI prosedürlerine uygun olarak yapılarak değerlendirildi.



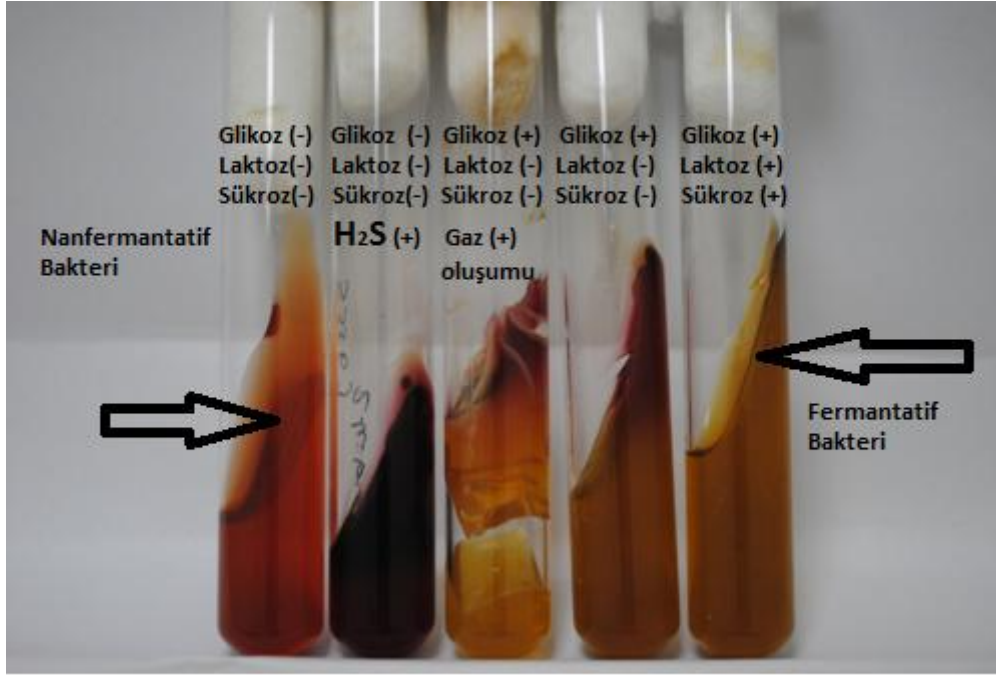
Şekil 4.1. Salata örneklerinin Müller-Hinton Broth besiyerinde 24 saatlik inkübasyonu sonundaki görünümü



Şekil 4.2. EMB agarda laktöz pozitif *E.coli* izolatlarının görünümü.

4.1.1. Glikoz, Sukroz ve Laktozun Kullanımı, H₂S Oluşturma:

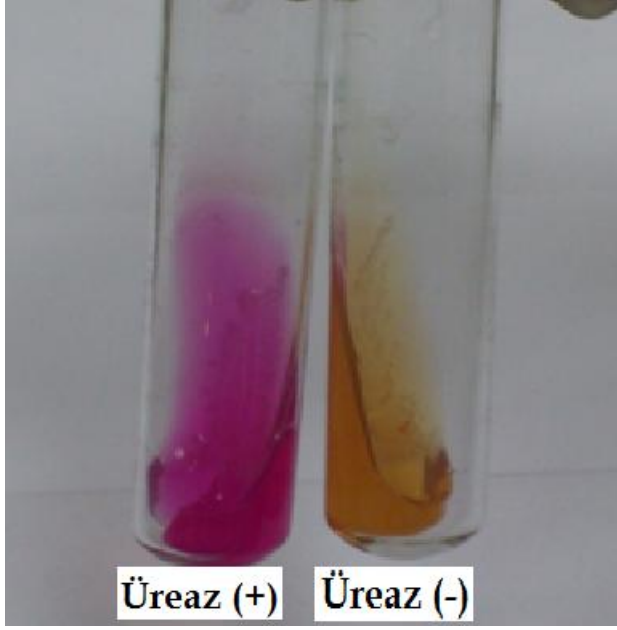
Üç şekerli demirli besiyeri TSI agar (Triple Sugar Iron agar) kullanılarak bakterilerin glikoz, laktoz, sükkroz üzerindeki etkileri ve H₂S oluşturup oluşturmadıkları gözlemlendi. Gerek *E.coli* ve gerekse de *E.coli* O157:H7 izolatlarının laktozu kullandıkları katı besiyerinde (EMB agar), glukoz ve sakkaroz kullanımı ise TSI agarda gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. TSI agarda glikoz, laktoz ve sakkarozun fermente olması sonucu asit ürünlerin oluşumu ile besiyerinin renginin kırmızıdan sarıya dönmesi.

4.1.2. Üreaz Aktivitesi:

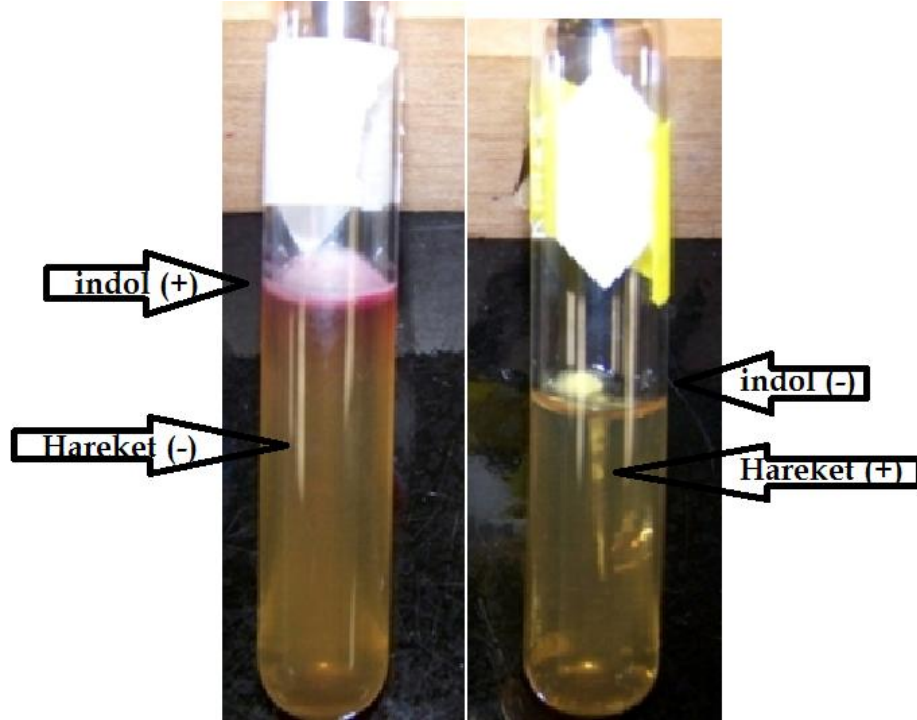
Christensen üre besiyerine ekim yapılan izolatların 24 saat inkübasyondan sonra ürenin hidrolizini gerçekleştirmesi, besiyerinde bulunan fenol kırmızısının ortamda oluşan amonyaktan dolayı ortamı alkalileştirmesi ve besiyerinin renginin pembeye dönüşmesi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Christensen üre besiyerinde enzimi pozitif reaksiyonunun görünümü.

4.1.3.İndol Oluşumu ve Hareket Testi

SIM agarda *E.coli* suşlarının triptofanın bakterileri tarafından oluşturulan triptofanaz enzimi sayesinde hidrolize uğratması ve oluşan indolün Kovacs ayırıcı ilave edildikten sonra üst kısımda kırmızı halka oluşumunun gözlenmesi. Ayrıca, batırma kültür şeklinde yapılan ekim çizgisi boyunca hareketin gözlenmesi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Triptofan besiyerinde pozitif *E.coli*'de indol ve hareket testi.

4.1.4.Sitrat Kullanımı

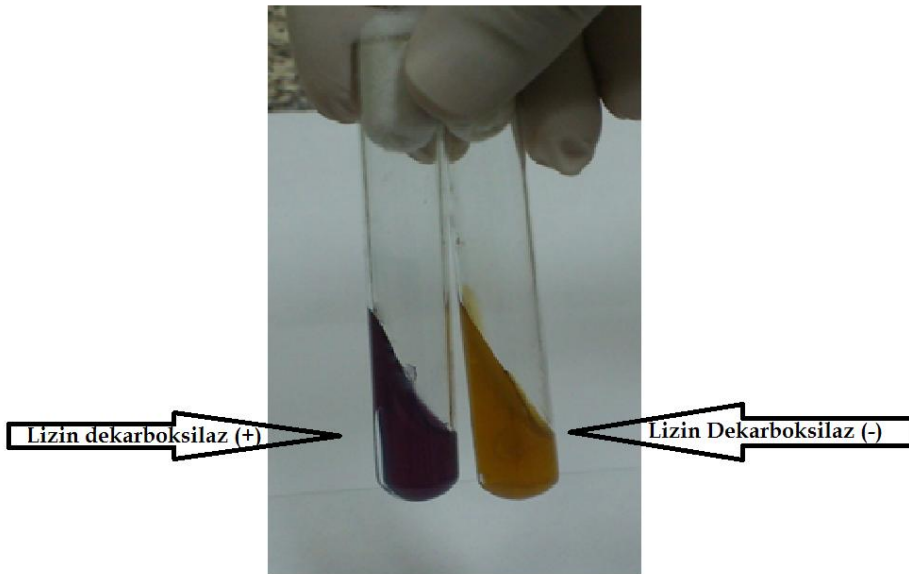
Sitrat besiyerine ekimi yapılan bakterinin karbon kaynağı olarak kullanamadığından besiyeri renginin değişmediği tespit edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Sitrat besiyerinde *E.coli*'nin sitrat negatif testi reaksiyonunun gösterilmesi.

4.1.5.Lizin Dekarboksilaz

Lizin Iron Agara inokülasyondan sonra sonunda besiyerinin dik kısmında viyole renk oluşumunun gözlenmesi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Lizin Iron Agarda *E.coli*'nin lizin dekarboksilaz reaksiyonunun gösterilmesi.

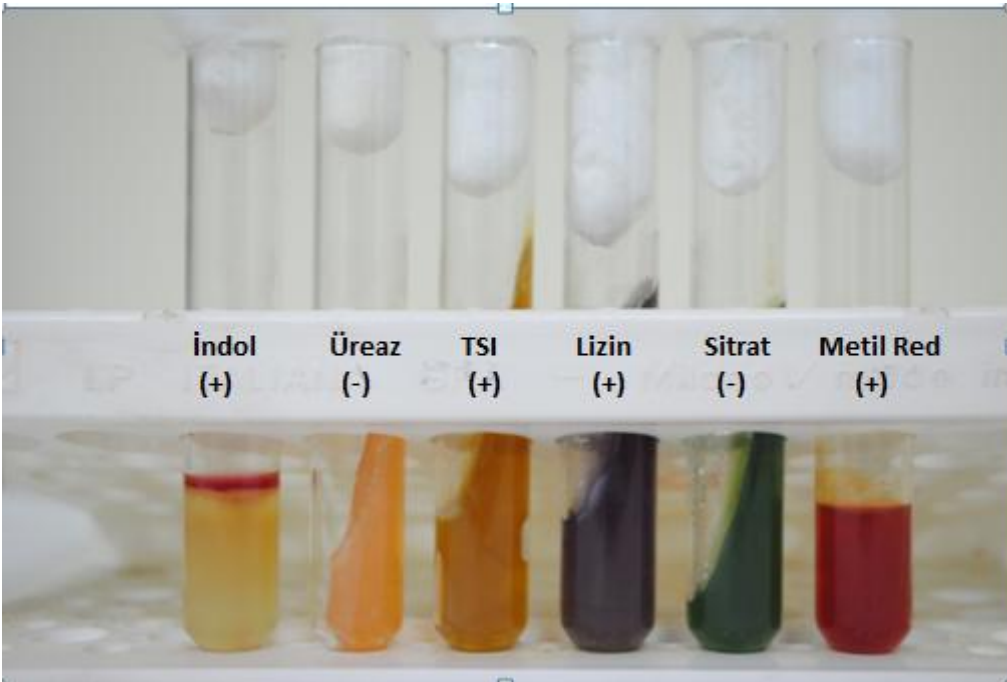
4.1.6. Metil Kırmızısı Testi

Glikoz buyyonda *E.coli* izolatlarının 24 saat inkübasyondan sonra organik asitler oluşturması, sonuçta ortamın pH'sının 4.2 ve daha aşağılara düşmesi sonucu metil kırmızısı indikatörünün besiyerini kırmızıya dönüştürmesi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Glikoz buyyonda *E.coli*'nin pozitif metil kırmızısı testinin gösterilmesi.

Bu testler sonucunda EMB veya Endo agarda laktoz pozitif olarak tespit edilmiş izolatlardan indol, metil kırmızısı ve lizin dekarboksilaz testleri pozitif, üreaz ile sitrat negatif, şekerlere etki ederek gaz ve asit oluşturan, H₂S oluşturmayan bakteriler *E.coli* olarak tanımlandı (Şekil 4.9).

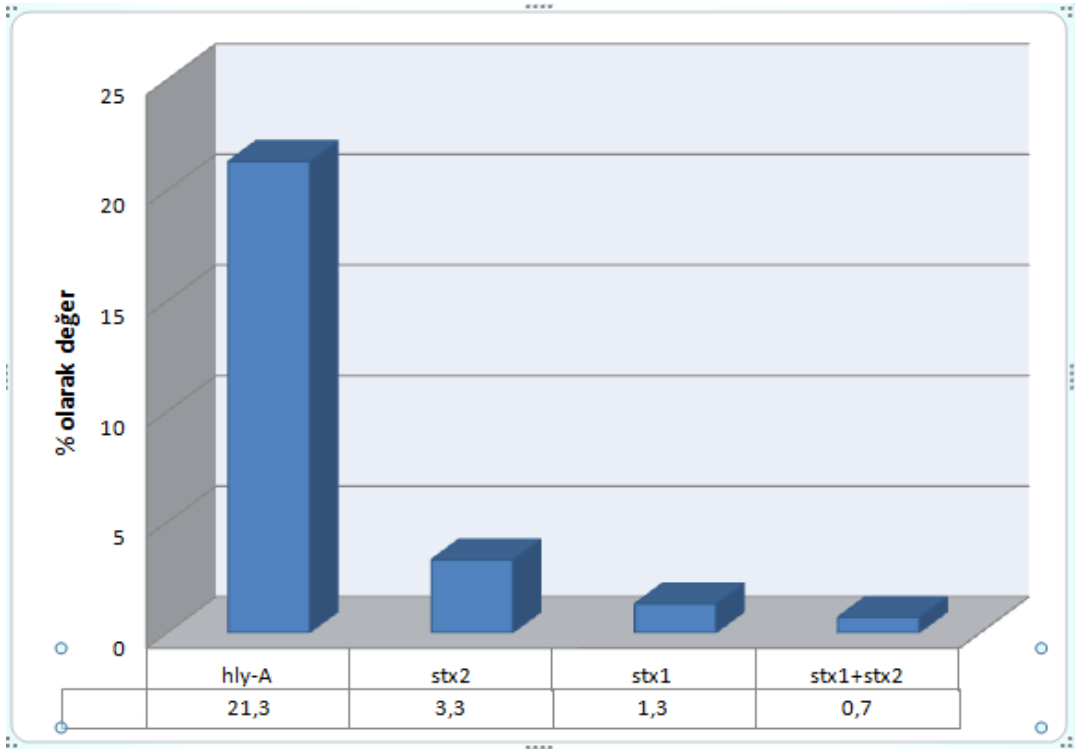


Şekil 4.9. *E.coli* için tipik IMVIC görüntüsü

4.2.PCR Bulguları

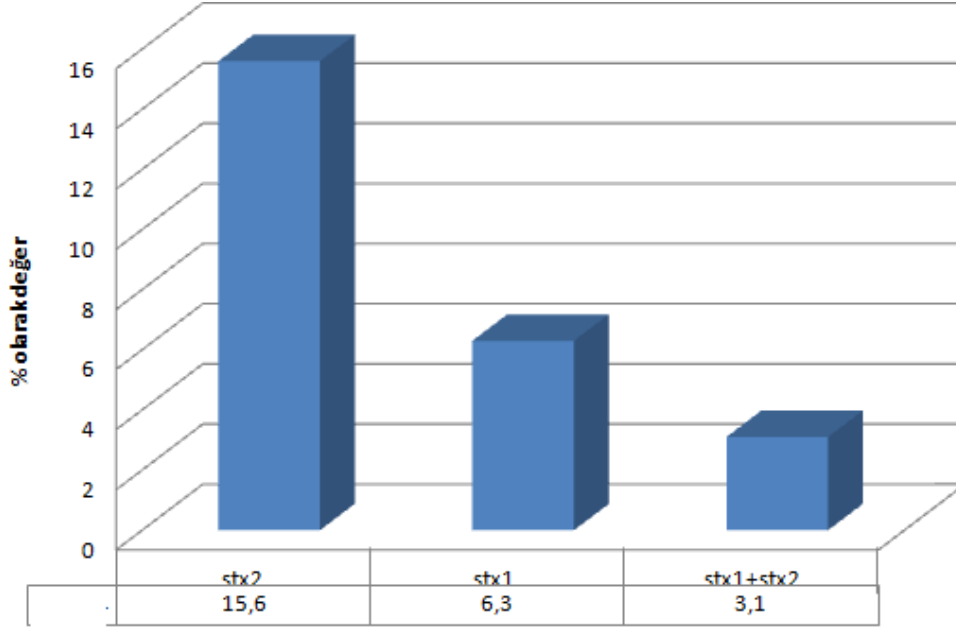
Bakteriyolojik identifikasyon işlemleri sonucunda *E.coli* olarak tiplendirilen örneklerin DNA izolasyonlarını takiben *hlyA* genine özgü primerler kullanılarak *hlyA* geni varlığı açısından değerlendirilerek *E.coli* O157:H7 insidansı belirlendi. Daha sonra *E.coli* O157:H7 izolatlarında shiga toksin 1 ve 2 genlerine özgü primerler kullanılarak EHEC suşların arasında *stx1* ve *stx2* toksin genlerinin frekansı tespit edildi. Çalışmada amplifiye edilen PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek araştırıldı.

Araştırmada 327 salata örneğinden 150'sinde Türk Gıda kodeksi Tebliğine göre anlamlı derecede *E.coli* üremesi tespit edildi. *E.coli* olarak identifiye edilen 150 izolatın 32(%21.3)'sinin *E.coli* O157:H7 olduğu tespit edildi. *E.coli* O157:H7 varlığı mikroorganizmanın *hly-A* geni varlığı tespit edilerek yapıldı. Bu 32 *E.coli* O 157:H7 izolatın 5 (%15.6)'inin *stx2*, 2 (%6.3)'sinin *stx1* ve 1 (%3.1) izolatın ise hem *stx1* hemde *stx2* geni açısından pozitif olduğu tespit edildi (Şekil 4.10).



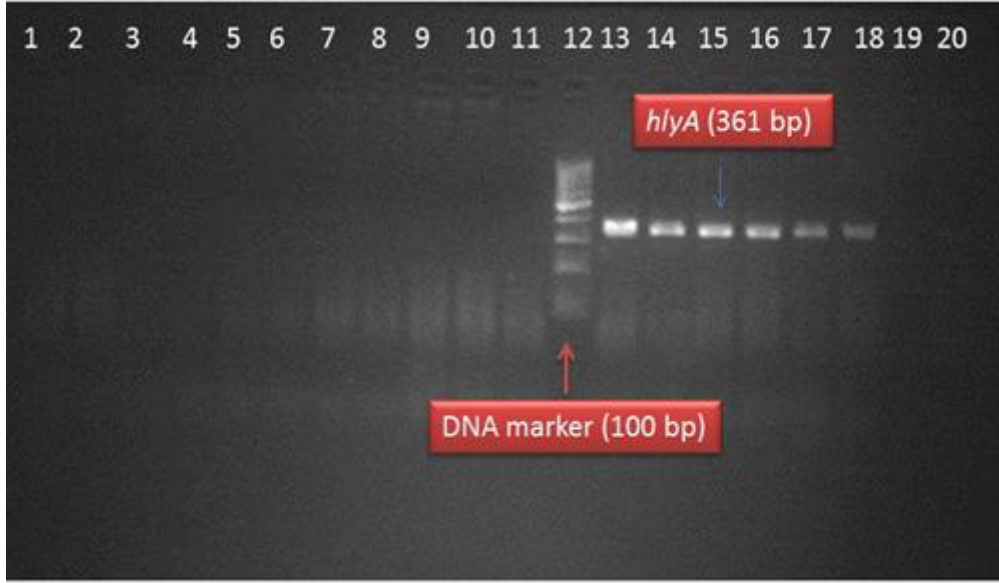
Şekil 4.10. E.coli izolatlarında *hlyA*, *stx1* ve *stx2* toksin genlerinin sıklığı.

Salata örneklerinde *E.coli* O157: H7 olarak tanımlanan 32 izolatın %15.6 (5/32)'sında *stx2*, %6.3 (2/32)'ünde *stx1* ve %3.1 (1/32)'inde ise hem *stx1* hem de *stx2* toksin genlerinin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11).

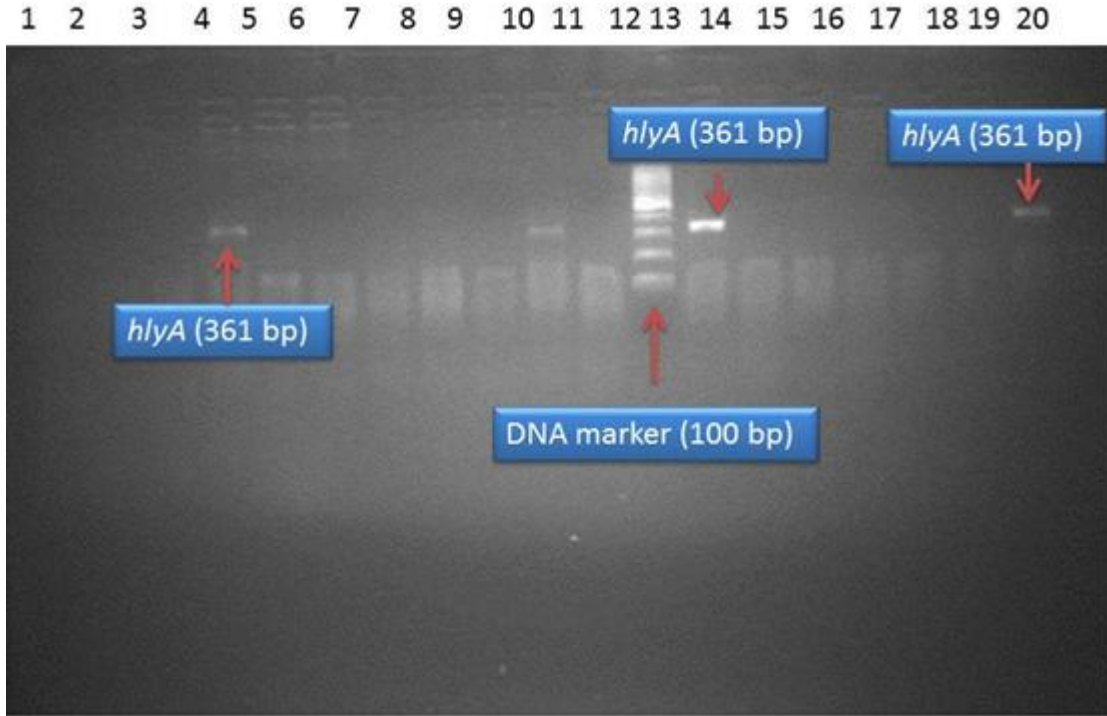


Şekil 4.11. *E.coli*O157:H7 izolatlarında shiga toksin genlerinin (*stx1* ve *stx2*) sıklığı.

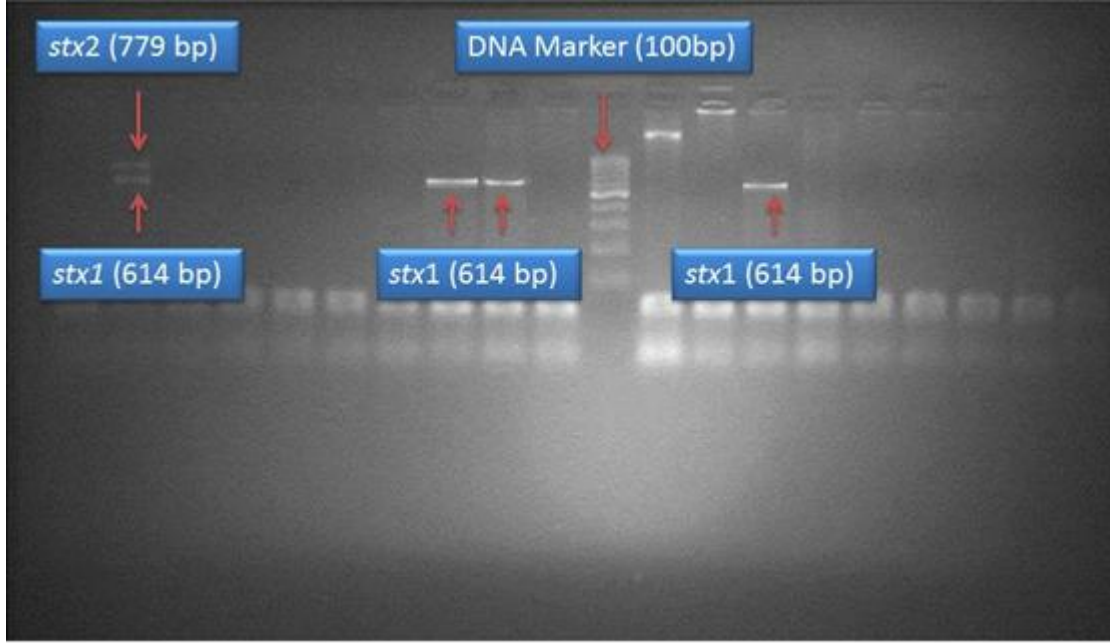
E.coli O157:H7 suşlarında tespit edilen *hly-A*, *stx1* ve *stx2* genleri PCR amplifikasyonunu takiben agaroz jelde yürütülerek %2'lik jelde görüntülendi. Bu genlerin (*hly-A*, *stx1* ve *stx2*) agaroz jel elektroforez görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15).



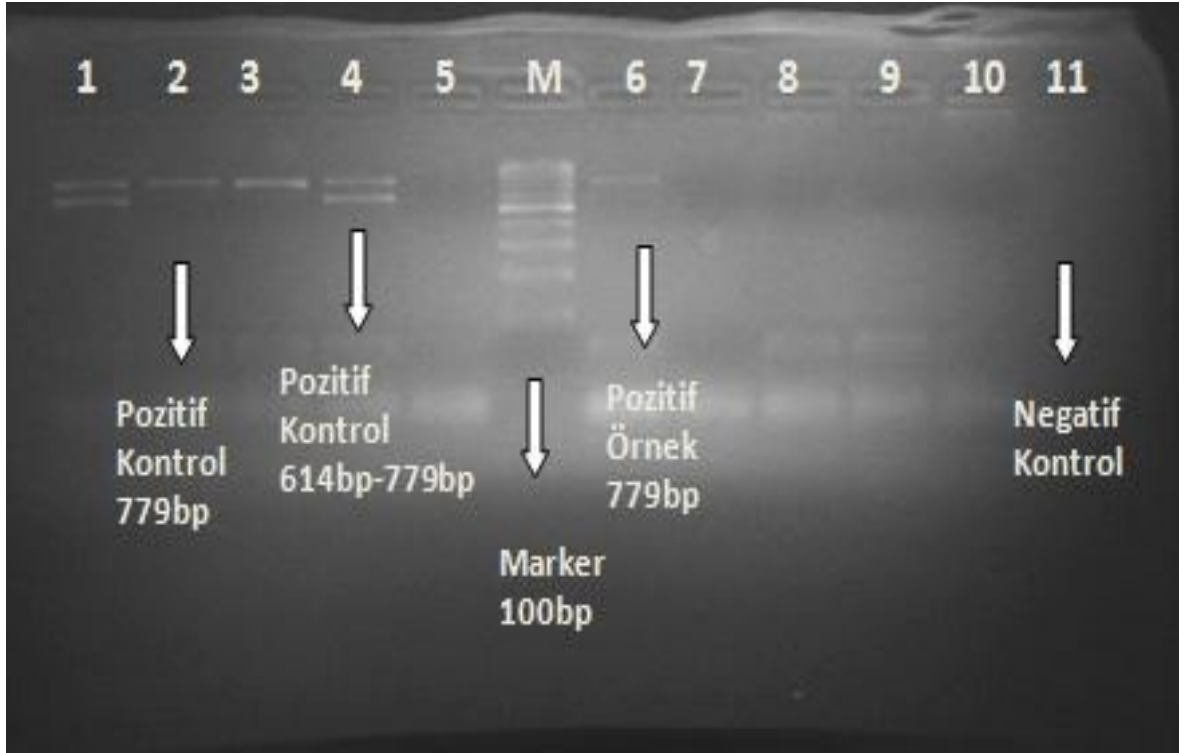
Şekil 4.12. *Hly-A* (hemolizin A) geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü
M: 100 bp DNA Ladder. *HlyA* (361 bp): 14. 18. bandlar. Negatif kontrol: 19. ve 20. bandlar. Pozitif Kontrol: 13. band



Şekil 4.13. *Hly-A* (hemolizin A) geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü
M: 100 bp DNA Ladder. *HlyA* (361 bp): 5., 11. ve 19. bandlar. Negatif kontrol: 1. ve 2. bandlar. Pozitif Kontrol: 13. band



Şekil 4.14. *stx1* (614 bp) ve *stx2* (779 bp) genlerinin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. DNA marker (100 bp ladder). *stx1* (614 bp), *stx2* (779 bp).



Şekil 4.15. *Stx1* ve *stx2* genlerinin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 100 bp DNA Ladder. *stx1*(614 bp) ve *stx2* (779 bp),pozitif örnek 6 numaralı band ve negatif kontrol: 11 numaralı band.

4.3. *E.coli* O157:H7 İzolatlarında Antibiyotik Direnci

E.coli O157:H7 izolatlarında disk difüzyon yöntemi ile Eritromisin, Ampisilin, Gentamisin, Siprofloksasin, Tetrasiklin, Streptomisin, Sefaperazon, Sefuroksim CLSI klavuzu esas alınarak antimikrobiyal direnç paternleri belirlendi.

Kirby-Bauer Disk difüzyon yöntemine (Bauer ve ark. 1966) göre *hlyA* pozitif olan 32 *E.coli* O157:H7 izolatının antibiyotik duyarlılık oranları ve duyarlılıklarının dağılımı görülmektedir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Kirby-Bauer Disk difüzyon yöntemine göre *hlyA* açısından pozitif (n=32) *E.coli* O157:H7 suşlarının antibiyotik duyarlılık yüzdeleri.

Antibiyotik	Duyarlı		Dirençli	
	n	%	n	%
Eritromisin	0	0	32	100
Ampisilin	10	31.2	22	68.8
Gentamisin	30	93.7	2	6.3
Sefuroksim	32	100	0	0
Tetrasiklin	31	96.9	1	3.1
Siprofloksin	32	100	0	0
Sefoperazon	32	100	0	0
Streptomisin	27	74.4	5	15.6

Çalışmada *E.coli* O157:H7 kökenlerinin tamamı eritromisine dirençli bulundu. Eritromisin dışında en yüksek direncin ampisiline karşı (%68.8; 22/32) görüldüğü tespit edilirken, sefuroksim, siprofloksasin ve sefaperazonda antimikrobiyal direnç tespit edilmedi, tüm kökenlerin bu üç antibiyotiğe (sefuroksim, siprofloksasin ve sefaperazon) karşı duyarlı oldukları saptandı. Bunlar dışında streptomisin gentamisine ve tetrasiklinlere karşı antimikrobiyal direncin sırasıyla %15.6 (5/32), %6.3 (2/32) ve %3.1 (1/32) olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.2. Shiga toksinleri açısından pozitif *E.coli* O157:H7 kökenlerinde antimikrobiyal ilaç direnç paternleri

Örnek no	E	AM	CN	CXM	TE	CIP	CEP	S
Stx1 pozitif								
1	R	R	S	S	S	S	S	R
2	R	R	S	S	S	S	S	R
Stx2 pozitif								
1	R	R	S	S	S	S	S	S
2	R	R	S	S	S	S	S	S
3	R	S	S	S	S	S	S	S
4	R	R	S	S	S	S	S	S
5	R	R	S	S	S	S	S	S
Stx1 ve Stx2 pozitif								
1	R	R	S	S	S	S	S	R
Toplam direnç yüzdeleri	%100	%87.5	0	0	0	0	0	%37.5

Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3' te *E.coli* O157:H7 izolatlarının *stx1*, *stx2* ve hem *stx1* hem de *stx2* genleri açısından pozitif bulunan kökenlerde eritromisin, ampisilin, gentamisin, sefuroksim, tetrasiklin, siprofloksasin, sefaperazon ve streptomisine karşı antimikrobiyal direnç paternleri görülmektedir. *Stx1* geni açısından pozitif olduğu tespit edilen iki (%6.3) *E.coli* O157:H7 kökeninde de eritromisin, ampisilin ve streptomisine karşı direnç saptanırken, bu kökenlerin gentamisin, sefuroksim, tetrasiklin, siprofloksasin ve sefaperazona duyarlı olduğu tespit edildi. *Stx2* pozitif olduğu saptanan beş (%15.6) *E.coli* O157:H7 kökeninde ise tüm suşlar eritromisine dirençli olarak bulunurken, beş izolattan sadece bir (%20; 1/5) kökenin ampisilin duyarlı, diğer dört (%80; 4/5) kökenin ise ampisiline dirençli olduğu saptandı. Bunun dışındaki tüm antibiyotiklere (gentamisin, sefuroksim, tetrasiklin, siprofloksasin ve sefaperazona) *stx2* geni pozitif olan kökenlerin duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Kirby-Bauer Disk diffüzyon yöntemine göre *stx* açısından pozitif (n=5) *E.coli* O157:H7 suşlarının antibiyotik duyarlılık yüzdeleri.

Stxs	Stx1 için (n:2)				Stx2 için (n:5)				Stx1/Stx2 için (n:1)			
	S		R		S		R		S		R	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Eritromisin	0	0	2	100	0	0	5	100	0	0	1	100
Ampisilin	0	0	2	100	1	20	4	80	0	0	1	100
Gentamisin	2	100	0	0	5	100	0	0	1	100	0	0
Sefuroksim	2	100	0	0	5	100	0	0	1	100	0	0
Tetrasiklin	2	100	0	0	5	100	0	0	1	100	0	0
Siprofloksin	2	100	0	0	5	100	0	0	1	100	0	0
Sefoperazon	2	100	0	0	5	100	0	0	1	100	0	0
Streptomisin	0	0	2	100	5	100	0	0	0	0	1	100

Ayrıca, hem *stx1* hem de *stx2* geni pozitif bulunan bir (%3.1; 1/32) kökenin antimikrobiyal direnç profilinin ise yalnızca *stx1* toksin geni pozitif kökenin ilaç direnç profili ile tamamen aynı olduğu tespit edildi. Bu kökenin eritromisin, ampisilin ve streptomisine dirençli olduğu bulunurken, test edilen diğer tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu bulundu.

5.TARTIŞMA

Günümüzün en önemli sağlık sorunları arasında yer alan gıda kaynaklı hastalıkların frekansında ciddi artışlar görülmektedir. Gıda kaynaklı hastalıkların sıklığı ve etkenlerin tür düzeyinde tespitleri gelişmiş ülke verilerine dayanmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde ise gıda kaynaklı hastalıklar ve etkenleri hakkında veriler oldukça sınırlıdır. Kayıtlı gıda kaynaklı hastalıkların gerçek değerlerin oldukça düşük bir bölümü (%10 kadar) yansıttığı tahmin edilmektedir. Gıda patojenlerinin çoğu akut gastroenteritin yanı sıra ciddi metabolik problemlere de yol açabilmektedir. (*E.coli*O157:H7'nin sebep olduğu HUS gibi) (Meng ve Doyle 1998).

E.coli O157:H7 çok düşük titrelerde dahi infeksiyöz olabilmesinden dolayı (<10 hücre), (Bach 2002) bilinen gıda kaynaklı patojenlerin en önemlilerinden biri olarak kabul edilmektedir (Blanco 2003).

Gıda kaynaklı patojenlerin başında *E.coli* O157:H7 gelmektedir. *E.coli*, O157:H7 *E.coli* türünün en tipik üyelerinden biri olup sorbitol fermentasyonu yapmamaları ve β -glukoronidaz aktiviteleri göstermemeleri ile *E.coli*'den ayrılır. *E.coli*, O157:H7'nin sebep olduğu üç klinik tablo; HUS, HC ve TTP'dir. *E.coli*O157:H7 önemli bir insan patojenidir. *E.coli* O157:H7 Shiga toksinler (*Stx1* ve *Stx2*) ve enterohemolizin (*hlyA*) gibi çeşitli virulans faktörlerine sahip olan, halk sağlığı için dünya çapında bir tehlikedir (Fedio ve ark. 2011).

E.coli O157:H7'nin *hlyA* geni ile beraber *stx* genlerinin birlikte pozitifliğinin insan sağlığı açısından daha da ciddi tablolar meydana getirdiği bildirilmektedir (Manna 2006).

Sığırlar *E.coli* O157:H7'nin en büyük rezervuarı olup sığır atığı ile kontamine olmuş süt ve et ürünlerinin insan infeksiyonlarının en önemli kaynağı olduğu bildirilmiştir (Armstrong 1996). *E.coli* O157:H7 et ürünleri ile (Sivapalasingam 2004) özellikle az pişmiş kıymanın tüketimiyle ilişkilendirilmiş (Doyle 1991) gıda kaynaklı bir patojendir. *E.coli* O157:H7 salgınlarının %52'si büyükbaş hayvan ürünleri kaynaklıdır (WHO 1997) Bunun yanında en önemli bulaş kaynaklarından biri de kontamine sığır dışkılarıyla ya da

sığır dışkılarının gübre olarak kullanıldığı tarlalarda yetiştirilen sebze ve meyvelerin tüketilmesiyle insan infeksiyonları açısından potansiyel bir tehlike olarak karşımıza çıkmaktadır (Wang ve ark. 1996)

STEC bir insan patojeni olarak ilk kez az pişmiş kıyma tüketimi ile ilişkili HC salgınına neden olduğu 1982'den bu yana (Riley ve ark. 1983) 200'den fazla STEC serotipini hayvanlardan, gıdalarda ve diğer kaynaklardan izole edildiği bildirilmiştir (Griffin 1998). İnsanlarda ciddi infeksiyonlara yol açan tüm STEC serotipleri arasında yer alan O157:H7, O26:H11, O111:NM'nin tüm dünyada HC ve HUS salgınlarına yol açtığı bildirilmektedir (Meng ve Doyle 1998). CDC'nin (*The Center for Disease Control and Prevention*) raporlarına göre Amerika'da *E.coli*O157:H7'nin her yıl 70.000 hasta vakaya ve onlarca ölüme sebep olduğu bildirilmiştir (Mead ve ark. 1999). Bu vakaların %90'a yakınının gıda kaynaklı bulaş nedeniyle olduğu bildirilmektedir. Amerika'da rapor edilen 196 salgın arasından 48'inin (%33.1) kıyma, 4'ünün (%2.8) inek sütü ve 3'ünün (%2.1) ise biftek tüketimine bağlı olarak geliştiği bildirilmiştir (Centers for Disease Control and Prevention Surveillance for outbreak of Escherichia coli O157 1999). Bunlar dışında diğer gıdaların ve çevresel kaynakların da STEC infeksiyonlarının bulaştırılmasında önemli olduğu bildirilmiştir. *E.coli*O157:H7 ve diğer STEC infeksiyonları insidansındaki artışlar patojenin tanısında kültür izolasyonu, serolojik yöntemler, DNA probaları ve PCR yöntemleri dahil olmak üzere çeşitli yöntemlerin kullanılmasına önem verilmiştir.

PCR yöntemi çevresel örneklerde bakterinin belirlenmesi ve kantifikasyonu için gelişmiş yöntemler arasında yer almaktadır (Fode-Vaughan ve ark. 2001).

STEC'in neden olduğu hastalık önemli bir halk sağlığı problemidir. EHEC'in diğer suşlarının genellikle su kaynaklı salgınlardan sık izole edildiği bildirilmesine rağmen, Amerika, Avrupa ve Japonya'da salgınlardan en başlıca sebebinin STEC olduğu bildirilmiştir (WHO 1998, McCarthy ve ark. 1999). Bu mikroorganizmaya ait suşların büyük bir çoğunluğunun *Stx2*, bazılarının *Stx1* ve 2, çok az bir kısmının ise yalnızca *Stx1* salgıladığı bildirilmiştir (Law 2000). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak *E.coli* O157:H7 izolatlarında en sık tespit edilen toksin geninin *stx2* (*stx2*: %15.6, *stx1*: %6.3, ve *stx1/stx2*: %3.1) olduğu tespit edilmiştir.

E.coli O157:H7 gıda veya su ile özellikle içme suyu ve havuz suyu aracılığıyla taşınmaktadır (Chalmers ve ark. 2000, Lee ve ark. 2002). Mikroorganizmanın en olası kaynağı sığır gübresi ile kontamine olan suyun tarımda kullanılmasıdır. Süt ve et sığırları

için önemli bir portördür. Sığırların bu mikroorganizmayı taşıdıklarının farkında olunamamaktadır. Çünkü bu hayvanların mikroorganizmanın spesifik toksinlerine karşı reseptörlerinin eksik olması nedeniyle hayvanda hastalık semptomları gelişmemektedir (Pruimboom-Brees ve ark. 2000).

E.coli O157:H7 tanısında kullanılan hızlı methodların geliştirilmiş olması kamu güvenliğini sağlamak ve salgınların kaynağını tespit etmek açısından önemlidir. Günümüzde gerek moleküler ve gerekse de kültür temelli yöntemler bu mikroorganizmanın tanısında kullanılmaktadır. Klinik örnekler için geliştirilen kültür tabanlı yöntemler antijenik özelliklere dayalı doğrulamaya dayanmaktadır. Bu yöntemlerin dezavantajı *Stx* üretimi ile antijenik ve metabolik özelliklerin tam olarak korele olmamasıdır (Karch ve Bielaszewska 2001). Kültür tabanlı yöntemlerin yavaş olması ve oldukça yoğun iş gücü gerektirmesi salgınlar sırasında çok sayıda olası çevresel kaynağın araştırılma ihtiyacını karşılayamayacağından çok sayıda örneğin analizi için uygun yöntemler olarak değerlendirilmemektedir (Fode-Vaughan ve ark. 2003).

Kültür izolasyonu ve serolojinin aksine, PCR hızlı ve hassas bir alternatif olarak bilinmektedir. PCR'da hedef olarak kullanılan DNA dizileri *Stx* (Brain ve ark. 1992), intimin (Gannon ve ark. 1993), EHEC hemolizin (*hlyA*) (Hall ve Xu 1998) ve β -glukuronidaz (Feng 1993) kodlayan genleri ve *eae* genlerinin fragmentlerini (Meng ve ark. 1996) içermektedir.

Tüm STEC'ler insanlarda hastalığa neden olan anahtar virulans faktör olan Shiga toksinlerin en az birini (*Stx1* ve *Stx2*) üretmektedirler. *Stx1* üzerine yapılan moleküler çalışmalar *Stx1*'in *Shigella dysenteriae* tip 1'in *Stx* ile tamamen benzer olduğunu veya sadece 1 aminoasitin farklılık gösterdiğini açığa çıkartmıştır. *Stx1*'in aksine *Stx2* grubu toksinlerin daha farklı olduğu ve *Stx2*, *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e*, ve *Stx2f* dahil olmak üzere çeşitli altgrupları tanımlanmıştır (Melton-Celsa 1998). Öncelikli farklılık; reseptöre bağlanma tercihi ve afinitesini değiştirebilen B subunitteki sekans çeşitliliğini yansıtmaktadır (Ge ve ark. 2002).

STEC suşları insanlarda HC ve HUS vakalarının da dahil olduğu hastalık salgınları ile ilişkilendirilmektedir. *E.coli* *Stx* toksinlerinin 2 temel kategorileri *Stx1* ve *Stx2*'dir. *Stx1*, *Shigella dysenteriae*'nin Shiga toksinleri ile benzerlik göstermekte nispeten homojen bir gruptur. Halbuki, *Stx2* toksinlerinin serolojik olarak *Stx1*'den farklı olan daha heterojen bir grup olduğu bildirilmiştir (Tyler ve ark. 1991).

STEC izolatları arasında belli suşların insanlar için daha yüksek derecede virulansa sahip olduğu bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda HUS gelişme olasılığının mikroorganizmanın taşıdığı toksin tipiyle alakalı olduğu da bildirilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalarda *Stx2* toksin genlerinin HUS gelişimi açısından *Stx1*'den daha önemli olduğunu gösterilmiştir. Çalışmamızda salata örneklerinden izole edilen *E.coli* suşlarının *stx2* toksin genlerine daha yüksek oranda sahip olması bölgemizde gıda kaynaklı HUS gelişme riskinin bulunduğunu göstermektedir (Paton ve ark. 1995).

E.coli O157:H7 ve diğer STEC suşları gıda zinciri yoluyla taşınan önemli insan patojenleridir. Bu patojenler oldukça düşük infeksiyon dozuna sahip olup hayatı tehdit edebilen ciddi hastalıklara neden olabilmektedir. Kontamine gıdalarda veya hastaların dışkı örneklerinde bu mikroorganizmanın tespiti örnekteki düşük kopya sayısında bulunan patojenin tanısını zorlaştırmaktadır. Genellikle, bu mikroorganizmanın doğru ve hızlı tanısı için PCR bazlı spesifikite ve sensitivitesi oldukça yüksek moleküler yöntemler tercih edilmektedir (Wang ve ark. 2007).

Ülkemizde *E.coli* O157:H7 frekansı çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Ertaş ve arkadaşlarının 2013 yılında hayvan kaynaklı gıda örneklerinde *E.coli* O157:H7 varlığını araştırmak ve multiplex PCR yöntemiyle virulans genlerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada doğranmış et, kıyılmış et, hamburger, çiğ inek sütü ve çiğ inek sütünden yapılan peynirler gibi örneklerin dahil edildiği toplam 500 örnek analiz edilmiş, çalışmada 500 örnekten; doğranmış ette 2 örnekte, kıymada 1 örnekte ve çiğ sütte 2 örnekte olmak üzere toplam 5 (%1) örnekte *E.coli*O157:H7 varlığı tespit edilmiştir. Bu izolatların 3 (%60; 3/5)'ünün *stx1*, *stx2* ve *hlyA* genlerini açısından pozitif olduğu saptanmıştır. Çalışmada ilginç olarak çiğ süt ürünlerinden izole edilen 2 kökeninde *stx1*, *eaeA* ve *hlyA* genlerini barındırdığı bulunmuştur (Ertaş ve ark. 2013). Bizim çalışmamızda ise salata örneklerinden izole edilen 150 *E.coli* izolatının %21.3 (32/150)'ünün *hlyA* geni pozitifliği ile *E.coli*O157:H7 tespit edilirken, shiga toksinlerden *stx2*'nin (%3.3; 5/150) *stx1* (%1.3; 2/150)'den daha yüksek oranda tespit edildiği bulunmuştur. Ayrıca çok düşük düzeyde de olsa hem *stx1* hem de *stx2* toksin genlerini birlikte taşıyan izolatın varlığına (%0.7; 1/150) da rastlanmıştır. Çalışmamızda *E.coli*O157:H7 izolatlarının toksin genleri taşıma oranları değerlendirildiğinde ise, izolatların %15.6'sının *stx2*, %6.3'ünün *stx1* toksin genleri taşıdığı bulunurken, *stx1* ve *stx2* toksin genleri birlikte pozitiflik oranının %3.1 olduğu bulunmuştur.

Bingöl ve arkadaşları tarafından 2012 yılında İstanbul’da tüketime sunulan beyaz peynir, tulum peyniri, hellim peyniri gibi çeşitli peynirlerde *E.coli* ve *S.aureus* varlığının araştırıldığı başka bir çalışmada *E.coli* insidansı %36.7 olarak bulunurken hiçbir örnekte *E.coli*O157:H7’ye rastlanmamıştır (Bingöl ve ark. 2012). Çalışmamızda EHEC frekansının %21.3 olduğu düşünüldüğünde tüketime sunulan salataların EHEC açısından ne denli yüksek riskli gıda olduğu görülmektedir. Bingöl ve arkadaşlarının bu çalışması kaynatılmış süt ürünlerinin EHEC açısından güvenli gıdalar arasında yer aldığını göstermektedir (O’Brien ve ark 2008).

*E.coli*O157:H7’nin en önemli komplikasyonu HUS olup, HUS akut böbrek yetmezliğinin en önemli sebeplerinden biridir. Klasik olarak, mikroanjiopatik hemolitik anemi, trombositopeni ve böbrek yetmezliği triadı ile karakterize bir tablo şeklinde görülmektedir. HUS’te böbrek kapillerinde koagülasyon aktive olmakta, trombositler tüketilmekte iken dolaşan koagülasyon faktörleri korunmaktadır (Paton ve Paton 1998).

HUS’ün en sık görülen nedenleri verositotoksin (shiga benzeri toksin) üreten enterohemorajik *Escherichia coli*, *Shigella* dizanteria tip 1, nadir de olsa verositotoksin üreten *Citrobacter freundii* gibi infeksiyöz ajanları olduğu bildirilmiştir. Bu infeksiyöz ajanlar arasında EHEC’in önemli bir yeri vardır. *E.coli*O157:H7 serotipi güçlü bir eksotoksin (verositotoksin: VT) oluşturmaktadır. Bu toksinin *Shigella* dizanteri tip 1’in oluşturduğu Shiga toksine benzerdir. Çalışmamızda shiga toksin üreten *E.coli* O157:H7 varlığının oldukça yüksek olduğu görülmektedir (Palermo ve ark. 2009, Scheiring ve ark.2008, Blackall ve Marques 2004).

Erzurum bölgesinde satışa sunulan etlerde *E.coli* O157:H7’nin araştırıldığı bir çalışmada 120 sığır, 105 tavuk ve 105 hindi eti örneğinde analiz edilmiş, *E.coli*O157:H7 varlığı sığır, tavuk ve hindi et örneklerinde sırasıyla %3.3, %1.6 ve %2.7 olarak tespit edilmiştir (Ünsal 2007).

Yurdumuzda Orta Anadoluda yapılan bir başka çalışmada ise, Kayseri ilinde köy pazarlarından toplanan 100 adet taze peynir numunesinde *E.coli* O157:H7 suşunun varlığı araştırılmış, taze peynir numunelerinin hiçbirinde fekal orjinli bir etken olan *E.coli*O157:H7 suşuna rastlanılmamıştır (Gümüşsoy 2000).

Gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde hızlı ve doğru sonuç veren yöntemlerin kullanılması oldukça önemlidir. Bu çalışmada moleküler bazlı PCR yöntemiyle *hlyA* geni

kullanılarak *E.coli*O157:H7 serotipinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. PCR yönteminin potansiyel bir avantajı yüksek bir hassasiyet sahip olmasıdır (Chen ve ark. 2012).

Shiga toksin üreten O157:H7'nin de dahil olduğu *E.coli* suşları ile gelişen infeksiyon yetişkinlerde zaman zaman HUS ve nörolojik hasar gibi ölümcül sistemik komplikasyonlar ile sonuçlanan kanlı ishal ve hemorajik kolite neden olmaktadır. Burada mikroorganizmanın virülansında önemli rolü olan barsak lümeninde üretilmiş shiga toksinlerin gastrointestinal hastalıklarda rolü önemlidir. Bunun yanında *Stx*'lerin küçük bir kısmının barsak epitel hücrelerine geçtikleri ve daha sonra ise sistemik komplikasyonlar ile sonuçlanan beyin ve böbrek gibi spesifik hedef dokularda damar hasarına neden olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle, dolaşımda ve/veya sindirim kanalında *Stx*'i inhibe eden ve özellikle bağlayan bir nötralizatörlerin geliştirilmesinin hastalığın tedavisinde umut vadeden yaklaşımlar olabileceği bildirilmiştir (Nishikawa 2011).

Stx, globotriaosyl seramid(Gb3; Gala(1-4)-Galb(1-4)-Glcbl-seramid) hücre yüzey reseptörüne bağlanmadan sorumlu olan bir pentamerik B alt birimi ve ökaryotik protein sentezini inhibe eden ve 28S rRNA N-glikosidaz aktivitesine sahip olan katalitik A alt biriminden oluşmaktadır (Karmali ve Petric 1985, Melton-Celsa ve O'Brien 1998, Paton ve Paton 1998). *Stx*'in, Gb3'e ileri derecede güçlü ve seçici bağlanması, ağırlıkla B subunit pentamer ve Gb3'ün trisakkarit parçası arasındaki multivalan etkileşime bağlanmaktadır. Bu durum "kümelenme etkisi" olarak da bilinmektedir (Nishikawa 2011).

E.coli O157:H7 ile kontamine olmuş yeşil yapraklı sebzeler insan hastalıkları olgularının önemli bir kısmından sorumlu tutulmaktadır. EHEC özellikle çocuk ve gençlerde gıda kaynaklı ciddi infeksiyonlara yol açabilen önemli patojenlerdendir ve ciddi hastalıklara yol açmaktadır. Özellikle *E.coli*O157:H7'nin çok fazla sayıda gıda kaynaklı salgına neden olduğu bildirilmektedir. Mikroorganizma HC ve HUS gibi ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır (Griffin ve ark. 1988.). Kontamine sığır eti, süt ve süt ürünleri gibi çeşitli hayvansal ürünlerin tüketiminin hastalığın bulaşmasında önemli olduğu bildirilse de çoğu gıda kaynaklı salgının marul, ıspanak, ve diğer sebzelerin tüketilmesi sonucu meydana geldiği bildirilmiştir (CDC 2006, Morb 1995, Berger ve ark. 2010). CDC raporları 1982 ile 2002 arasındaki 183 *E.coli*O157:H7 salgınının %41'nin biftek ve %21'inin de çeşitli hayvansal ürünlerle gerçekleştiğini göstermektedir (Rangel ve ark. 2005). Gelişen uygulamalara ve hasat sonrası işlemlere bağlı olarak bitkisel ürünlerin

birçok yolla patojenik mikroorganizmalar tarafından kontamine edilebileceği bildirilmiştir. Yeşil yapraklı sebzeler *E. coli*O157:H7 salgınlarının en önemli kaynaklarından biri olarak gösterilmektedir (Beuchat 1995, Berger ve ark. 2010). Wang ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada *E. coli*O157:H7'nin çeşitli sıcaklıklarda depolanan yeşil sebzelerin tahriş olmuş bölgelerinde canlı kalabildiği gösterilmiştir. Çalışmada kışniş otunun hasar gören kısımlarına enjekte edilen patojenlerin 8-15 °C' de 4 günden fazla süre ile canlı kalabildikleri ve 12 °C'de çoğalabildikleri tespit edilmiştir. Allende ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları başka bir çalışmada ise 6 farklı taze bitkiye enjekte edilen *E.coli*O157:H7'nin canlılıkları incelenmiş, bitkiler üzerinde *E.coli* O157:H7'nin +4 °C'de 19 güne kadar canlı kalabildikleri gösterilmiştir. Ayrıca Chua ve arkadaşları diğerleri defektif rpoS genine sahip olan 6 EHEC kökenlerinin taze marul yaprakları üzerinde ≥ 15 °C'nin üzerinde depolandığında asit ortama dirençli hale geldiklerini tespit etmişlerdir (Wang ve ark. 2004, Allende ve ark. 2009).

*E.coli*O157:H7'nin sıklıkla görülen bir özelliği ise pH'sı düşük et suları (Benjamin ve Datta 1995) ve sentetik mide sıvılarını içeren 2'nin altındaki pH değerlerinde asidik ortamlara dayanıklı olmalarıdır. (Arnold ve Kaspar 1995, Bergholz ve Whittam 2007). Bu özellik düşük seviyeli pH değerli ürün kullanan insanlarda hastalık riskine neden olmaktadır (Besser ve ark. 1993, Morgan ve ark. 1993, Weagant ve ark. 1994). *E.coli* O157:H7'nin bu özelliği birçok çalışmada belirtildiği gibi mikroorganizmayı diğer mikroflora üyesi bakterilerden ayırt etmede kullanılmaktadır (Fukushima ve Gomyoda 1999, Grant 2004, Grant 2005).

Sharma ve arkadaşlarının salataların saklama koşulları üzerinde yaptıkları bir çalışmada *E.coli* O157:H7 ile kontamine edilen marul yapraklarının uygun olmayan depolama sıcaklıkları ile birlikte paketleme koşullarının *E.coli*O157:H7'nin potansiyel virülansı üzerindeki etkileri araştırılmış, çalışmada yeşil yapraklı sebzelerin saklama ve uygun olmayan sıcaklıklarda depolanmasının mikroorganizmanın virülansını arttırdığı gösterilmiştir (Sharma ve ark. 2011).

Çalışmamızda *stx1*, *stx2* ve *hlyA* toksin genlerini taşıyan *E.coli* izolatlarının antimikrobiyal direnç profilleri ile mikroorganizma virülansı arasında herhangi bir ilişkinin var olup olmadığı da araştırılmıştır. *HlyA* geni açısından pozitif bulunan *E.coli* O157:H7 suşlarının antibiyotik direnç paternleri incelendiğinde en yüksek ilaç direnci eritromisine (%100) karşı elde edilirken, bunu ampisilin (%68), streptomisin (%15.6), gentamisin

(%6.3) ve tetrasiklinin (%3.1) takip ettiği saptandı. *E.coli* O157:H7 suşlarının tamamının ise sefuroksim, siprofloksasin ve sefaperazona karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Shiga toksinleri açısından pozitif *E.coli* O157:H7 kökenlerinde antimikrobiyal ilaç direnç paternleri incelendiğinde *stx1* geni varlığı tespit edilen 2 örnek ile ve hem *stx1* hem de *stx2* geni pozitif bulunan 1 izolatın antibiyotik direnç paternlerinin birebir uyumlu olarak tamamı eritromisin, ampisilin ve streptomisine dirençli olarak bulunmuştur. *Stx2* geni varlığı tespit edilen 5 izolatta ise antibiyotik duyarlılığının *stx1* pozitif kökenlerle kıyaslandığında daha yüksek olduğu görülmektedir. *Stx2* geni pozitif izolatların tamamının streptomisin duyarlı olduğu tespit edilirken, ampisilin (%80) 5 örnekten 4'ünde dirençli, 1'inde duyarlı (%20) olarak bulunmuştur.

E.coli O157:H7 kökenlerinde ilaç direnç profillerinin toksin genleri varlığı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiş olup bu konuda bir yargıya varabilmek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6.SONUÇ

Bu çalışma Hatay' da çeşitli lokanta, kafeterya ve büfelerde tüketime sunulan salata örnekleri üzerinde yapılmıştır. Çalışmaya 327 salata örneği dahil edilmiş olup, çalışmada Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyoloji Kriterlerine uygun olarak yapılan değerlendirmede 327 salata örneğinden 150 (%45.9) 'sinin limitlerin üzerinde *E.coli* ihtiva ettiği tespit edilmiştir.

Çalışmada *E.coli*; *hlyA*, *stx1* ve *stx2* toksin genlerini belirlemek için multipleks PCR yöntemi, toksin genlerinin antimikrobiyal direncini saptamak için ise; Kirby-Bauer Disk diffüzyon yöntemi kullanılmıştır.

E.coli O157:H7 varlığı *hlyA* geni varlığı araştırılarak tespit edilmiştir. Toplam 150 *E.coli* örneğinden 32'sinin *hly-A* geni pozitif bulunmuştur.

PCR analizlerinde 150 *E.coli*O157: H7 izolatından 32 (%21.3)'sinin *hlyA* geni, 2 (%6.3)'sinin *stx1* geni, 5 (%15.6)'inin *stx2* geni ve 1 (%3.1) izolatın ise hem *stx1* hem de *stx2* geni açısından pozitif olarak bulundu.

Ayrıca çalışmada *E.coli*O157:H7 izolatlarında toksin genlerinin antimikrobiyal direnç profilleri de araştırılmış, izolatların eritromisin, ampisilin, gentamisin, siprofloksin, tetrasiklin, streptomisin, sefaperazon ve sefuroksime karşı CLSI kriterlerine uygun olarak antibiyotik direnci belirlenmiştir. *E.coli*O157:H7 suşlarında antibiyotik direncinin yüksek olmadığı tespit edilmiştir. Bu antibiyotikler arasında sadece eritromise karşı tüm suşların dirençli olduğu , diğer antimikrobiyal ajanlara direncin yüksek olmadığı görülmüştür.

Kirby-Bauer Disk diffüzyon yöntemine göre *hlyA* açısından pozitif 32 *E.coli* O157:H7 suşlarının tamamının eritromisine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Eritromisin dışında en yüksek direncin ampisiline karşı (%68.8; 22/32) geliştiği tespit edilirken, sefuroksim, siprofloksasin ve sefaperazon da antimikrobiyal dirençli herhangi bir köken tespit edilmemiştir. Tüm *E.coli* O157:H7 kökenlerinin sefuroksim, siprofloksasin ve sefaperazona karşı duyarlı oldukları saptanmıştır. Bunlar dışında streptomisin, gentamisine ve tetrasiklinlere karşı antimikrobiyal direncin sırasıyla %15.6 (5/32), %6.3 (2/32) ve %3.1 (1/32) olduğu tespit edilmiştir.

Stx1 geni açısından pozitif olduğu tespit edilen iki (%6.3) *E.coli* O157:H7 kökeninde de eritromisin, ampisilin ve streptomisine karşı direnç saptanırken, bu kökenlerin gentamisin, sefuroksim, tetrasiklin, siprofloksasin ve sefaperazona duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *Stx2* pozitif olduğu saptanan beş (%15.6) *E.coli* O157:H7 kökeninde ise tüm suşlar eritromisine dirençli olarak bulunurken, beş izolattan sadece bir (%80; 1/5) kökenin ampisilin duyarlı, diğer dört (%80; 4/5) kökenin ise ampisiline dirençli olduğu saptanmıştır. Bunun dışındaki tüm antibiyotiklere (gentamisin, sefuroksim, tetrasiklin, siprofloksasin ve sefaperazona) *stx2* geni pozitif olan kökenlerin duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda direnç toksin genlerinin varlığının antibiyotik direnç varlığı ile ilişki olmadığı tespit edilse de, bu konuda herhangi bir kanıya varmak için eldeki veriler oldukça sınırlıdır. Vaka sayısının oldukça yüksek olduğu daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Araştırmadan elde edilen sonuçlar salata örneklerinde insan sağlığı açısından oldukça ciddi tehlike oluşturabilecek patojenik *E.coli* etkenlerin bulunduğu tespit edilmiştir. *E.coli* O157: H7'nin çok düşük titrelerde dahi hemorajik kolit veya hemolitik üremik sendrom gibi insan hayatı açısından son derece önemli infeksiyonlara yol açabilmesi nedeniyle tüketime sunulan salataların gerek hazırlanma ve gerekse de muhafaza edilme işlemlerinin hijyenik prosedürlere uygun olarak yapılmasının infeksiyonun gelişmesinin önünü geçilebilmesi açısından oldukça önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Ülkemizde EHEC bildirimlerinin oldukça sınırlı olması bu etkenin ülkemizde daha ayrıntılı olarak incelenmesine işaret etmektedir. Böylece ülkemiz için önemli epidemiyolojik veriler sağlanabileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Abdul-Raouf UM, Beuchat LR, Ammar MS.** Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Appl Environ Microbiol*, **1993**, 59:1999-2006.
2. **Ahmed NM, Conner DE, Huffman DL.** Heat-resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. *J Food Sci*, **1995**, 60:606-610.
3. **Allende A, McEvoy J, Tao Y, Luo Y.** Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite, sodium chlorite, sodium hypochlorite and citric acid on *Escherichia coli* O157:H7 and natural microflora on fresh-cut cilantro. *Food Control*, **2009**, 20:230-234.
4. **Ammon A, Petersen LR, Karch H:** A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis*, **1999**, 179:1274-1277.
5. **Armstrong G, Hollingsworth J, Morris Jr. G.** Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiological Reviews*, **1996**; 18:29-51.
6. **Arnold KW, Kaspar CW.** Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, **1995**, 61:2037-2039.
7. **Arocha MM, McVey M, Loder SD, Rupnow JH, Bullerman L.** Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. *J Food Protect*, **1992**, 55:379-381.
8. **Ashkenazi S, Cleary TG, Murray BE.** Quantitative analysis and partial characterization of cytotoxin production by *Salmonella* strains. *Infect Immun*, **1988**, 56:3089-3094.
9. **Ashkenazi S, May L, LaRocco M.** The effect of postnatal age on the adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to rabbit intestinal cells. *Pediatr Res*, **1991**, 29:14-19.
10. **Ashkenazi S, Newburg DS, Cleary TG.** The effect of human milk on the adherence of enterohemorrhagic *E. coli* to rabbit intestinal cells. *Adv Exp Med Biol*, **1991**, 310:173-177.
11. **Bach SJ.** Transmission control of *Escherichia coli* O157:H7: a review. *Can J Anim Sci*, **2002**, 2:475-490.
12. **Bagi LK, Buchanan RL.** Preservation of *Listeria monocytogenes* and other pathogenic foodborne bacteria on silica gel. *Lett Appl Microbiol*, **1993**, 17: 37-39.
13. **Bai J, Shi X, Nagaraja TG.** A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157:H7. *J Microbiol Methods*, **2010**, 82:85-89.
14. **Bandyopadhyay S, Lodh C, Rahaman H, Bhattacharya D, Bera AK and et al.** Characterization of shiga toxin producing (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in raw yak (*Capra hircanus*) milk and milk products. *Res Vet Sci*, **2012**, 93:604-610.
15. **Bartlett AV, 3rd, Prado D, Cleary TG, Pickering LK.** Production of shiga toxin and other cytotoxins by serogroups of *Shigella*. *J Infect Dis*, **1986**, 154:996-1002.
16. **Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, **1966**, 36:493-496.
17. **Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC and et al.** A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA*, **1994**, 272(17):1349-1353.

- 18 Benjamin MM, Datta AR.** Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, **1995**, 61:1669-1672.
- 19. Bentancor A, Rumi MV, Carbonari C, Gerhardt E, Larza M and et al.** Profile of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats and genetic relationships with isolates from cattle, meat and humans. *Vet Microbiol*, **2012**, 156:336-342.
- 20. Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D and et al.** Freshfruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol*, **2010**, 12:2385-2397.
- 21. Bergholz TM, Whittam TS.** Variation in acid resistance among enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in a simulated gastric environment. *J Appl Microbiol*, **2007**, 102:352-362.
- 22. Besser RE, Lett SM, Weber JT, Doyle MP, Barrett TJ and et al.** An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA*, **1993**, 269:2217-2220.
- 23. Beuchat LR.** Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J Food Prot*, **1995**, 59:204-216.
- 24 Beutin L, Krause G, Zimmermann S.** Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol*, **2004**, 42:1099-1107.
- 25. Beutin L.** *Escherichia coli* O157 in Farm Animals. In: *Escherichia coli* O157 and other types of verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) isolated from humans, animals and food in Germany. 1st Ed., CABI Publishing, Oxon-UK, **1999**, s. 121-145.
- 26. Beutin L, Aleksic S, Zimmermann S, Gleier K.** Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. *Med Microbiol Immunol*, **1994**, 183:13-21.
- 27. BfR, BVL, RKI;** EHEC: BfR, BVL und RKI konkretisieren Verzehrsempfehlung zu rohen Sprossen und Keimlingen; *BfR Presseinformation*; **2011**.
- 28. Bielaszewska M, Karch H.** Consequences of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection for the vascular endothelium. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **2005**, 94:312-318.
- 29. Bingöl EB, Colak H, Hampikyan H.** Presence of enterotoxin and verotoxin in Turkish cheeses sold in Istanbul. *Turk J Vet Anim Sci*, **2012**, 36(4):424-432.
- 30. Bitzan M, Lidwig K, Klemm M, König H, Buren J, Müller-Wiefel DE.** The role of *Escherichia coli* infections in the classical (enteropathogenic) hemolytic uremic syndrome: Results of a central European, multicenter study. *Epidemiol Infect*, **1993**, 110:183-196.
- 31. Blackall DP, Marques MB.** Hemolytic uremic syndrome revisited: Shiga toxin, factor H and fibrin generation. *Am J Clin Pathol*, **2004**, 121(Suppl):81-87.
- 32. Blanco M.** Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J Clin Microbiol*, **2003**, 41:1351-1356.
- 33. Boerling P, McEwen SA, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL.** Association between virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol*, **1999**, 37:497-503.
- 34. Brackett RE.** Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. *Postharvest Biol Technol*, **1999**, 15:305-311.
- 35. Brian MJ, Frosolono M, Murray BE, Miranda A, Lopez E Land et al.** Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol*, **1992**, 30:1801-1806.

- 36. Brown CA, Harmon BG, Zhao T, Doyle MP.** Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. *Appl Environ Microbiol*, **1997**, 63:27-32.
- 37. Brul S, Coote P.** Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, **1999**, 50:1-17.
- 38. Buchanan RL, Doyle MP.** Expansion foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *Food Technology Magazine*, **1997**, 51[10]:69-76.
- 39. Buchanan RL, Bagi LK.** Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable. *Int J Food Microbiol*, **1994**, 23:317-322.
- 40. Buchanan RL, Bagi LK.** Effect of water activity and humectant identity on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol*, **1997**, 14(5):413-423.
- 41. Buchanan RL, Edelson SG.** Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. *Appl Environ Microbiol*, **1996**, 62:4009-4013.
- 42. Carlson B, Ruby J, Smith G, Sofos J, Bellinger G and et al.** Comparison of antimicrobial efficacy of multiple beef hide decontamination strategies to reduce levels of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella*. *Journal of Food Protection*, **2008**, 71:2223-2227.
- 43. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach—United States, September 2006. *Morb Mortal Wkly Rep (MMWR)*, **2006**, 55:1045-1046.
- 44. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Update: Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers—western United States, 1992-1993. *Morb Mortal Wkly Rep (MMWR)*, **1993**, 42:258-263.
- 45. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O111:NM— South Australia. *Morb Mortal Wkly Rep (MMWR)*, **1995**, 44:550-551, 557-558.
- 46. Ceponis P, Riff J, Sherman P.** Epithelial cell signaling responses to enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2005**, 100:199-203.
- 47. Chalmers RM, Aird H, Bolton FJ.** Waterborne *Escherichia coli* O157. *Journal of Applied Microbiology*, **2000**, 88(Suppl. 1):124S-132S.
- 48. Chandler WL, Jelacic S, Boster DR.** Prothrombotic coagulation abnormalities preceding the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*, **2002**, 346:23-32.
- 49. Chapman PA, Cerda'n Malo AT, Ellin M, Ashton R, Harkin MA.** *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. *Int J Food Microbiol*, **2001**, 64:139-150.
- 50. Chart. H.** VTEC enteropathogenicity. *Journal of Applied Microbiology*, **2000**, 88:12S-23S.
- 51. Chen J, Tang J, Liu J, Cai Z, Bai X.** Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, **2012**, 112:823-830.
- 52. Cheville AM, Arnold KW, Buchrieser C, Cheng, CM, Kaspar CW.** *rpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, **1996**, 62: 1822-1824.
- 53. Chinen I, Tanoro JD, Miliwebsky E, Lound LH, Chillemi G and et al.** Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Protect*, **2001**, 64:1346-1351.

- 54. Clarke SC.** Diarrhoeagenic *Escherichia coli*--an emerging problem?. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2001**, 41:93-98.
- 55. Clavero MRS, Beuchat LR.** Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery. *Appl Environ Microbiol*, **1996**, 62:2735-2740.
- 56. Clavero MRS, Monk JD, Beuchat LR, Doyle MP, Brackett RE.** Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef by gamma irradiation. *Appl Environ Microbiol*, **1994**, 60:2069-2075.
- 57. Daly P, Collier T, Doyle S.** PCR-ELISA detection of *Escherichia coli* in milk. *Lett Appl Microbiol*, **2002**, 34:222-226.
- 58. Diez-Gonzalez F, Russell J.** The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid. *Microbiology*, **1997**, 143:1175-1180.
- 59. Dontorou C, Papadopoulou C, Filioussis G, Economou V, Apostolou I and et al.** Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *Int J Food Microbiol*, **2003**, 82:273-279.
- 60. Doyle MP.** *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microbiol*, **1991**, 12:289-302.
- 61. Doyle MP, Schoeni JL.** Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol*, **1984**, 48:855-856.
- 62. Doyle MP, Zhao T, Meng J, Zhao S.** Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. In *Escherichia coli* O157:H7. ED, ASM Press, Washington, D.C., **1997**, s. 171-191.
- 63. Dundas S, Todd WT, Stewart AI, Murdoch PS, Chaudhuri AK, Hutchinson SJ.** The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clin Infect Dis*, **2001**, 33: 923-931.
- 64. Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Karadal F, Abay S, Al S.** Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic separation and mPCR in Turkish foods of animal origin. *Letters in Applied Microbiology* (Electronic Journal), **2013**, DOI:10.1111/lam.12124.
- 65. Faith NG, Shere JA, Brosch R, Arnold KW, Ansay SE and et al.** Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol*, **1996**, 62:1519-1525.
- 66. Fedio WM, Jinneman KC, Yoshitomi KJ, Zapata R, Wendakoon CN and et al.** Identification of *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNA probe specific for an allele of *uid A* gene. *Mol Cell Probes*, **1993**, 7:151-154.
- 67. Feng PC, Monday SR, Lacher DW, Allison L, Siitonen A and et al.** Genetic diversity among clonal lineages within *Escherichia coli* O157:H7 stepwise evolutionary model. *Emerg Infect Dis*, **2007**, 13(11):1701-1706.
- 68. Fode-Vaughan KA, Maki JS, Benson JA, Collins MLP.** Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, **2003**, 37:239-243.
- 69. Fode-Vaughan KA, Wimpee CF, Remsen CC, Collins MLP.** Detection of bacteria in environmental samples by direct PCR without DNA extraction. *Biotechniques*, **2001**, 31:598-607.
- 70. Frankel G, Phillips A.** Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cellular Microbiology*, **2008**, 10:549-556.
- 71. Fratamico PM, Buchanan RL, Cooke PH.** Virulence of an *Escherichia coli* O157:H7 sorbitol-positive mutant. *Appl Environ Microbiol*, **1993**, 59: 4245-4252.

- 72. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL.** *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: Frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis*, **2002**, 185:74-84.
- 73. Fukushima H, Gomyoda M.** Hydrochloric acid treatment for rapid recovery of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from faeces, food and environmental samples. *Zentralbl Bakteriol*, **1999**, 289:285-299.
- 74. Fukushima H, Hashizume T, Morita Y.** Clinical experiences in Sakai City Hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai City, 1996. *Pediatr Int*, **1999**, 41:213- 217.
- 75. Gannon VP, Rashed M, King RK, Thomas EJ.** Detection and characterization of the eae gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **1993**, 31:1268-1274.
- 76. Garmendia J, Frankel G, Crepin V.** Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity*, **2005**, 73:2573-2585.
- 77. Ge B, Zhao SH, Hall R.** A PCR–ELISA for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbes and Infection*, **2002**, 4:285-290.
- 78. Goldwater PN, Bettelheim KA.** The role of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes other than O157:H7 as causes of disease in Australia. *Commun Dis Intell*, **1995**, 19: 2-4.
- 79. Gordillo R, Córdoba JJ, Andrade MJ, Luque MI, Rodríguez M.** Development of PCR assays for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat products. *Meat Sci*, **2011**, 88:767-773.
- 80. Gracias K, McKillip J.** A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Canadian Journal of Microbiology*, **2004**, 50:883-890.
- 81. Grant MA.** Improved laboratory enrichment for enterohemorrhagic *Escherichia coli* by exposure to extremely acidic conditions. *Appl Environ Microbiol*, **2004**, 70:1226-1230.
- 82. Grant MA.** Comparison of a new enrichment procedure for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* with five standard methods. *J Food Prot*, **2005**, 68:1593-1599.
- 83. Griffin PM.** Infections of Gastrointestinal Tract. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. ED, Raven Press, New York, **1995**, s. 739–761.
- 84. Griffin PM, Ostroff SM, Tauxe RV, Greene KD, Wells JG and et al.** Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. *Ann Intern Med*, **1988**, 109:705–712.
- 85. Griffin PM.** Infections of the Gastrointestinal Tract. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 1st Ed., Raven Press, New York, **1995**, s. 739–761.
- 86. Griffin PM, Tauxe RV.** The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev*, **1991**, 13:60-98.
- 87. Gümüşsoy GF, Gönülalan Z.** Kayseri ilinde köy pazarlarında satılan taze peynirlerde enterohemorajik *Escherichia coli* O157:H7 suşunun araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*, **2005**, 14(1):13-19.
- 88. Gündüz BC.** Yarı Hazır ve Hazır Salataların Hijyenik Durumu Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne, **1999**.
- 89. Hall RH, Xu JG.** Rapid and sensitive detection of O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *United States Patent*, **1998**, Patent number 5,756,293.

- 90. Hao YY, Brackett RE.** Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in modified atmosphere. *J Food Protect*, **1993**, 56:330-332.
- 91. Head SC, Karmali MA, Lingwood CA.** Preparation of VT1 and VT2 hybrid toxins from their purified dissociated subunits: Evidence for B subunit modulation of a subunit function. *J Biol Chem*, **1991**, 266:3617-3621.
- 92. Hengge-Aronis R, Lange R, Henneberg N, Fischer D.** Osmotic regulation of *rpoS*-dependent genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **1993**, 175:259-265.
- 93. Hernández JJ, Cabrera-Díaz E, Cardona-López MA, Ibarra-Velázquez LM, Rangel-Villalobos H and et al.** Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. *Int J Food Microbiol*, **2007**, 113:237-241.
- 94. Huppertz HI, Busch D, Schmidt H.** Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-O157 organisms that produce Shiga-like toxin. *J Pediatr*, **1996**, 128:341-346.
- 95. Hussein H, Sakuma T.** Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *Journal of Dairy Science*, **2005**, 88:450-465.
- 96. Ito Y, Iinuma Y, Baba H.** Evaluation of automated ribotyping system for characterization and identification of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated in Japan. *Jpn J Infect Dis*, **2003**, 56:200-204.
- 97. Lindstedt BA, Heir E, Gjernes E, Vardund T, Kapperud G.** DNA fingerprinting of Shigatoxin producing *Escherichia coli* O157 based on Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA). *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, **2003**, 2:12.
- 98. Jackson TC, Hardin MD, Acuff GR.** Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in a nutrient medium and in ground beef patties as influenced by storage and holding temperatures. *J Food Protect*, **1995**, 59:230-237.
- 99. Jerse A, Yu J, Tall B, Kaper J.** A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **1990**, 87:7839-7843.
- 100. Johnson RP, Cray Jr. WC, Johnson ST.** Serum antibody responses of cattle following experimental infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, **1996**, 64:1879-1883.
- 101. Jores J, Rumer L, Wieler L.** Impact of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island on the evolution of pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, **2004**, 294:103-113.
- 102. Kaper J, Nataro J, Mobley H.** Pathogenic *Escherichia coli*. *National Reviews in Microbiology*, **2004**, 24:395-406.
- 103. Kaper J.** Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*, **1998**, 1:103-108.
- 104. Karch H, Russmann H, Schmidt H.** Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *J Clin Microbiol*, **1995**, 33:1602-1605.
- 105. Karch H, Bielaszewska M.** Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **2001**, 39:2043-2049.
- 106. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Steele BT.** *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome and haemorrhagic colitis. *Lancet*, **1983**, 2:1299-1300.
- 107. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C.** Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*, **1983**, 1:619-620.

- 108. Karmali MA, Petric M, Lim C.** The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, **1985**, 151:775–782.
- 109. Keene WE, McNulty JM, Hoesley FC, Williams LP, Hedberg K and et al.** A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N Engl J Med*, **1994**, 331:579–584.
- 110. Keene WE, Sazie E, Kok J, Rice DH, Hancock DD and et al.** Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *J Am Med Assn*, **1997**, 277:1229-1231.
- 111. Kolling G, Matthews K.** Examination of recovery in vitro and in vivo of nonculturable *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, **2001**, 67:3928-3933.
- 112. Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ.** *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *Appl Environ Microbiol*, **1996**, 34:431-433.
- 113. Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML.** Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*, **1983**, 308:681-685.
- 114. Law D.** Virulence factors of *E. coli* O157:H7 and other Shiga toxin producing *E.coli*. *J Appl Microbiol*, **2000**, 88:729-745.
- 115. LeBlanc J.** Implication of virulence factors of *Escherichia coli* O157:H7 pathogenesis. *Clinical Microbiology Review*, **2003**, 29:277-296.
- 116. Lee SH, Levy DA, Craun GF, Beach MJ, Calderon RL.** Surveillance for Waterborne-disease outbreaks – United States, 1999–2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveill Summ*, **2002**, 51:1-47.
- 117. Leyer GJ, Wang LL, Johnson EA.** Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl Environ Microbiol*, **1995**, 61:3752–3755.
- 118. Li J, Hovde C.** Expression profiles of bovine genes in the rectoanal junction mucosa during colonization with *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, **2007**, 73:2380-2385.
- 119. Lim J, Sheng H, Seo K, Park Y, Hovde C.** Characterization of an *Escherichia coli* O157:H7 plasmid O157 deletion mutant and its survival and persistence in cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, **2007**, 73:2037-2047.
- 120. Lin J, Smith MP, Chapin KC, Baik HS, Bennett GN, Foster JW.** Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, **1996**, 62:3094–3100.
- 121. Line JE, Fain Jr. AR, Moran AB, Martin LM, Lechowich RV and et al.** Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D-value and z-value determinations in ground beef. *J Food Protect*, **1991**, 54:762-766.
- 122. Litalien C, Proulx F, Mariscalco MM.** Circulating inflammatory cytokine levels in hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*, **1999**, 13:840-845.
- 123. Liu Y, Li Y.** Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic separation and absorbance measurement. *J Microbiol Methods*, **2002**, 51:369-377.
- 124. Lopez EL, Contrini MM, Devoto S.** Incomplete hemolytic-uremic syndrome in Argentinean children with bloody diarrhea. *J Pediatr*, **1995**, 127:364-367.
- 125. Mainil J, Daube G.** Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who?. *Journal of Applied Microbiology*, **2005**, 98:1332-1344.

- 126. Manna SK.** Detection of *Escherichia coli* O157 in foods of animal origin by culture and multiplexpolymerase chain reaction. *J Food Sci Technol*, **2006**, 43(1): 77-79.
- 127. Marques LR, Moore MA, Wells JG.** Production of Shiga-like toxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, **1986**, 154:338-341.
- 128. McCarthy TA, Barrett NL, Hadler JL, Salsbury B, Howard RT and et al.** Hemolytic-uremicsyndrome and *Escherichia coli* O121 at a lake in Connecticut, 1999. *Pediatrics*, **2001**, 108:E59.
- 129. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS and et al.** Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, **1999**, 5:607-625.
- 130. Mead PS, Griffin PM.** *Escherichia coli* O157:H7. *The Lancet*, **1998**, 352(9135):1207-1212.
- 131. Melton-Celsa AR, O'Brien AD.** *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains. In: Structure, biology and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. ASM Press, Washington D.C., **1998**, s. 121-128.
- 132. Meng J, Doyle MP.** Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. *Bull Inst Pasteur*, **1998**, 96:151-154.
- 133. Meng J, Doyle MP.** *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains. In: Microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. ASM Press, Washington D.C., **1998**, s. 92-108.
- 134. Meng J, Zhao S, Doyle MP, Mitchell S, Kresovich S.** Polymerase chain reaction for detecting *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol*, **1996**, 32:103-114.
- 135. Mora A, León SL, Blanco M, Blanco JE, López C and et al.** Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). *Int J Food Microbiol*, **2007**, 114:204-210.
- 136. Morgan D, Newman CP, Hutchinson DN, Walker AM, Rowe B, Majid F.** Verotoxinproducing *Escherichia coli* O 157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol Infect*, **1993**, 111:181-187.
- 137. Moxley R.** *Escherichia coli* O157:H7: an update on intestinal colonization and virulence mechanisms. *Animal Health Res Rev*, **2004**, 5:15-33.
- 138. Murano EA, Pierson MD.** Effect of heat shock and incubation atmosphere on injury and recovery of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Protect*, **1993**, 56:568-572.
- 139. Nataro J, Kaper J.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, **1998**, 11:142-201.
- 140. Neill MA, Tarr PI, Taylor DN, Trofa AF.** Foodborne Disease Handbook, Diseases by Bacteria. In: *Escherichia coli*. Vol. 1, Marcel Dekker Inc., New York, 1994, s. 169-213.
- 141. Newburg DS, Ashkenazi S, Cleary TG.** Human milk contains the Shiga toxin and Shiga-like toxin receptor glycolipid Gb3. *J Infect Dis*, **1992**, 166:832-836.
- 142. Newburg DS, Chaturvedi P, Lopez EL.** Susceptibility to hemolytic- uremic syndrome relates to erythrocyte glycosphingolipid patterns. *J Infect Dis*, **1993**, 168:476-479.
- 143. Nishikawa K.** Recent progress of Shiga toxin neutralizer for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **2011**, 59(4):239-247.
- 144. Noguera-Obenza M, Ochoa TJ, Gomez HF.** Human milk secretory antibodies against attaching and effacing *Escherichia coli* antigens. *Emerg Infect Dis*, **2003**, 9:545-551.

- 145. Nou X, Rivera-Betancourt M, Bosilevac J, Wheeler T, Shackelford S and et al.** Effect of chemical dehairing on the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and the levels of aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* on carcasses in a commercial beef processing plant. *Journal of Food Protection*, **2003**, 66:2005-2009.
- 146. O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB.** Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, **1982**, 146:763-769.
- 147. O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Formal SB.** Shiga-like toxin converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science*, **1984**, 226:694-696.
- 148. O'Brien M, Hunt K, McSweeney S, Jordan K.** Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. *Food Microbiol*, **2008**, 26: 910-914.
- 149. Ohara T, Kojio S, Taneike I.** Effects of azithromycin on shiga toxin production by *Escherichia coli* and subsequent host inflammatory response. *Antimicrob Agents Chemother*, **2002**, 46:3478-3483.
- 150. Orth D, Wurznner R.** What makes an enterohemorrhagic *Escherichia coli*?. *Clinical Infectious Diseases*, **2006**, 43:1168-1169.
- 151. Osek J.** Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *J Appl Microbiol*, **2003**, 95:1217-1225.
- 152. Ostroff SM, Tarr PI, Neill MA.** Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J Infect Dis*, **1989**, 160:994-998.
- 153. Pai CH, Ahmed N, Lior H.** Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a two-year prospective study. *J Infect Dis*, **1988**, 157:1054-1057.
- 154. Pai CH, Lior AN, Johnson WM, Sims HV, Woods DE.** Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: A two-year prospective study. *J Infect Dis*, **1988**, 157:1054-1057.
- 155. Palermo MS, Exeni RA, Fernández GC.** Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **2009**, 7(6):697-707.
- 156. Palumbo SA, Call JE, Schultz FJ, Williams AC.** Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *J Food Protect*, **1995**, 58:352-356.
- 157. Paton AW, Paton JC.** *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol*, **1996**, 34:463-465.
- 158. Paton AW, Ratcliff RM, Doyle RM.** Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, **1996**, 34:1622-1627.
- 159. Paton JC, Paton AW.** Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev*, **1998**, 11:450-479.
- 160. Paton AW, Bourne AJ, Manning PA, Paton JS.** Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons. *Infect Immun*, **1995**, 63:2450-2458.
- 161. Paton JC, Paton AW.** Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev*, **1998**, 11:450-479.
- 162. Pennington H.** *Escherichia coli* O157. *Lancet*, **2010**, 376:1428-1435.
- 163 Phillips C.** The epidemiology, detection and control of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1999**, 79:1367-1381.

- 164. Pruijboom-Brees IM, Morgan TW, Ackermann MR, Nystrom ED, Samuel JE and et al.** Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **2000**, 97:10325-10329.
- 165. Rajkowski KT, Marmer BS.** Growth of *Escherichia coli* O157:H7 at fluctuating incubation temperatures. *J Food Protect*, **1995**, 58:1307–1313.
- 166. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL.** Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg Infect Dis*, **2005**, 11:603–609.
- 167. Reida P, Wolff M, Pohls HW, Kuhlmann W, Lehmacher A and et al.** An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. *Zentralbl Bakteriol*, **1994**, 281: 534-543.
- 168. Reitsma CJ, Henning DR.** Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. *J Food Protect*, **1996**, 59: 460-464.
- 169. Reitsma CJ, Henning DR.** Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. *J Food Protect*, **1996**, 59:460–464.
- 170. Rey J, Sa´nchez S, Blanco JE, Hermoso de Mendoza J, Hermoso de Mendoza M and et al.** Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *Int J Food Microbiol*, **2006**, 107:212-217.
- 171. Rice DH, Hancock DD, Besser TE.** Verotoxigenic *E. coli* O157:H7 colonization of wild deer and range cattle. *Vet Rec*, **1995**, 137: 524.
- 172. Riley L.** The epidemiologic, clinical, and microbiologic features of hemorrhagic colitis. *Annual Review of Microbiology*, **1987**, 41:383-407.
- 173. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG and et al.** Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*, **1983**, 308: 681-685.
- 174. Robins-Browne R.** The relentless evolution of pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases*, **2005**, 41:793-794.
- 175. Robinson AL, McKillip JL.** Biology of *Escherichia coli* O157:H7 in human health and food safety with emphasis on sublethal injury and detection. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, **2010**, 2:1096–1105.
- 176. Rowbury RJ.** An assessment of environmental factors influencing acid tolerance and sensitivity in *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and other enterobacteria. *Lett Appl Microbiol*, **1995**, 20: 333–337.
- 177. Rowbury RJ, Lazim Z, Goodson M.** Regulatory aspects of alkali tolerance induction in *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol*, **1996**, 22:429–432.
- 178. Rump LV, Beutin L, Fischer M, Feng PC.** Characterization of a *gne* IS629 O rough:H7 *Escherichia coli* strain from a hemorrhagic colitis patient. *Appl Environ Microbiol*, **2010**, 76: 5290-5291.
- 179. Samadpour, M., Kubler, M., Buck, F.C., Depavia, G.A., Mazengia, E and et. al.** Prevalence of shiga toxin producing *Escherichia coli* in ground beef and cattle faeces from King Country, Washington. *J Food Protect*, **2002**, 65,1322-1325.
- 180. Sandel M, Wu Y-F, McKillip J.** Detection and recovery of sublethally-injured enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* **2003**; 94:90-94.
- 181. Sarimehmetoglu, B., Kuplulu, O. and Kaymaz, S.** Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburgers and inegl meatballs. *Vet J Ankara Univ*, **1998**, 45, 221-227
- 182. Scheiring J, Andreoli SP, Zimmerhackl LB.** Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HS). *Pediatr Nephrol* **2008**;23(10):1749-60.

- 183. Schmidt H, Geitz C, Tarr PI, et al:** Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J Infect Dis*, **1999**, 179:115-123
- 184. Schmidt H, Montag M, Bockemuhl J, et al:** Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect Immun*, **1993**, 61:534-543
- 185. Schmidt H., Beutin L., Karch H.;** Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933; *Infect Immun*; **1995**, (63): 1055-1061
- 186. Sharma M, Lakshman S, Ferguson S, Ingram DT, Luo Y, Patel J.** Effect of modified atmosphere packaging on the persistence and expression of virulence factors of *Escherichia coli* O157:H7 on shredded iceberg lettuce. *J Food Prot.* **2011** May;74(5):718-26.
- 187. Siegler, R.L., Griffin, P.M., Barrett, T.J., and Strockbine, N.A.** Recurrent hemolytic uremic syndrome secondary to *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Pediatrics*, **1993**, 91: 666–668.
- 188. Signorini, M. and Tarabla, H.** Quantitative risk assessment for verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef hamburgers in Argentina. *Int J Food Microbiol*, **2009**, 132,153-161.
- 189. Sivapalasingam, S., et.al.** Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J. Food Prot.*, **2004**, 67: 2342-2353.
- 190. Splittstoesser, D.F., McLellan, M.R., and Churey, J.J.** Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J. Food Protect.*, **1995**, 59: 226–229.
- 191. Steinmuller N., Demma L, Bender J, Eidson M, Angulo F.** Outbreaks of enteric disease associated with animal contact: not just a foodborne problem anymore. *Clinical Infectious Diseases* **2006**;43:1596
- 192. Su, H., Ma, Q., Shang, K., Liu, T., Yin, H. and Ai, S.** Gold nanoparticles as colorimetric sensor: A case study on *E. coli* O157:H7 as a model for Gram-negative bacteria. *Sensor Actuat B-Chem* , **2012**, 161, 298-303.
- 193. Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., and Braxton, D.S.** Predictive modeling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: The effects of temperature, pH and sodium nitrite. *Intl. J. Food Microbiol.*, **1995**, 25: 29–49.
- 194. Swerdlow, D.L., Woodruff, B.A., Brady, R.C., Griffin, P.M., Tippet, S and et al.** A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann. Intern. Med.*, **1992**, 117: 812–819.
- 195. Tanaka H, Ohseto M, Yamashita Y, et al:** [Bacteriological investigation on an outbreak of acute enteritis associated with verotoxin-producing *Escherichia coli* O111:H-. *Kansenshogaku Zasshi*, **1989**, 63:1187-1194
- 196. Tarr P.I., Gordon C.A., Chandler W.L.;** Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome; *Lancet* , **2005**; (365): 1073-1086.
- 197. Tarr P.I., Neill M.A., Clausen C.R., Watkins S.L., Christie D.L and et. al.;** *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology; *J Infect Dis*; **1990**, (162): 553-556
- 198. Tarr, P.I.** *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.*, **1995**, 20: 1–10.
- 199. Teinmuller N., Demma L, Bender J, Eidson M, Angulo F.** Outbreaks of enteric disease associated with animal contact: not just a foodborne problem anymore. *Clinical Infectious Diseases* **2006**;43:1596-1602.

- 200. Teo, Y.-L., Raynor, T.J., Ellajosyula, K.R., and Knabel, S.J.** Synergistic effect of temperature and high pH on the destruction of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Protect.*, 1996, 59: 1023–1030.
- 201. Tesh VL, Burris JA, Owens JW, et al:** Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect Immun*, **1993**, 61:3392-3402.
- 202. Thayer, D.W. and Boyd, G.** Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1993**, 59: 1030–1034.
- 203. Tilden Jr., J., Young, W., McNamara, A.-M., Custer, C., Boesel, B and et. al. J.G. Jr, J.G.** A new route of transmission for *Escherichiacoli*: Infection from dry fermented salami. *Am. J. Public Health*, **1996**, 86: 1142–1145.
- 204. Tyler, S. D., W. M. Johnson, H. Lior, G. Wang, and K. R. Rozee.** Identification of verotoxin type 2 variant B-subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **1991**, 29:1339–1343.
- 205. Tzipori, S., Wachsmuth, I.K, Smithers, J., and Jackson, C.** Studies in gnotobiotic piglets on non–O157:H7*Escherichia coli* serotypes isolated from patients with hemorrhagic colitis. *Gastroenterology*, **1988**, 94: 590–597.
- 206. USDA/APHIS.** *Escherichia coli* O157:H7 shedding by feed lot cattle. Centers for Epidemiology & Animal Health, Veterinary Services, U.S. Dept. of Agriculture/ Animal and Plant Health Service, Fort Collins, Colo, **1995**, pp. 1–2.
- 207. Ünsal C.** Erzurum bölgesinde satışa sunulan etlerde E.coli O157: H7'nin varlığının araştırılması .Tez Atatürk üniversitesi, **2007**.
- 207. Vaz TM, Irino K, Kato MA, et al:** Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *J Clin Microbiol*, **2004**, 42:903-905.
- 208. Wadolkowski EA, Sung LM, Burris JA, et al:** Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect Immun*, **1990**, 58:3959-3965.
- 209. Wall PG, McDonnell RJ, Adak GK, et al:** General outbreaks of vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in England and Wales from 1992 to 1994. *Commun Dis Rep CDR*, **1996**, Rev 6:R26-R33.
- 210. Walsh, L., Dooge, D. and Hill, C.** Screening of *Escherichia coli* O157:H7 in Irish ground beef using two commercial detection systems. *Irish Vet J*, **1997**, 50, 111-115.
- 211. Walterspiel JN, Ashkenazi S, Morrow AL, Cleary TG:** Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I. *Infection*, **1992**, 20:25-29.
- 212. Wang H, Feng H, Luo Y.** Microbial reduction and storage quality of fresh-cut cilantro washed with acidic electrolyzed water and aqueous ozone. *Food Res Int*, **2004**, 37:949–56.
- 213. Wang, G., Zhao, T. and Doyle, M.P.** Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, **1996**, 62, 2567–2570.
- 214. Wang, L., Li, Y. and Mustaphai, A.** Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. *J Food Prot*, **2007**, 70, 1366–1372.

- 215. Watanabe H., Wada A., Inagaki Y., Itoh K., Tamura K.;** Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan, **1996**; *Lancet*; (348): 831-832; 1996
- 216. Watarai S, Yokota K, Tana, et al:** Relationship between susceptibility to hemolytic-uremic syndrome and levels of globotriaosylceramide in human sera. *J Clin Microbiol*, **2001**, 39:798-800.
- 217. Weagant SD, Bryant JL, Bark DH.** Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *J Food Prot* , **1994**, 57:629–31.
- 218. Weagant, S.D.** Detection of *E. coli* O157:H7 in raw ground beef by Pathatrix™ immunomagnetic-separation, real-time PCR and cultural methods. *Int J Food Microbiol* , **2011**, 148, 87-92.
- 219. Welinder-Olsson C, Kaijser, B.** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **2005**; 37:405-416.
- 220. Westerholt S, Pieper AK, Griebel M, et al:** Characterization of the cytokine immune response in children who have experienced an episode of typical hemolytic-uremic syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol*, **2003**, 10: 1090-1095
- 221. Whittam T.S., Wolfe M.L., Wachsmuth I.K., Orskov F., Orskov I and et. al.;** Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea; *Infect Immun*; **1993** (61): 1619-1629.
- 222. WHO:** Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. Report of a WHO consultation, Geneva, Switzerland, **1997**, 28-April-1- May.
- 223. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G and et. al.** *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology* 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, **2006**.
- 224. World Health Organization** Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting, 1998.
- 225. Yoon J, Hovde C.** All blood, no stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Journal of Veterinary Science* **2008**;9:219-231.
- 226. Yu J., Kaper J.B.;** Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7; *Mol Microbiol*; **1992**, (6): 411-417.
- 227. Zhao, T. and Doyle, M.P.** Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *J. Food Protect.*, 1994, 57: 780–783.
- 228. Zhao, T., Doyle, M.P., and Besser, R.E.** Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider without preservatives. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 2526–2530.
- 229. Zhao, T., Doyle, M.P., Shere, J., and Garber, L.** Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1995**, 61: 1290–1293.
- 230. CLSI:** Clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 17th informational supplement. Approved Standard, MS100-S17, Wayne, PA, USA, **2007**.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Adana’da doğdu. 2006 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2010 yılında mezun oldu. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı.