TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOYUN ORİJİNLİ *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Yılmaz Emre GENÇAY
Veteriner Hekim

MİKROBİYOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI
DOKTORA

DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat YILDIRIM

2014 – KIRIKKALE

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOYUN ORİJİNLİ *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Yılmaz Emre GENÇAY
Veteriner Hekim

MİKROBİYOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI
DOKTORA

DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat YILDIRIM

2014 – KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08 / 01 / 2014

Prof. Dr. K. Serdar DİKER
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Murat YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Kırıkkale Üniversitesi, VeterinerFakültesi
Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay III
İçindekiler IV
Önsöz VII
Simgeler ve Kısaltmalar VIII
Şekiller X
Çizelgeler XI

ÖZET XII
SUMMARY XIV

1. GİRİŞ 1

1.1. *E. coli* O157:H7'nin Genel Özellikleri 3
1.2. *E. coli* Taksonomisinde *E. coli* O157:H7 5
1.3. *E. coli* O157:H7'nin Tarihçesi ve Evrimsel Süreci 6
1.4. *E. coli* O157:H7'nin Rezervuarları ve Mekanik Vektörleri 8
1.5. *E. coli* O157:H7'nin Bulaşma Yolları ve Salgınlarda Belirlenen Gıdalar 10
1.6. İnsanlardaki *E. coli* O157:H7 İnfeksiyonlarında Hastalık Tablosu 12
1.7. *E. coli* O157:H7'nin Virülens Faktörleri 14
1.7.1. Asit Direnci 14
1.7.2. Adezyon 17
1.7.2.1. İlk Adezyon 17
1.7.2.1.1. Uzun polar fimbria (Lpf) 17
1.7.2.1.2. Hemorajik coli pilusu (Hcp) 19
1.7.2.1.3. F9 fimbria 20
1.7.2.1.4. *E. coli* YcbQ laminine bağlanan fimbria (Elf) 20
1.7.2.1.5. Enterohemorajik *E. coli* ototransportörleri (EhaA, EhaB ve EhaJ) 21
1.7.2.1.6. *E. coli* serin proteazı ve ip-benzeri fiberler (EspP) 21

1.7.2.1.7. Flagella H7 ($FliC_{H7}$) 22
1.7.2.1.8. Paa adezin 23
1.7.2.1.9. IrgA homoloğu adezin (Iha) 23
1.7.2.1.10. Dış membran porini A (OmpA) 24
1.7.2.1.11. EHEC aderenz faktröü (Efa1) ve ToxB 24
1.7.2.1.12. Sorbitol pozitif fimbria (Spf) 25
1.7.2.2. Sıkı Adezyon ve LEE Patojenite Adası 25
1.7.2.2.1. Tip-III sekresyon sistemi (T3SS) 27
1.7.2.2.2. Transloke intimin reseptörü (Tir) 29
1.7.2.2.3. İntimin, *E. coli* bağlanma ve bozma 29
1.7.2.2.4. Efektör proteinler 31
1.7.3. Shiga Toksin (Stx) 33
1.7.4. Plazmid O157 (pO157) 39
1.7.4.1. Enterohemolizin (HlyA) 40
1.7.4.2. Katalaz-peroksidaz (KatP) 42
1.7.4.3. EHEC C1 esteraz inhibitörü (StcE) 42

2. GEREÇ VE YÖNTEM 44

2.1. Gereç 44
2.1.1. *E. coli* O157 İzolasyonu ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Diğer Kimyasallar 46
2.1.2. *E. coli* O157 İzolatlarının *E. coli* O157:H7 Olarak İdentifiye Edilmesi ve Virülens Genlerinin Belirlenmesi İçin Yapılan PCR Analizlerinde Kullanılan Kimyasallar 49
2.2. Yöntem 53
2.2.1. *E. coli* O157 İzolasyonu 53
2.2.2. Ön Zenginleştirme 53
2.2.3. İmmuno Manyetik Seperasyon (IMS) 54
2.2.4. Katı Besiyerine Ekim 55
2.2.5. Lateks Aglütinasyonu ile Kolonilerin *E. coli* O157 Olarak İdentifikasyonu 55
2.2.6. İzolatların Muhafazası 56

2.2.7. PCR Tekniği 57
2.2.8. İstatistiksel Analizler 57

3. BULGULAR 59

3.1. IMS Bazlı Kültür Tekniği ile *E. coli* O157 İzolasyonu 59
3.2. İzolatların *E. coli* O157 Olarak Doğrulanması ve *E. coli* O157:H7 Olarak İdentifikasyon Sonuçları 60
3.2.1. Koyun Örneklerinde *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7'nin Mevsimsel Dağılımı 60
3.2.2. Koyunlarda Cinsiyetlere Göre *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7 Dağılımı 61
3.2.3. Koyunların Yaş Aralıklarına Göre *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7 Dağılımı 62
3.3. *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7 İzolatlarının Virülens Gen Profilleri 63

4. TARTIŞMA VE SONUÇ 66

KAYNAKLAR 75

ÖZGEÇMİŞ 104

ÖNSÖZ

Escherichia coli O157:H7, dünyada oldukça önemli salgınlara sebep olan, özellikle çocuklardan başlayarak birçok insanın yaşam kalitesini olumsuz etkileyen ve ölümlere sebep olan zoonotik karakterde bir patojendir. Tanımlandığı tarihten günümüze çeşitli gıdalar ve su insanlara bulaşmasında önemli rol oynamış olmasına karşın, etkeni özellikle sığırlar ve diğer ruminantlar hastalık belirtisi göstermeksizin taşımakta, çevreye bulaştırmakta ve mezbaha aşamasında etlerin kontaminasyonu şekillenmektedir. Bu yolla kontamine ve yetersiz pişirilmiş, özellikle sığır ve diğer ruminantlardan sağlanan etler birçok salgının etiyolojisinde yer almaktadır. Ancak Türkiye'de, sıklıkla ve sevilerek tüketilen koyun etlerinde etkenin varlığı ve koyunların etkeni ne oranda taşıdığına ilişkin yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, bir yıl süre ile Kırıkkale ilinde mezbahaya getirilen koyunlardan alınan rektoanal mukozal svap ve karkas sünger sürüntüsü örneklerinde *E. coli* O157'nin hassasiyeti yüksek immüno manyetik seperasyon bazlı kültür tekniği ile belirlenmesi, PCR ile izolatların *E. coli* O157:H7 olarak identifikasyonu ve önemli virülens özelliklerine ilişkin genlerinin tespit edilerek moleküler karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada ve doktora eğitimim süresince desteklerini hep hissettiğim değerli hocalarım; Prof. Dr. Murat YILDIRIM'a, Prof. Dr. Aylin KASIMOĞLU DOĞRU'ya, Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR'a ve Doç. Dr. Nilgün ÜNAL'a teşekkürlerimi sunar, Doç. Dr. Naim Deniz AYAZ'a ve mesleki hayatıma yön veren Prof. Dr. İrfan EROL ve Prof. Dr. Sadi AKGÜN'e teşekkürlerimi bir borç bilirim. Aldığım kararlarda ve attığım her adımda daima yanımda olan, fedakarlıkları, sabır ve yardımlarından ötürü Dr. Begüm YURDAKÖK ve aileme teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AE	: attaching and effacing - bağlanma ve bozma
AEEC	: attaching and effacing (bağlanan ve bozan) *E. coli*
Bfp	: bundle-forming pili
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention - ABD Hastalık Korunma ve Kontrol Merkezleri
DAEC	: diffüz adeziv *E. coli*
EAEC	: enteroaggregatif *E. coli*
ECM	: ekstrasellüler matriks
EFTA	: European Free Trade Association - Avrupa Serbest Ticaret Birliği
EHEC	: enterohemorajik *E. coli*
EIEC	: enteroinvaziv *E. coli*
EPEC	: enteropatojenik *E. coli*
ETEC	: enterotoksijenik *E. coli*
ExPEC	: ekstraintestinal patojenik *E. coli*
Gb3	: globotriosil seramid
H-NS	: histon-benzeri nükleotid-yapılandıran protein
HC	: hemorajik kolitis
HUS	: hemolitik üremik sendrom
IMS	: immuno manyetik seperasyon
KSS	: karkas sünger sürüntüsü
LEE	: locus of enterocyte effacement - enterosit bozma lokusu
MAEC	: menenjit-ilişkili *E. coli*
MUG	: 4-metil-umbeliferil glukronid
NM	: non-motil, hareketsiz
NSF	: sorbitolü fermente etmeyen (sorbitol negatif)
PEPEC	: porcine (domuz kaynaklı) enteropatojenik *E. coli*
RAMS	: rektoanal mukozal svap
RFLP	: restriksiyon fragman uzunlukları polimorfizimi
RpoS	: alternatif RNA polimeraz sigma faktörü
SDS-PAGE	: Na-dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi

SEM : scanning elektron mikroskobu

SF : sorbitolü fermente eden (sorbitol pozitif)

Slt : Shiga-like toxin - Shiga-benzeri toksin

STEC/VTEC : Shigatoksijenik *E. coli* / Verotoksijenik *E. coli*

Stx : Shiga toksin

T3SS : tip-III sekresyon sistemi

TEM : transmisyon elektron mikroskobu

UPEC : üropatojenik *E. coli*

Vtx : verositotoksin

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1.1	Değişik *E. coli* patotipleri arasındaki karmaşık ilişkiyi gösteren Venn çizimi.	4
Şekil 1.2	*E. coli* O157:H7 insan infeksiyonlarında belirlenen bulaşma kaynaklarının tarihte ortaya çıkışı.	12
Şekil 1.3	Dünyadaki, 1982 - 2006 tarihleri arası, devletler tarafından yayınlanan ve bilimsel raporlarda bildirilen *E. coli* O157:H7 insan vakalarının bulaşma kaynaklarına göre dağılımı (26 179 vaka).	13
Şekil 1.4	Pedestal (oklar) oluşumlarının SEM (A) ve TEM (B) görüntüleri.	26
Şekil 1.5	LEE patojenite adası.	27
Şekil 1.6	EPEC/EHEC tip-III sekresyon aparatının şematik görüntüsü.	28
Şekil 1.7	Shiga toksinin şematik yapısı.	33
Şekil 1.8	Shiga toksinleri bulunduğu hücre fraksiyonları.	36
Şekil 2.1	KSS örneklerinin toplanmasında kullanılan ticari süngerli çubuklar.	45
Şekil 2.2	Dynabeads anti-*E. coli* O157 kiti.	47
Şekil 2.3	*E. coli* O157 Latex Test kiti.	48
Şekil 2.4	Dynal manyetik partikül konsantratör portüpü.	54
Şekil 2.5	CT-SMAC agarda sorbitol negatif *E. coli* O157:H7 kolonilerinin görünümü.	56
Şekil 3.1	Koyunlardan IMS bazlı kültür tekniği ile *E. coli* O157 izolasyon oranları.	59
Şekil 3.2	Seçilen pozitif kontrollerden PCR ile elde edilen gen fragmanlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.	64

ÇİZELGELER

		Sayfa
Çizelge 1.1	*E. coli* O157:H7 bulaşma kaynaklarının ilk kez belirlendiği olgular	11
Çizelge 1.2	*E. coli* O157:H7'nin virülens özellikleri.	15
Çizelge 1.3	*E. coli* O157:H7 Sakai suşu için tanımlanan efektör proteinler ve başlıca görevleri.	32
Çizelge 1.4	Çeşitli STEC kaynaklı Stx varyantları.	39
Çizelge 2.1	Sıcak ve soğuk aylara göre örneklenen hayvan sayıları.	44
Çizelge 2.2	Örnekleme yapılan koyunların yaş ve cinsiyet dağılımı.	45
Çizelge 2.3	*E. coli* O157 izolatlarının *E. coli* O157:H7 olarak identifiye edilmesi, virülens genleri ve varyantlarının belirlenmesi için PCR analizlerinde kullanılan primer çiftleri.	50
Çizelge 2.4	PCR analizlerinde kullanılan master karışımları ve PCR koşulları.	58
Çizelge 2.5	PCR analizlerinde pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılan referans suşlar, virülens özellikleri ve kaynakları.	58
Çizelge 3.1	İzolatların O157 ve H7 karakterleri ile tespit edildikleri koyunların cinsiyet ve yaş aralığı dağılımları.	63
Çizelge 3.2	*E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7 izolatlarının moleküler karakterizasyonu.	65

KOYUN ORİJİNLİ *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Bu çalışmada, Haziran 2012 – Mayıs 2013 ayları arasında Kırıkkale ilindeki mezbahada kesimleri yapılan toplam 100 Akkaraman ırkı koyundan kesim işlemini takiben alınan 100'er adet rektoanal mukozal svap (RAMS) ve karkas sünger sürüntü (KSS) örneği olmak üzere toplam 200 örnek toplanarak, örneklerden IMS bazlı kültür tekniği ile *Escherichia coli* O157 varlığı araştırıldı. İzolatların PCR tekniği ile *E. coli* O157 olarak doğrulanmasını veya *E. coli* O157:H7 olarak identifikasyonunu takiben, çeşitli virülens genleri (*stx*$_1$, *stx*$_2$, *eaeA*, *hly*, *lpfA1-3*, *espA*) ve varyantlarının (*eae-α1, eae-α2, eae-β, eae-β1, eae-β2, eae-γ1, eae-γ2/θ, stx1*$_c$, *stx1*$_d$, *stx2*$_c$, *stx2*$_d$, *stx2*$_e$, *stx2*$_f$, *stx2*$_g$) bulunuşu incelenerek moleküler karakterizasyonları yapıldı. Koyunlarda *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7 prevalansına mevsimin, cinsiyetin ve yaş aralığının etkisi değerlendirildi.

Analiz edilen toplam 100 koyunun 18'inde (% 18) *E. coli* O157 tespit edildi. Etken, koyunların 10'unda (% 10) KSS örneklerinden, 4'ünden (% 4) RAMS örneklerinden ve 4'ünde (% 4) hem KSS hem de RAMS örneklerinde belirlendi. Ondört KSS ve 8 RAMS örneğinden toplam 75 sorbitol negatif (NSF) ve 4 sorbitol pozitif (SF) *E. coli* O157 kolonisi izole edildi. Yapılan PCR analizleri ile 79 izolatın 11'i (7 NSF ve 4 SF) (% 13.9) *E. coli* O157:H7$^-$, 68'i (% 86.1) *E. coli* O157:H7$^+$ olarak identifiye edildi ve koyunların 6'sında (% 6) *E. coli* O157 (4 örnekten NSF ve 2 örnekten SF), 12'sinde (% 12) ise NSF *E. coli* O157:H7 belirlendi. Elde edilen 79 izolatın hiç birinin *stx*$_1$ barındırmadığı ancak 68 *E. coli* O157:H7'den 45'inin (% 57) *stx2*$_c$ yönünden pozitif olduğu tespit edildi. Bunun yanı sıra, bütün izolatların *lpfA1-3* genini barındırdığı (% 100), yalnız bir izolatın *hly*$^-$ olduğu, SF *E. coli* O157 izolatlarının *espA* genine sahip olmamasına karşın diğer tüm izolatların *espA*$^+$ olduğu ve tüm *eaeA*$^+$ izolatların (77/79, % 97.4) *eaeγ*$_1$ varyantı olduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre toplam 100 koyundan 8'inin (% 8) KSS örneklerinde Shigatoksijenik *E. coli* O157:H7 belirlenmiştir.

Yapılan analizlerde *E. coli* O157:H7 prevalansına mevsimin, cinsiyetin ve yaşın istatistiki olarak önemli bir etkisi bulunmamasına karşın; soğuk aylarda sıcak aylara oranla, erkek hayvanlarda dişi hayvanlara oranla, 6-12 ay arası toklularda 12 aydan erişkin hayvanlara oranla daha sık etkene rastlandığı belirlendi.

Elde edilen bulgular neticesinde, koyunların diğer pek çok ülkede bildirilenden daha yüksek oranda Shigatoksijenik *E. coli* O157:H7 taşıdıkları ve mezbahaların teknik ve hijyenik yetersizliği sonucu karkasların ciddi oranda kontamine olduğu belirlendi. Bu nedenle, halk sağlığının korunması amacıyla, resmi otoriteler tarafında mezbahaların teknik ve hijyenik şartlarının iyileştirilmesi, koyun eti ve koyun eti içeren ürünlerin tüketimlerinden önce yeterli ısı işlemi gördüğünden emin olunması ve gerek koyunlarla temastan sonra, gerekse koyunların dolaştığı veya koyundan elde edilen gübrelerin kullanıldığı alanlarda hijyen uygulamalarının titizlikle gerçekleştirilmesi koyun kaynaklı *E. coli* O157:H7 infeksiyonlarından korunma ve kontrolde alınması gereken önemli tedbirlerdendir.

Anahtar Sözcükler: Koyun, Karkas, *Escherichia coli* O157:H7, IMS, Virülens.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 ISOLATES FROM SHEEP ORIGIN

SUMMARY

In the study, the presence of *Escherichia coli* O157 in 200 samples, 100 of each rectoanal mucosal swap (RAMS) and carcass sponge samples (KSS), of 100 Akkaraman race sheep brought to slaughterhouse in Kirikkale was analyzed by IMS based cultivation technique between June 2012 and May 2013. Isolated strains were either verified as *E. coli* O157 or identified as *E. coli* O157:H7 and then, molecular characteristics were determined by analysis of various virulence factors (stx_1, stx_2, *eaeA*, *hly*, *lpfA1-3*, *espA*) and variants (*eae-α1, eae-α2, eae-β, eae-β1, eae-β2, eae-γ1, eae-γ2/θ,* $stx1_c$, $stx1_d$, $stx2_c$, $stx2_d$, $stx2_e$, $stx2_f$, $stx2_g$) by PCR. The effects of season, sex and range of age on *E. coli* O157 and *E. coli* O157:H7 prevalence in sheep were determined.

E. coli O157 was found in 18 (18 %) of 100 sheep included in the study. In 10 (10 %) of the 100 sheep agent was isolated from KSS, while in 4 (4 %) from RAMS, and in 4 (4 %) both from KSS and RAMS. A total of 75 sorbitol-negative (NSF) and 4 sorbitol-positive (SF) *E. coli* O157 colonies were isolated from 14 KSS and 8 RAMS. Six (6 %) and 12 (12 %) of the sheep were determined to harbor *E. coli* O157 (NSF from 4 and SF from 2 samples) and *E. coli* O157:H7, respectively as; 11 (7 NSF and 4 SF) (13.9 %) of 79 isolates were verified as *E. coli* O157:$H7^-$ while the remaining 68 (86.1 %) isolates were identified as *E. coli* O157:$H7^+$ by PCR. None of the isolates were harboring stx_1 while 45 (57 %) of 68 *E. coli* O157:H7 were $stx2_c$ positive. Additionally, all isolates were and *lpfA1-3* positive, only one isolate was hly^-. All *eaeA* positive isolates (77/79, % 97.4) showed the intimin variant $eae\gamma_1$ and besides SF *E. coli* O157 isolates all were harboring *espA*. As a result, 8 (8 %) of the sheep KSS were found to harbor Shigatoxigenic *E. coli* O157:H7.

No statistical significance effect of season, sex or age range was observed on prevalence of *E. coli* O157:H7 in sheep. However, prevalence was higher; in colder

than warmer season, in male than female and in 6 to 12 months yearling lambs than mature sheep of above 12 months.

In conclusion, a high prevalence of Shigatoxigenic *E. coli* O157:H7 carriage of sheep, that subsequently results in a high percentage of carcass contamination with the pathogen due to the technical and hygienic insufficiency at slaughterhouses than in many other countries was determined. Thus, for protection of public health, national authorities must ensure the technical and hygienic improvement of slaughterhouses, adequate cooking of meats of sheep origin or derived products before consumption must be ensured and thorough hygienic applications must be applied following contact with sheep or sheep grazed or sheep manure applied fields.

Key Words: Sheep, Carcass, *Escherichia coli* O157:H7, IMS, Virulence.

1. GİRİŞ

Escherichia coli O157:H7, hemorajik kolitis (HC) ve hemolitik üremik sendrom (HUS) etkeni olarak dünyanın birçok bölgesinde, özellikle küçük çocuklar olmak üzere her yaş grubundaki bireyleri etkileyebilen önemli bir halk sağlığı sorunudur (Erol, 2007). Shiga toksin üreterek vero hücrelerine etki gösteren, Shigatoksijenik, diğer bir deyişle verotoksijenik *E. coli* (STEC/VTEC) olan O157:H7 serotipinin, bir insan patojeni olduğu, ilk kez 1982 yılında Amerika Birleşik Devletler (ABD)'inde belirlenen iki salgın ile ortaya konmuştur (CDC, 1982). Bu *E. coli* O157:H7 serotipi ile ilişkilendirilen, HC ve fekal sitotoksin varlığıyla ilişkilendirilen HUS, yeni bir patotip olan enterohemorajik *E. coli* (EHEC)'nin tanımlanmasına neden olmuştur. *E. coli* O157:H7, dahil olduğu EHEC grubu ile *E. coli* patotipleri arasında en önemli grupta yerini almaktadır.

İlk tanımlanışından bu güne, dünyada pek çok sporadik salgından sorumlu tutulan *E. coli* O157:H7, olguların % 10'unda HUS ile komplike olmakta ve % 2-10 oranında mortalite ile seyretmektedir (Law, 2000; Gyles 2007). Mead ve ark. (1999), *E. coli* O157:H7'nin ABD'de yıllık olarak, 73 480 hastalığa, 2 168 hospitalizasyona ve 61 ölüme sebep olduğunu bildirmiştir. Japonya'nın Sakai şehrinde 1996'da şekillenen ve beyaz turp filizi tüketimi ile ilişkilendirilen bir salgın, 9 000'den fazla okul çağındaki çocuğun etkilenmesine ve 10'dan fazla çocuğun ölümüne neden olmuştur (Michino ve ark., 1999). Mohawk ve ark. (2011), *E. coli* O157:H7'nin ilk tanımlandığı hamburger salgınından günümüze şekillenen çeşitli salgınlarda artan hospitalizasyon ve HUS oranlarına dikkati çekmektedir (2006 yılındaki ıspanak kaynaklı salgında, hospitalizasyonda % 34 ve HUS'ta % 12 artış; 2009 yılındaki kurabiye hamuru kaynaklı salgında, hospitalizasyonda % 27 ve HUS'ta % 9 artış gözlenmiştir). Türkiye'de ise insanların *E. coli* O157:H7'den ne boyutta etkilendiği ve hastalık sırasında nasıl bir klinik tablo şekillendiğine ilişkin raporlar oldukça sınırlıdır (Yeniiz ve ark., 2009; Erdoğan ve ark., 2011).

İnsanlarda görülen pek çok *E. coli* O157:H7 infeksiyonunda tüketilen gıda veya suyun, ruminant dışkısı ile kontamine olduğu belirlenmiştir (Gyles, 2007).

İnfeksiyonun bulaşmasında ve yayılmasında başlıca kontamine ve yetersiz pişirilmiş gıda veya su rol oynamasına karşın, çapraz kontaminasyon, hasta bireylerle temas, fekal-oral yol, kontamine su kaynaklarında yüzülmesi ve etkeni taşıyan hayvanlarla temas sonucu şekillenen infeksiyonlar da bildirilmiştir (LeBlanc, 2003). Kontaminasyonun şekillenmesinde, etkeni taşıyan ruminantların dışkılarının işlenmeden gübreleme amacıyla kullanılmasının yanı sıra, özellikle mezbahadaki kesim işlemleri sırasında karkasların gerek bağırsak içeriği, gerekse dışkı ile kontamine deri veya ekipman ile teması önemli rol oynamaktadır (Elder ve ark., 2000; LeBlanc, 2003; Gyles, 2007).

E. coli O157:H7'nin primer rezervuarı sığırlar olarak ifade edilmesine karşın (Doyle ve ark., 2006), koyunların *E. coli* O157:H7 taşıyıcılığı göz ardı edilemeyecek kadar fazla olup dünyanın çeşitli yerlerinden bildirilen dışkı orijinli infeksiyon prevalansları % 40'ları bulmaktadır (Kudva ve ark., 1996; Chapman ve ark., 1997; Kudva ve ark., 1997a; Blanco ve ark., 2003; Ogden ve ark., 2005). Türkiye'de koyun ve/veya kuzu dışkısında *E. coli* O157:H7 prevalansına ilişkin bir (Goncuoglu ve ark., 2010), *E. coli* O157 prevalansına ilişkin az sayıda (Gülhan, 2003; Turutoglu ve ark., 2007; Gökçe ve ark., 2010) ve karkas prevalansına ilişkin ise hiç rapor bulunmamaktadır.

Türkiye'de hayvan yetiştiriciliğinde koyun önemli bir yere sahiptir. Nitekim, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) 2012 Yıllık İstatistik Raporu'na göre Türkiye'deki koyun eti üretimi, 2010 yılında toplam 2 080 000 ton olan et üretiminin 259 000 (% 12.5) tonunu oluşturmaktadır. Yine aynı raporda, Avrupa Birliği (AB) ve Avrupa Serbest Ticaret Birliği (EFTA) ülkelerinden oluşan 30 ülkenin koyun eti üretimi, toplam 45 493 000 ton olan et üretiminin 939 000 (% 2) tonunu oluşturmaktadır. Koyun eti üretimi konusunda bu ülkelerin başını çeken İngiltere'de ise, 3 547 000 ton olan toplam et üretiminin 281 000 (% 7.9) tonunu koyun eti oluşturmaktadır (Anonim, 2013). Türkiye'de 2012 yılında kayıt altına alınan toplam 915 844 ton olan kırmızı et üretiminin % 10.6'sını (97 334 ton) koyun eti oluşturmaktadır (TİK, 2013). Diğer ülkelere kıyasla koyun eti üretimi göreceli olarak yüksek olan Türkiye'de, koyun eti tüketimi de dünya ortalamasının üzerinde seyretmektedir. Avusturalya-Asya ülkelerinden, Kuzey Amerika'ya 17 kg'dan 0.7 kg'a kadar değişen kişi başı yıllık koyun eti tüketimi, dünyada ortalama olarak 2 kg

iken, Türkiye'de sadece 2000 - 2009 yılları arasında 6.1 ile 4.5 kg arasında dalgalanma göstermektedir (Montossi ve ark., 2013; FAOSTAT, 2013).

Bu çalışmada, Kırıkkale ilinde mezbahaya getirilen koyunlardan kesimi takiben alınan rektoanal mukozal svap (RAMS) ve karkas sünger sürüntüsü (KSS) örneklerinden etkinliği ve duyarlılığı yüksek bir teknik olan immuno manyetik seperasyon (IMS) bazlı kültür tekniği ile *E. coli* O157 izolasyonu, izolatların *E. coli* O157:H7 olarak identifikasyonu, önemli virülens genlerinin belirlenerek moleküler karakterizasyonu ve mevsimsel farklılığın incelenmesi amaçlanmıştır.

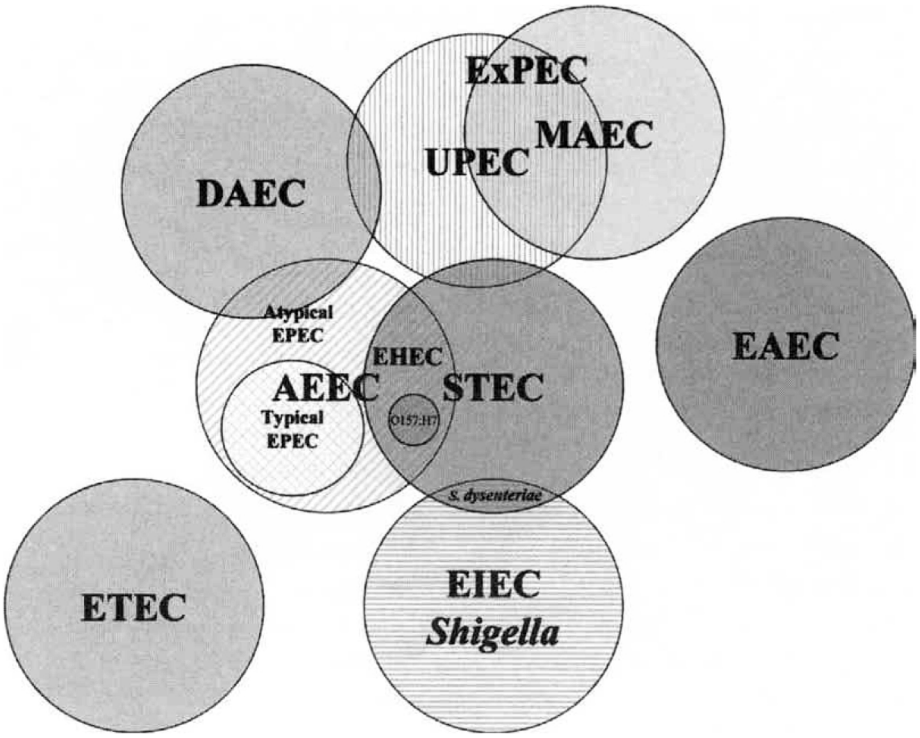
1.1. *E. coli* O157:H7'nin Genel Özellikleri

E. coli ilk kez, *Bacterium coli commune* olarak Alman pediatrist Dr. Theodor Escherich tarafından 1885'te tanımlanmıştır. Sıcak kanlı hayvanların normal bağırsak florasında bulunan ve bağırsağın fizyolojik dengesinin korunmasında da önemli rol oynayan *E. coli*, su kaynaklarında veya gıdalarda belirlendiğinde fekal kontaminasyon indikatörü olarak değerlendirilmekte ve enterik patojenlerin bulunabileceğini ifade etmektedir.

Enterobacteriaceae familyası *Escherichia* genusunda yer alan *E. coli* (Castellani ve Chalmers, 1919), Gram-negatif, sporsuz, peritrik flagellalı veya non-motil, 0.25-1 μm çapında ve 2 μm uzunluğunda olan düzgün çomaklardır. Gelişimi için basit şekerleri kullanabilen fakültatif anaerob karakterdeki *E. coli*, glikoz ve diğer şekerleri fermente ederek, daha sonra laktik asit, asetik asit ve formik aside dönüştürülen piruvatı üretmektedir. *E. coli* identifikasyonu için önemli biyokimyasal testler (IMViC) arasında; indol üretimi pozitif, metil-red testi pozitif, Voges-Proskauer negatif ve sitrat kullanımı negatiftir. *E. coli*'lerin % 95'i indol pozitif olup biyotip 1 olarak sınıflandırılırken, kalan % 5'i indol negatiftir ve biyotip 2 olarak sınıflandırılmaktadır (Doyle ve Padhye, 1989).

Çoğu biyokimyasal özelliği *E. coli* ile benzer olan *E. coli* O157:H7 (Wells ve ark., 1983), sorbitolü 24 saat içerisinde fermente edememesi ve 4-metil-

umbeliferil glukronid (MUG)'i β-D-glukronidaz aktivitesi ile hidrolize ederek florojenik bileşikleri oluşturamaması ile farklılık göstermektedir (Wells ve ark., 1983; Doyle ve Schoeni, 1984). Ancak günümüzde çeşitli araştırmacılar tarafından sorbitol (> 24 saat) ve β-D-glukronidaz aktivitesi pozitif olan *E. coli* O157 izolatları bildirilmiştir (Erol, 2007). Doyle ve Schoeni (1984), genel sıvı besi yerinde yaptıkları çalışmalarda, etkenin 30 - 42 °C arasında hızla ürerken, 44 - 45 °C'de çok zayıf ürediğini, 10 °C veya 45.5 °C'de ise 48 saat içinde hiç üreme olmadığını bildirmişlerdir. Generasyon süresinin 37 °C'de 0.49 saat, 42 °C'de 0.64 saat olduğunu bildiren araştırmacılar, dana kıymasındaki termal inaktivasyon deneyleri ile etkenin sıra dışı bir sıcaklık dayanıklılığı olmadığını ve desimal indirgenme değerlerinin 57.2, 60, 62.8 ve 64.3 °C'ler için sırasıyla 270, 45, 24 ve 9.6 saniye olduğunu ifade etmişlerdir. Donmuş olarak - 20 °C veya - 80 °C'de muhafaza edilen kıymalarda, 9 ay süre ile *E. coli* O157:H7 sayılarında önemli bir değişiklik şekillenmemiştir (Doyle ve Schoeni,1984).



Şekil 1.1. Değişik *E. coli* patotipleri arasındaki karmaşık ilişkiyi gösteren Venn çizimi (Donnenberg, 2002).

E. coli'ler sağlıklı insanların ve hayvanların bağırsak florasının değişmez kommensal bakterileri olmalarına karşın; kanatlı, domuz, sığır, koyun, tavşan ve insanların da dahil olduğu bir çok canlıda, diyareden, ağır dizanteri, üriner sistem hastalıkları, menenjit, septisemi ve HUS'a kadar bir çok hastalığın etiyolojisinde yer alabilmektedir. *E. coli* suşlarının hastalık oluşturma ve çok çeşitli sendromlara sebep olabilmelerinin altında virülens özelliklerini kodlayan spesifik genler ve *E. coli* suşlarının bu genleri değiş tokuş edebilme kabiliyetleri yatmaktadır.

1.2. *E. coli* Taksonomisinde *E. coli* O157:H7

Bu kapsamda, insanlarda hastalık oluşturan tanımlanmış *E. coli* patotiplerini kapsayan ve farklı patotipler arası kompleks ilişkiyi gösteren Venn çizimi Şekil 1.1'de görülmektedir (Donnenberg, 2002). Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) suşları, menenjit-ilişkili *E. coli* (MAEC) ve üropatojenik *E. coli* (UPEC) suşlarını kapsamaktadır. Bu suşlar ortak virülens genlerini barındırmakta ve tek bir klon iki tip infeksiyona da sebep olmaktadır (Russo ve Johnson, 2000). Bazı UPEC suşları, doku kültürü hücrelerine diffüz aderenz özelliği göstermekte ve diffüz adeziv *E. coli* (DAEC) suşları ile aynı adezinlere sahiplerdir. DAEC heterojen bir patotip olup, hem üriner sistem hastalarından hem de diyareli hastalardan tespit edilmiştir. Üriner sistem hastalıklarına sebep olan Shiga toksin üreten STEC suşları da bildirilmiştir (Tarr ve ark., 1996). STEC suşları bakteriyofajlar tarafından kodlanan Shiga toksin üretimi ile tanımlanmaktadır, ancak bazı suşlar aynı zamanda epitel hücrelerine sıkı adezyon göstererek, mikrovilli yapılarını bozmak kaydıyla pedestal oluşumlarına sebep olmakta, bağlanan ve bozan (attaching and effacing) *E. coli* (AEEC) patotipi ile benzer özellikler göstermektedir. Bu tip hem STEC, hem AEEC olan patotipler, EHEC olarak tanımlanmaktadır. EHEC patotipi halk sağlığı açısından en önemli serotip olan *E. coli* O157:H7'yi barındırır. Shiga toksin üretmeyen AEEC suşları ise enteropatojenik *E. coli* (EPEC) olarak tanımlanmaktadır. EPEC suşları arasında Bfp (bundle-forming pili - demet-oluşturan pili) oluşturarak doku kültürü hücrelerine

lokalize aderenz gerçekleştirenler tipik EPEC olarak tanımlanırken bunu yapmayanlar atipik EPEC olarak tanımlanmaktadır. Atipik EPEC'lerin arasındaki bazı suşlar ise diffüz adezyon göstermektedir. Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ise doku kültürü hücrelerine yüksek etkinlikte invaze olarak, sitoplazmada çoğalmakta ve hücreden hücreye yayılım göstermektedir. Bu patotip, *Shigella* genusundan yer alan mikroorganizmaları da içermektedir. *S. dysenteriae* Shiga toksin ürettiği için hem STEC hem de EIEC patotipinde yer almaktadır. Akut ve inatçı bir diyareye neden olan enteroaggregatif *E. coli* (EAEC), heterojen bir patotip olup aderenz özelliğine göre sınıflandırılmaktadır. Kuzey Almanya'da 2011 Mayıs'ında pastırma otu filizi tüketimine bağlı olarak şekillenen ve 855 HUS, 2 987 akut gastroenterit ve 53 ölümle dünyadaki önemli epidemiler arasında yerini alan salgında tespit edilen *E. coli* O104:H4 serotipi ise, Shiga toksin (stx_2) ve enteroaggregatif *E. coli* virülens özelliklerini kombine bir şekilde bulundurmaktadır (Bielaszewska ve ark., 2011; Hauswaldt ve ark., 2013). Akut diyareye neden olan enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) patotipi ise ürettikleri labil ve stabil enterotoksinler ile tanımlanmaktadır.

1.3. *E. coli* O157:H7'nin Tarihçesi ve Evrimsel Süreci

Binsekizyüzlü yılların sonlarında Japonya'daki ağır bir dizanteri epidemisi ile Kiyoshi Shiga tarafından belirlenen etken, daha sonra *Shigella dysenteriae* olarak isimlendirilerek Shiga toksin tanımlanmıştır. Ancak, böbrek yetersizliği, trombositopeni ve hemolitik anemi ile tanımlanan HUS'un *S. dysenteriae* ile ilişkilendirilmesi 1970'lerin sonlarında gerçekleştirilmiştir (Thorpe ve ark., 2002). Aynı dönemde, bazı *E. coli* suşlarının Shiga toksin üretebildikleri (STEC), Konowalchuk ve ark. (1977)'nın bazı *E. coli* kültürü filtratlarının Vero hücreleri üzerine, ısıya dayanıksız (heat-labil) ve klasik kolera-benzeri labil *E. coli* enterotoksin antiserumu ile nötralize olmayan, sitotoksik etkisini gözlemlemeleri ile keşfedilmiştir. Takip eden süreçte Wade ve ark. (1979), sitotoksin üreten *E. coli* O27

suşunu kanlı diyare olgusuyla ilişkilendirmiş ve dünyanın farklı yerlerinden benzer bildirimler yapılmıştır (Thorpe ve ark., 2002).

ABD'de yetersiz pişirilmiş kontamine hamburger kaynaklı HC olgusuyla ilişkilendirilen *E. coli* O157:H7 serotipi (CDC, 1982), sonraki yılda dışkıda Shiga toksin varlığı ve etkilenenlerde HUS gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Karmali ve ark., 1983). Takip eden yıllarda O157 ve O157-olmayan STEC, bir çok araştırmacının ilgisini üzerine çekmiş ve günümüzde insan hastalıklarıyla ilişkilendirilen Shiga toksin üreten 200'den fazla *E. coli* serotipi bildirilmiştir (Acheson ve Keusch, 1996; Hussein, 2007).

Almanya'da 1980'lerin sonlarına doğru HUS ile ilişkilendirilen stx_2 geni barındıran ve *E. coli* O157:H7'den farklı olarak hızla sorbitolü fermente edebilen (SF) ve hareketsiz (NM) SF *E. coli* O157:H^- bildirilmiştir ve takip eden yıllarda bir çok (% 3.2 - 17.7) HUS olgusundan sorumlu olduğu bildirilmiştir. Genel virülens özellikleri yönünden STEC O157:H7'ye benzemesine karşın, SF O157:H^- suşlarında stx_2, *eae*-γ_1, EHEC *hlyA*, *etp* ve fazladan *spf* genleri mevcutken, *espP* ve *katP* genleri yoktur (Karch ve Bielaszewska, 2001). Bu suşlarda, *E. coli* O157:H7 suşlarına tellürit direnci ve adezyon özelliği (Iha) kazandıran TAI (tellurite resistance and adherence-conferring island) patojenite adası da bulunmamaktadır (Tarr ve ark., 2000). SF *E. coli* O157:H^- suşları non-motil olduklarından flagella antiserumları ile serotiplendirilememiş olmasına karşın restriksiyon fragman uzunlukları polimorfizmi (RFLP) analizi ile H7 kodlayan *fliC* genine sahip oldukları gösterilmiştir (Bielaszweska ve ark., 2000). Başka bir çalışmada yapılan SF *E. coli* O157:H^- *fliC* sekans analizi sonucu bu genin çoklu mutasyon ve insersiyonlara sahip olduğu ve dolayısıyla kodonlardaki çerçeve kayması sonucu sessizleştiği ileri sürülmüştür (Reid ve ark., 1999).

Feng ve ark. (1998), çeşitli STEC O157 ve Alman SF *E. coli* O157:H^- klonunun evrimsel ilişkisini belirlemek için yaptıkları çalışma ile STEC O157:H7 ve SF STEC O157:H^-'nin EPEC-benzeri özelliklere sahip ortak bir O55:H7 atasal suşundan köken almış olabileceğini öne sürmüşlerdir. LEE (locus of enterocyte effacement - enterosit bozma lokusu) barındıran O55:H7'den evrimi sırasında aşamalı olarak; stx_2 geni, büyük bir plazmid (pO157) ve O157 antijenini kodlayan *rfb* genini alan STEC O157:H7'den farklı olarak SF STEC O157:H^-'nin, daha erken

dönemde köken aldığı O55:H7 suşundan ayrılarak motilitesini kaybettiği ancak atasal özellikleri olan SF ve β-D-glukronidaz aktivitesini koruduğu ifade edilmiştir (Feng ve ark., 1998). Evrimsel süreçte O55:H7 serotipinden sonraki filogenetik basamakta yer alan ve Bono ve ark. (2012) tarafından tahmini olarak ifade edilen SF, β-D-glukronidaz^{+}, Stx2^{+} ve pO157 barındıran *E. coli* O157:H7, Jenke ve ark. (2012)'nın geyik orijinli LSU-61 suşunu incelenmesi ile identifiye edilmiştir. Araştırmacılar, insan patojenlerinin evriminde insan olmayan rezervuarların önemini vurgulamıştır (Jenke ve ark., 2012).

1.4. *E. coli* O157:H7'nin Rezervuarları ve Mekanik Vektörleri

Etkenin epidemiyolojisinin anlaşılabilmesi için doğada nerede bulunduklarının ve insanlara nasıl bulaşabildiklerinin iyi anlaşılması gerekmektedir. Sağlıklı ruminantlar, özellikle sığırlar, *E. coli* O157:H7'nin asıl rezervuarı ve insan hastalıklarının en önemli kaynağı olarak tanımlanmışlardır. Bu kapsamda, besi sığırlarından, sütçü ineklerden, danalardan, düvelerden ve hatta sağlıklı veya diyareli buzağılardan etken izole edilmiştir (Doyle ve Padhye, 1989; Gyles, 2007). ABD'de yapılan çalışmalarda besi sığırları, inekler, düveler ve buzağılar için prevalans oranları sırasıyla % 0.3-19.7, % 0.2-8.4, % 1.6-3.0 ve % 0.4-40 arasında bulunmuştur (Hussein ve Sakuma, 2005; Hussein, 2007). Kırıkkale ilinde yürütülen bir çalışmada örnekleme yapılan 240 sığırın, % 7.1 ve % 6.3'ünde sırasıyla, *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7 tespit edilmiştir (Ayaz ve ark., 2014).

Tarihte bildirilen bir çok STEC O157:H7 infeksiyonu direkt sığırla ilişkilendirilmiştir (Doyle ve ark., 2006). Doğal veya deneysel olarak infekte edilen sığırlar araştırıldığında, *E. coli* O157:H7'nin rektum mukozasının anüsle birleştiği, lenf folliküllerince zengin rektoanal mukozaya adere olduğu ve bunun sonucunda etkenin, çoğunlukla dışkının en dış katmanında bulunduğu bildirilmiştir (Naylor ve ark., 2003; Davis ve ark., 2006; Lim ve ark., 2007a). Bazı sığırların diğerlerinden daha yüksek oranlarda etkeni saçtığına dair veriler olup bu infeksiyöz "süper-

saçıcıların (super-shedders)" çiftliklerdeki bulaşmanın yaklaşık % 80'ninde sorumlu olduğu bildirilmiştir (Matthews ve ark., 2006a; Matthews ve ark., 2006b). Genel olarak etkenin saçılım oranları, mevsimsel bir dağılım göstererek ılık aylarda soğuk aylara oranla daha yüksek olmaktadır. Ayrıca sütten yeni kesilmiş buzağılarda prevalansın, yaşamlarının diğer evrelerine göre daha yüksek olduğu ifade edilmiştir (Doyle ve ark., 2006).

İnsan *E. coli* O157:H7 infeksiyonlarından başlıca sığırlar sorumlu tutulsa da, koyunların *E. coli* O157:H7 taşıyıcılığı göz ardı edilemeyecek kadar fazladır. Koyunlarda bildirilen dışkı prevalansları % 0.4'ten % 40'lara kadar değişmektedir (Kudva ve ark., 1996; Chapman ve ark., 1997; Kudva ve ark., 1997a; Blanco ve ark., 2003; Ogden ve ark., 2005). Ayrıca dışkıyla 10^4 kob/g düzeyine kadar saçılabildiği tespit edilen *E. coli* O157'nin koyunlarda kolonize olması, etkenin çiftlik ortamında daha uzun süre canlı kalmasına sebep olarak, meralara yayılışını arttırmaktadır (Ogden ve ark., 2005; Rotariu ve ark., 2011). Nitekim Ogden ve ark. (2002), koyun dışkısında etkenin 15 haftaya kadar canlı kaldığını rapor etmiştir. Koyunların deneysel infeksiyonları, etkenin 2 hafta ile 2 ay arasında değişen sürelerde dışkı ile saçılmasına neden olmuştur (Cornick ve ark., 2000). Goncuoglu ve ark. (2010), duyarlılığı yüksek (Anonim, 2001a; Chapman ve ark., 2001a) IMS selektif zenginleştirme tekniği ile inceledikleri 218 koyun dışkı veya kolon örneklerinin, 14 (% 6.4)'ünde *E.coli* O157:H7 varlığını ortaya koymuştur. IMS'ye göre hassasiyeti daha düşük olan konvansiyonel kültür tekniğinin uygulandığı diğer çalışmalarda ise sırasıyla, % 23 (Gülhan, 2003), % 9.1 (Turutoglu ve ark., 2007) ve % 10.1 (Gökçe ve ark., 2010) oranlarında *E. coli* O157 tespit edilmiştir. Kırıkkale ilinde yürütülen bir başka çalışmada ise, koyun rektal svaplarından verotoksijenik *E. coli* izole edilemediği bildirilmiştir (Aksoy ve ark., 2007). Etken, keçi (Beutin ve ark., 1995; Keen ve ark., 2006) ve geyik (Asakura ve ark., 1998; Dunn ve ark., 2004) gibi meraları kontamine edebilecek başka ruminantlardan da tespit edilmiştir.

Kanatlılarda da *E. coli* O157:H7'ye rastlanabilmektedir. Yumurtacı tavuklarda gerçekleştirilen bir çalışmada, 720 kloakal svabın 26'sında STEC O157:H7 bulunmuştur (Dipineto ve ark., 2006). Ayrıca yapılan çalışmalarda, etken düşük bir oranda (% 1.3) hindi dışkılarında (Heuvelink ve ark., 1999) ve yabani kanatlılardan güvercin, martı ve kargada da tespit edilmiştir (Schmidt ve ark., 2000;

Doyle ve ark., 2006). Deneysel olarak infekte edilen tavuklarda etken 11 aya kadar sekumda ve yumurta kabuklarında tespit edilmiştir (Schoeni ve Doyle, 1994)

Diğer yandan, ev sineklerinin de dahil olduğu çeşitli sinek türlerinin, kabuk bütünlüğü bozulmuş elmaları kontamine edebilen meyve sineklerinin ve topraktan sebzelere etkeni taşıyabilen sümüklü böceklerin mekanik vektörlük yapabildiği rapor edilmiştir (Doyle ve ark., 2006).

1.5. *E. coli* O157:H7'nin Bulaşma Yolları ve Salgınlarda Belirlenen Gıdalar

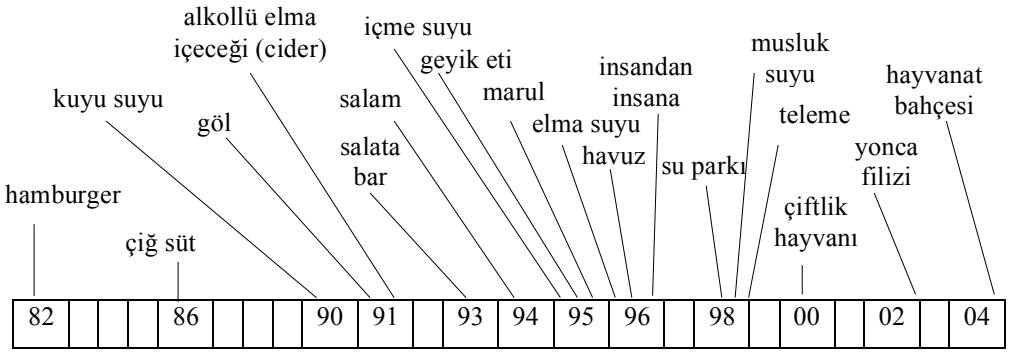
Ruminantlar ile teması olan kişilerin direkt olarak etkeni oral yolla alması mümkün olabileceği gibi; infekte hayvanların dışkısı, hayvanların kesim aşamasında eti, yağmur ve rüzgarla sulara karışarak gölleri ve içme suyu kaynaklarını, tarlada gübre olarak kullanıldığında da yetiştirilen meyve ve sebzeleri kontamine edebilmektedir (Çizelge 1.1, Şekil 1.2 ve Şekil 1.3). Dahası, çeşitli vektörler dışkı kaynağından etkeni taşıyarak su ve gıdaları kontamine edebilmektedir (Doyle ve ark., 2006). Nem oranına bağlı olarak etken çiftlikteki yüzeylerde 4 haftaya kadar, sığır dışkısında ise 15 °C'de 18 haftaya kadar canlılığını korumaktadır (Fukushima ve ark., 1999; Williams ve ark., 2005). Sularda da 2 hafta ila 10 ay arasında canlılığını koruyabilen etken, *E. coli* O157:H7 infeksiyonlarının şekillenmesinde suyun önemli bir kaynak olmasına sebep olmaktadır (Chekabab ve ark., 2013). Dahası üremesi için elverişli olmayan bu tür stresli su ortamında canlı fakat kültüre edilemeyen formlar oluşturabilen *E. coli* O157:H7 Shiga toksin üretmeye devam edebilmektedir (Liu ve ark., 2010).

İnsandan insana bulaşma hijyen eksikliğine bağlı olarak gündüz bakım evi, hastane ve okul gibi toplu yaşam alanlarında şekillenen bir çok olguda tespit edilmiştir (Belongia ve ark., 1993; Pennington, 2000). *E. coli* O157:H7 ile infekte olan çocukların büyük bir çoğunluğu etkeni birkaç gün dışkı ile saçmaya devam etmelerine karşın, ciddi infeksiyon tablosu şekillenen çocuklarda 20-30 gün, hatta

semptomlar ortadan kalktıktan sonra dahi dışkıda etken tespit edilmektedir (Karch ve ark., 1995).

Çizelge 1.1. *E. coli* O157:H7 bulaşma kaynaklarının ilk kez belirlendiği olgular (Doyle ve ark., 2006; Matulkova ve ark., 2013; Nabae ve ark., 2013; Miller ve ark., 2012).

Yıl	Bulaşma kaynağı	Yer
1982	sığır kıyması	ABD
1985	pişmiş sığır eti	Kanada
1986	çiğ inek sütü	ABD, Kanada
1988	sığır eti (rosto)	ABD: Wisconsin
1989	kuyu suyu	Kanada
1990	lokanta yemeği	İngiltere
1990	insandan insana transfer	İskoçya, İsrail
1990	içme suyu	İngiltere
1990	musluk suyu	Japonya
1991	yoğurt	İngiltere
1991	göl	ABD: Oregon
1991	alkollü elma içeceği (cider)	ABD: Massachusetts
1992-93	çiğ sütten yapılmış peynir	Fransa
1992	havuz	İskoçya
1993	salata	ABD: Oregon, Washington
1994	salam	ABD: Washington, California
1994	sandviç	ABD: Wisconsin
1994	çiftlik hayvanları	İngiltere
1995	çiğ keçi sütü	Çek Cumhuriyeti
1995	pişmiş domuz eti	İngiltere
1995	marul	ABD, Kanada
1995	geyik eti	ABD: Oregon
1995	patates	İngiltere
1995-96	sosis	Almanya
1996	elma suyu	ABD, Kanada
1996	gıda işletmesi personeli	Avustralya
1996	beyaz turp filizi	Japonya
1997	yonca filizi	ABD: Michigan, Virginia
1997	tarım alanı	İngiltere
1997	kremalı kek	İngiltere
1998	peynir telemesi	ABD: Wisconsin
1998	çiğ krema	İngiltere
1998	su parkı	ABD: Georgia
1999	kumsal	İngiltere
1999	hayvanat bahçesindeki hayvanlar	Kanada
2000	hazır yemekler	İngiltere
2000	akarsu	ABD: California
2003-06	çiğ ıspanak	ABD: California
2004	keçi peyniri	Fransa
2009	kurabiye hamuru	ABD
2010	kabuklu fındık	ABD
2011	yengeç eti	İngiltere: Plymouth
2011	pirinç keki	Japonya

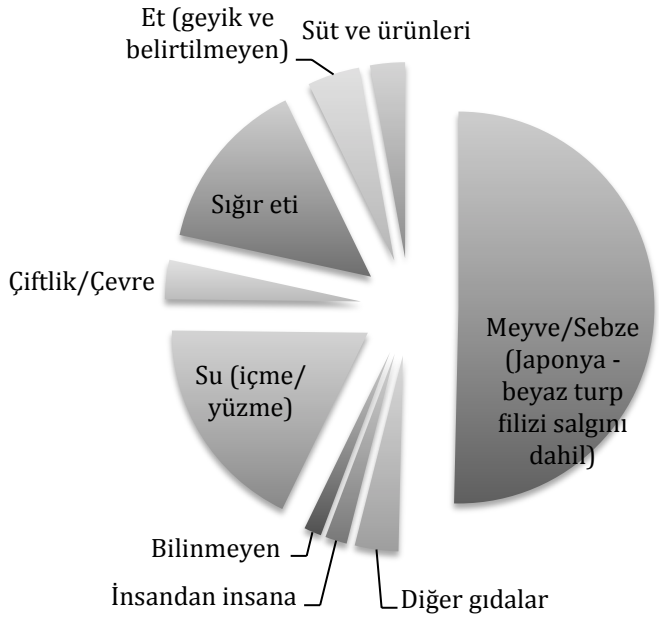


Şekil 1.2. *E. coli* O157:H7 insan infeksiyonlarında belirlenen bulaşma kaynaklarının tarihte ortaya çıkışı (Doyle ve ark., 2006).

1.6. İnsanlardaki *E. coli* O157:H7 İnfeksiyonlarında Hastalık Tablosu

E. coli O157:H7'nin de dahil olduğu STEC infeksiyonlarında, asemptomatik infeksiyondan, hafif ve ağır-kanlı diyareye kadar değişen gastrointestinal bulguların yanı sıra özellikle çocuklarda HUS ve erişkinlerde trombotik trombositopenik purpura (TTP) komplikasyonları gelişebilmektedir (Gyles, 2007). Genellikle 3 - 4 gün olan inkübasyon süresi, bazı olgularda 1 - 2 gün veya 5 - 8 gün arasında değişmektedir (Erol, 2007).

HC, abdominal kramplar ve sulu diyare ile başlayan, takiben bağırsak kanamasını andıran hemorajinin de katıldığı ancak belirgin bir ateşin bulunmadığı bir hastalık tablosudur (Karmali, 1989). Ağız yoluyla alınan STEC'in, mide ve ince bağırsakları geçerek kolonda kolonizasyonu ile şekillendirdiği mikrovilli hasarı sonucu sulu diyare oluşmaktadır. Kolon ortamında virülens genlerinin aktivasyonu sonucu yeterli miktarda Shiga toksin üretimi ile kolon damarlarındaki lokal hasar kanlı diyareye sebep olurken, yeterli miktarda Shiga toksinin dolaşım sistemine emilimi ile ekstraintestinal bulgular şekillenmektedir. Shiga toksinlerin en sık rastlanan hedefleri böbrekler olmasına karşın, merkezi sinir sistemi, akciğerler, pankreas ve kalbin de dahil olduğu bir çok organ etkilenebilmektedir (Gyles, 2007).



Şekil 1.3. Dünyadaki, 1982 - 2006 yılları arasında resmi makamlar tarafından yayımlanan ve bilimsel raporlarda bildirilen *E. coli* O157:H7 insan olgularının bulaşma kaynaklarına göre dağılımı (26 179 olgu) (Doyle ve ark., 2006).

STEC infeksiyonu sonucu gelişen HUS, mikroanjiyopatik hemolitik anemi, trombositopeni ve akut nefropati ile karakterize tabloyu tanımlamak için kullanılmaktadır. Diyare şekillenmeden de gelişebilen HUS'un patogenezinde primer patojenite, renal endotelial hasardan kaynaklanmaktadır. Ancak Shiga toksinler aynı zamanda mezenşimal hücreler ile glomerüler ve renal tübüler epitelyuma da zarar vermektedir. Küçük çocuklar (<2 yaş) hali hazırda renal glomerüllerinde yüksek düzeyde Shiga toksin reseptörü (globotriosil seramid) eksprese ettiklerinden, diğer yaş gruplarına göre daha yüksek risk grubunu oluşturmaktadır. Ancak reseptör ekspresyonları daha az olan ergin çocuklar ve erişkinlerde, patojenin immuniteyi uyarması ile sitokinlerin salınması sonucu artan Shiga toksin reseptörü ekspresyonu, glomerüler sensitizasyona, koagülasyon-fibrinolitik sistemin aktivasyonuna ve endotel hasarına neden olabilmektedir (Ray ve Liu, 2001). Çocuklarda çoğunlukla diyalize yanıt veren ve hızla ortaya çıkan renal yetmezlik izlenirken, erişkinlerde

çoğunlukla oligouri şekillenmesinden önce endotel hasarı ve sonucunda dissemine intravenöz koagülasyona bağlı olarak, yüksek mortalite ile seyreden TTP gelişimiyle nörolojik ve kardiyovasküler komplikasyonlar gelişebilmektedir (Paton ve Paton, 1998; Ray ve Liu 2001).

1.7. *E. coli* O157:H7'nin Virülens Faktörleri

Zoonotik karakterdeki *E. coli* O157:H7'nin infeksiyonlara neden olabilmesi için; çeşitli rezervuarlarda bağırsağın zorlu koşullarına dayanarak kolonize olması, insanlar tarafından oral yolla yeterli dozda alınması, enterik patojenlerin eliminasyonunda oldukça önemli olan mide asidine dayanabilmesi ve bağırsaklarda yeterli sayıda kolonize olarak, hem olumsuz koşullardan, hem de bağışıklık sisteminden sakınabilmesi gereklidir. Bu kapsamda etkenin belli başlı virülens faktörleri Çizelge 1.2'de verilmiştir.

1.7.1. Asit Direnci (AR)

E. coli O157:H7'nin insan bağırsaklarına kolonize olmasını (özellikle de düşük infeksiyon dozunda) etkileyen önemli faktörlerden biri, mide ve bağırsaklar boyunca rastlayacağı organik/inorganik asitlere ve düşük pH'ya dirençtir. *E. coli* dahil, birçok enterik patojenin düşük pH'ya maruz kalmasıyla, asidik ortamlarda canlı kalma kabiliyetlerinde artış olduğu (Goodson ve Rowbury, 1989) ve *E. coli* O157:H7'nin asidik gıdalarda da canlılığını sürdürdüğü bildirilmiştir (Leyer ve ark., 1995).

Çizelge 1.2. *E. coli* O157:H7'nin virülens faktörleri.

Faktör	Rol Aldığı Fonksiyon
	Asit Direnci
GadA/B/C	Glutamat dekarboksilasyonu ile intrasitoplazmik proton harcanması
AdiA	Arjinin dekarboksilasyonu ile intrasitoplazmik proton harcanması
RpoS	Durağan faz gen regülasyonu, stres yanıtı
HdeA/B	Periplazmik proteinlerin agregasyonunun önlenmesi
SspA	H-NS'in baskılanması ile stres yanıtının aktifleştirilmesi
WcaC/D/E	Ekzopolisakkarid yapısında kolonik asit üretimi ile serbest protonların tamponlanması
	Adezyon
İlk Adezyon	
Lpf	Adezyon kabiliyetinde artış, kolonizasyon bölgesine etki, yarışmacı özellikte artış
Hcp	Adezyona katkı, tavşan eritrositlerinin hemaglütinasyonu, biyofilm oluşumu, inflamasyonun tetiklenmesi
F9 fimbria	Kolonizasyon miktarına etki
Elf	Adezyonda artış
EhaA/B/J	Hücre agregasyonu, biyofilm oluşumu, adezyonda artış
EspP	Pepsin A ve koagülasyon faktörü V'i yıkımlama, adezyon ve sitopatojenitede artış, biyofilm oluşumu
$FliC_{H7}$	Adezyonda artış, müsine bağlanma, kolonizasyonun devamlılığı ve spesifitesi, inflamasyon tetiklenmesi
Paa	Adezyonda artış (?)
Iha	Siderefor aktivitesi, adezyonda artış (?)
OmpA	Adezyonda artış, dendritik hücre aktivasyonu
Efa1/ToxB	Adezyonda artış
Spf	Adezyonda artış (*E. coli* O157:H^-'de bulunmakta)
Sıkı Adezyon	
Eae	Bakteri yüzeyinde bulunan intimin, Tir'e bağlanarak sıkı adezyon, kolonizasyonun tropizmi, sitoiskeletin modifikasyonu ve pedestal oluşumu
Tir	Konak hücreye aktarılan intimin reseptörü, sitoiskeletin modifikasyonu ve pedestal oluşumu
EspA/B/D ve T3SS	Konak hücre efektör proteinlerin aktarılması
Efektör proteinler	Hücre döngüsünün etkilenmesi, fagositozdan korunma, inflamasyon ve apoptozis modülasyonu ve pedestal oluşumunun kaynağı aktin üstüne etkiler (Çizelge 1.3)
	Shiga Toksin
Stx	Protein elongasyonunun durdurulması, oluşan ribotoksik stres ile apoptozisin indüklenmesi, hücre içi sinyal mekanizmalarının aktivasyonu ve yangısal mediyatörlerin indüklenmesi
	pO157
EhxA/B/D	Eritrositlerin parçalanması ve inflamasyonun tetiklenmesi
KatP	Peroksit kaynaklı oksidatif hasardan korunma ve bağışıklıktan kaçış
EspP	Serin proteaz aktivitesi
StcE	Komplement-ilişkili lizisten korunma, adezyona katkı, nötrofil migrasyonunu azaltma ve oksidatif patlamayı arttırma

E. coli laboratuvar suşlarıyla yapılan çalışmalarla ilk olarak; oldukça düşük pH'da (pH 2.5) hücreleri koruyan, düşük-pH ile aktive olan, durağan-faz AR sistemi varlığı belirlenmiştir (Hengge-Aronis, 1993; Gorden ve Small, 1993; Small ve ark., 1994). Alternatif RNA polimeraz sigma faktörü RpoS (σ^s)'nin kontrolünde olan bu sistem, genel stres yanıtı sonucu aktive olmaktadır. Glikoz varlığında baskılanan bu sistemden başka, pH 2.5'a dayanmalarını sağlayan, RpoS-bağımsız (Lin ve ark., 1996), glutamat veya arjinin varlığında aktive olan, iki ayrı sistemin daha varlığı bildirilmiştir. Bunlardan biri, *gadA* ve *gadB* tarafından kodlanan glutamat dekarboksilaz sistemi ile glutamatı içeri alıp, γ-amino bütirik asidi dışarı atan, *gadC* taşıyıcısıdır (Hersh ve ark., 1996; Castanie-Cornet ve ark., 1999). Diğeri ise *adiA* lokusunun ürünü arjinin dekarboksilazdır (Auger ve ark., 1989). Bu iki sistem de, aminoasitlerin dekarboksilasyonu ile hücre içi proton harcanmasıyla pH'nın düşürülmesini sağlamaktadır. *E. coli* O157:H7'deki üç mekanizmanın mutantlarıyla (*rpoS*, *gadC* ve *adiA*) yapılan çalışmada; *rpoS* mutantının, hem elma suyu (cider) gibi bir asidik (pH 3.5) gıdada canlı kalma süresi, hem de inokule buzağılardan saçılma oranı ve süresi azalmıştır. Buna karşın *gadC* mutasyonu özellikle fekal saçılımı etkilemiştir (Price ve ark., 2004).

E. coli O157:H7'nin aside dayanıklılığında başka faktörler de rol oynamaktadır. Periplazmik şaperonlar HdeA ve HdeB, asidik koşullarda diğer periplazmik proteinlerin agregasyonuna engel olmaktadır (Malki ve ark., 2008). RNA polimeraz ilişkili protein SspA (stringent starvation protein A), genel regülatörlerden ve stres yanıtında önemli rol alan (Erol ve ark., 2006) histon-benzeri nükleotid-yapılandıran protein (H-NS)'in durağan-fazda birikmesine engel olarak, stres yanıtını baskılamasını inhibe eder (Hansen ve ark., 2005). Ekzopolisakkarid olan kolonik asit üretilmesi ile mukoid karakterde kolonilerin oluşmasına neden olan mukoid matriksin, hücre yüzeyinde oluşturulan negatif yüklü serbest protonları tamponlamasını sağlayarak, asit direncine katkısı olabileceği bildirilmiştir (Mao ve ark., 2001).

1.7.2. Adezyon

1.7.2.1. İlk Adezyon

E. coli O157:H7 patogenezindeki önemli basamaklardan bir diğeri, midenin asidik koşullarını atlatarak bağırsağa ulaşan patojenin, mikrokoloniler oluşturacağı bölgeye lokal adezyonudur. Giron ve ark. (1991), AE (attaching and effacing - bağlanma ve bozma) lezyonlarının gelişmesinde, prototip olarak kullandıkları EPEC'lerin ilk adezyonunda rol oynayan faktörün, *bfp* genlerinden eksprese ettikleri demet şeklinde, ip-benzeri filamentöz tip-IV pilusları olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, Bfp'ye karşı geliştirilen antiserum varlığında adezyon bölgesindeki mikrokoloni sayısında ve oluşan AE lezyonlarında azalma olduğu belirlenmiştir. AE lezyonlarının *bfp* mutantları ile oluşturulan infeksiyonlarda da gözlenmesi (Giron ve ark., 1991), patojen ile konak arasındaki ilişkinin ve adezyonun gelişmesinin multifaktöriyel olduğu fikrini güçlendirmektedir. EPEC'lerden farklı olarak *bfp* geninden yoksun olan *E. coli* O157:H7 suşlarında, konak mukozası ile ilişkiyi sağlayan birçok farklı yüzey faktörleri (EspA filamanları, intimin, Paa, ToxB, lipopolisakkarid O157, Iha, Efa1, vb.), işleyiş mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olmasına karşın, potansiyel virülens faktörleri olarak ifade edilmektedir (LeBlanc, 2003).

1.7.2.1.1. Uzun polar fimbria (Lpf - Long polar fimbria)

Lpf ve *lpfABCC'DE* operonu ilk kez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium'da tanımlanarak, faredeki Peyer plaklarına adezyonu yönlendirdiği bildirilmiştir (Bäumler ve Heffron, 1995; Bäumler ve ark., 1996). *E. coli* O157:H7, birbirinin aynı

olmayan iki *lpf* lokusu (*lpf1* ve *lpf2)* barındırır. *lpf1* operonunun laboratuvar suşu *E. coli* K-12'de ekspresyonu ile hücre kültürlerine adezyon artmış (~% 60) ve uzun peritrik fimbria oluşumu izlenmiştir (Torres ve ark., 2002). İkinci bir Lpf, *lpf2*, *E. coli* O157:H7'de ilk adezyonla ilişkilendirilerek, EPEC ve O157-olmayan EHEC serotiplerinde homolojileri bulunmuş ve mutantlarının HeLa hücre kültürlerinde adezyon kabiliyetinin azaldığı gözlemlenmiştir (Torres ve ark., 2004).

In vivo çalışmalarda, tek *lpfA1* veya *lpfA1*/*lpfA2* çift mutantlarının koyun, domuz ve gnotobiyotik domuz yavrularında adezyon kabiliyetinin ve şekillendirdiği AE lezyonlarının azaldığı bildirilmiştir (Jordan ve ark., 2004). *E. coli* O157:H7'nin insanlardaki kolonizasyon bölgesi ileumda bulunan Peyer plaklarının follükül ilişkili epiteli (Phillips ve ark., 2000) ile kısıtlıyken, *lpfA1*, *lpfA2* veya her ikisinde mutasyon şekillendirilmesi, *in vitro* organ kültürlerinde oluşan kolonizasyonun ve AE lezyonlarının, ince bağırsakların proksimaline ve distaline uzanmasına neden olmuştur (Fitzhenry ve ark., 2006). Lpf'nin 6 haftalık kuzularda kolonizasyonun devamlılığına da katkısı olduğu bildirilmiştir (Torres ve ark., 2007). Dışkıdan izole edilen *E. coli* O157:H7 sayısında; tek bir lokusun mutasyonuyla önemli azalmalar kaydedilirken, çift lokus mutantlarında etkenin dışkıyla atılma süresinin 21 günden 11 güne düştüğü gözlemlenmiştir. Ancak çift lokus mutantlarının, vahşi suş kadar başarılı bir şekilde, hem öncelikle orta-rektuma hem de takiben diğer bölgelere kolonize olabilmesi, kolonizasyonun devamlılığının, kolonizasyon yeteneğindeki azalmayla ilgili olmadığını düşündürmüştür (Torres ve ark., 2007). Lpf'in kolonizasyona etkisi fikri, vahşi tip *E. coli* O157:H7 ile *lpfA1/lpfA2* çift lokus mutantı arasındaki yarışma deneyinde, mutant suşun, ileum, sekum, orta-kolon ve dışkı düzeylerinde sayıca geri kalması ile güçlendirilmiştir (Farfan ve Torres, 2012).

Genel regülatörlerden H-NS'in, *lpf1*'in regülasyonunda, operonuna bağlanarak transkripsiyonunu durdurucu etkisi olduğu, LEE patojenite adasından kodlanan Ler'in ise, H-NS'in bu etkinliğini baskıladığı rapor edilmiştir. HeLa hücrelerine; H-NS mutantlarında 2.8 kat daha iyi, Ler mutantlarında 2.1 kat daha zayıf adezyon izlenmiştir (Torres ve ark., 2008). Diğer yandan; gelişme fazı, ozmolarite, pH'nın ve demir azlığının *lpf* operonlarının regülasyonuna etkisi olduğu bildirilmiştir (Torres ve ark., 2007).

Önemli bir virülens faktörü olarak Lpf'nin, kolonizasyon ve persistensteki etkinliğine ve regülasyonuna ışık tutulmuş olmasına karşın, Lpf'nin tanınmasında rol alan *in vivo* reseptörlerine ilişkin araştırmalar yenidir. Ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerinin başka patojenlerin adezyonunda reseptör görevi yapmaktadır. Farfan ve ark. (2011) Lpf-ilişkili adezyonda ECM'lerin etkinliğine yönelik çalışmalarıyla, genellikle bağırsakta sıklıkla bulunan fibronektin, laminin ve kollagen IV gibi ECM proteinlerinin EHEC kolonizasyonuna katkısı olduğunu bildirilmiştir (Farfan ve ark., 2011).

1.7.2.1.2. Hemorajik coli pilusu (Hcp - Hemorrhagic coli pilus)

Uzun demetler halinde ve elastik filamentöz polimer karakterindeki tip-IV piluslar, birçok Gram-negatif patojenik bakteride bildirilmiştir. Bu pilusların, konak hücreye yapışma, biyofilm oluşumu, agregasyon, faj reseptörleri sunma, bağışıklıktan kaçma, hareketlilik, DNA alımı ve hücre iletişimi gibi birçok rolleri tanımlanmıştır (Craig ve ark., 2004).

Normal koşullarda (37 °C) ve besi yerlerinde (Laktoz broth) üretilen *E. coli* O157:H7 suşlarında oluşmazken, minimal kazein (Minca) besi yerinde geliştirilen suşlarda, demet halinde 10 μm'den uzun fiberler tespit edilerek Hcp olarak tanımlanmıştır (Xicohtencatl-Cortes ve ark., 2007). *hcpA* kromozomal geni tarafından kodlanan bu 19 kDa'luk HcpA pilin proteinleri HUS hastalarının serumları ile reaksiyon verdiğinden, *in vivo* koşullarda eksprese edildiği sonucuna varılmıştır. Takiben, *hcpA* geni inaktivasyonu ile insan ve sığır epitelyum hücrelerine adezyonda azalma olduğu gösterilmiştir (Xicohtencatl-Cortes ve ark., 2007).

Hcp'nin, konak hücrelere adezyondan başka; epitelyum hücrelerine invazyon, tavşan eritrositlerinin hemaglütinasyonu, biyofilm formasyonu, ECM proteinlerinden fibronektin ve laminine spesifik adezyon, hareketlilik gibi fonksiyonlarda da rol aldığı bildirilmiştir (Xicohtencatl-Cortes ve ark., 2009). Ayrıca Ledesma ve ark. (2010), HcpA pilin monomerlerinin, O157:H7 ile infekte bağırsak epitelyum

hücrelerinde, NF-κB ve AP-1 yolaklarını etkileyerek, patogenezde önemli rol oynayan, özellikle IL-8 ve TNF-α gibi sitokinlerin salınımını uyararak bölgedeki inflamasyon gelişimine katkıda bulunduğunu belirlemiştir.

1.7.2.1.3. F9 fimbria

Klinik hastalık oluşturmadan ruminantlarda kolonize olan *E. coli* O157:H7 serotipindeki ve diğer EHEC'lerdeki kolonizasyonu etkileyen genlerin araştırıldığı mutagenez çalışmalarında (Dziva ve ark., 2004; Diemen ve ark., 2005) adezyon faktörü olduğu varsayılan fimbrial bir operon tespit edilmiştir. Low ve ark. (2006), *E. coli* O157:H7 EDL 933 suşunda kromozomal yerleşimli F9 operonunu tanımlamışlardır. F9 operonunun, 1-2 μm uzunluğunda, sığır epitelyum hücrelerine ve sığır ECM proteinlerinden fibronektine bağlanabilen çok sayıda fimbria kodladığını ve fimbriaların rektum tropizmine değil ancak kolonizasyon miktarına etkisi olabileceği rapor edilmiştir (Low ve ark., 2006).

1.7.2.1.4. *E. coli* YcbQ laminine bağlanan fimbria (Elf - *E. coli* YcbQ laminin binding fimbria)

STEC O157:H7'de elastiki, düzgün kenarlı ve peritrik karakterde bir başka fimbria ise Elf'tir. *ycbQRST (elfADCG)* operonunda yer alan, *ycbQ*(*elfA*) geni tarafından kodlanan 18 kDa'luk protein olan Elf'in; ECM proteinlerinden laminine bağlanabilmesine karşın, fibronektin ve kollagen IV'e bağlanmadığı ve *elfA* mutantlarında bağırsak epitelyum adezyonunda % 60 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir (Samadder ve ark., 2009). Henüz bu genin regülasyonunun nasıl olduğu ve hangi durumlarda eksprese edildiği bildirilmemiştir.

1.7.2.1.5. Enterohemorajik *E. coli* ototransportörleri A, B ve J (EhaA, EhaB ve EhaJ - EHEC autotransporters)

Bakterilerdeki tip-V sekresyon sistemine dahil olarak salgılanan ototransportörler, çeşitli Gram-negatif bakterilerde çeşitli fonksiyonlarla tanımlanmıştır (Henderson ve ark., 2004). Ototransportörler, bakteriyel membrandan geçmelerini, konak hücreye bağlanmalarını, konak hücre içine translokasyonlarını ve hücre içine aktarıldıklarındaki etkilerini sağlayan korunmuş aminoasit motiflerine sahiplerdir (Henderson ve ark., 2004). Bu motiflerin varlığını model olarak alıp araştıran Wells ve ark. (2008), EhaA, EhaB, EhaC ve EhaD proteinlerini tanımlanmıştır. Laboratuvar suşuna klonlanan EhaA'nın, büyük hücre agregatlarına neden olduğu, biyofilm oluşumunu desteklediği ve sığır terminal rektum primer hücre sırasına adezyonu arttırdığı bildirilmiştir (Wells ve ark., 2008). Bir diğer çalışmada Wells ve ark, (2009), EhaB'nin ECM proteinlerinden kollagen I ve laminine adezyonda görev aldığını, sığır IgA'ları ile çapraz reaksiyon vererek, konakta IgA immun yanıtı oluşturduğunu belirlemiştir. EhaJ'nin ise ECM proteinlerine bağlanmaya ve biyofilm oluşumuna etkisi bulunduğu fakat incelenen EHEC suşlarında EhaA (% 97), EhaD (% 93) ototransportörlerine göre daha az oranda (% 27) saptanmıştır (Easton ve ark., 2011).

1.7.2.1.6. *E. coli* serin proteazı ve ip-benzeri fiberler (EspP - *E. coli* serine protease)

E. coli O157:H7'nin büyük pO157 plazmidinde, 3 900 bp'lik bir açık okuma çerçevesinden kodlanan, tip-V sekresyon yoluyla salgılanarak, pepsin A ve insan koagülasyon faktörü V'i parçalayabilen EspP'nin, HC'de kanamanın durmamasında rolü olabileceği ifade edilmiştir (Brunder ve ark., 1997). *espP* mutasyon çalışmaları ile buzağılarda kolonizasyonun ve sığır primer bağırsak epitelyum hücrelerine

adezyonun arttığı bildirilmiştir (Dziva ve ark., 2007). Dahası, salgılanan EspP proteinlerinin bir araya oligomerize olarak; konak epitelyum hücrelerine adeziv ve sitopatik aktiviteleri olan, biyofilm oluşumuna katkıda bulunan, bir yandan bakteriyi çeşitli antimikrobiyel bileşiklerden koruyan ip-benzeri megayapılar (> 1 cm) oluşturdukları bildirilmiştir (Xicohtencatl-Cortes ve ark., 2010).

1.7.2.1.7. Flagella H7 ($FliC_{H7}$)

Flagella veya flagellin proteinin *E. coli* O157:H7 bağlanması ve bağırsak kolonizasyonundaki rolüne ilişkin çalışmalar 1980'li yıllarda başlamıştır (Sherman ve Soni, 1988). EPEC patotipinde H6 flagella, epitelyum hücrelerine adezyonla ilişkilendirilmektedir (Giron ve ark., 2002). H7 flagellanın adeziv özellikleri ve *E. coli* O157:H7'nin, sığır mukus, müsin (I ve II) ve ECM proteinlerine bağlanma yeteneği incelenmiştir (Erdem ve ark., 2007). Araştırmacılar, flagellanın müsin ve taze mukusa bağlanmayı arttırdığını bildirerek, H7 mutantlarında adezyonun belirgin şekilde azaldığını gözlemlemiştir. *E. coli* O157:H7'deki H7 flagellanın, sığır terminal rektum primer epitelyum hücre kültürü ile ilişkisi sırasındaki ekspresyonunun ve adezin fonksiyonunun incelendiği bir çalışmada; $fliC_{H7}$ mutantlarında ve H7 flagelline karşı antikor varlığında adezyonun azaldığı, flagellanın epitelyumla fiziksel olarak ilişki içine girebildiği ve terminal rektum kolonizasyonununda H6'nın değil ancak H7 flagellanın etkili olduğu belirlenmiştir (Mahajan ve ark., 2009). Best ve ark. (2005), spesifik-patojen-ari civcivlerde kolonizasyonun devamlılığı için H7 flagellanın önemli olduğunu rapor etmiştir. Diğer yandan Almanya'da şekillenen HUS olgularının % 40'ından hareketsiz *E. coli* O157:NM'nin sorumlu olması ise, insanlardaki EHEC patogenezinde flagellanın esansiyel olmadığını düşündürmektedir (Farfan ve Torres, 2012).

H7 flagellinin epitelyum barındıran insan kolon zenograftlarının lümenine inokülasyonu, proinflamatör kemokinlerin ekspresyonlarını arttırarak, epitelyum altı nötrofil birikimine sebep olmuştur. Bu durum, H7'nin, asıl proinflamatör kemokin

uyarıcısı olarak görev aldığı şeklinde değerlendirilmiştir (Miyamoto ve ark., 2006). İnsan infeksiyonlarında, H7 flagellanın adezyonda önemli rol oynayıp oynamadığı hala tam olarak açıklığa kavuşmamış olmakla beraber, H7 flagellanın inflamasyon gelişimindeki rolü göz ardı edilmemektedir (Jandhyala ve ark., 2010).

1.7.2.1.8. Paa (Porcine attaching-effacing associated) adezin

E. coli O157:H7 suşlarıyla % 100 homoloji gösteren, hücre yüzeyi yerleşimli, 27.6 kDa'luk bir protein kodlayan, 753 bp'lik kromozomal yerleşimli *paa*, ilk kez domuz kaynaklı EPEC (PEPEC) suşunda transpozon mutagenezi ile tanımlanmıştır (An ve ark., 1999; Batisson ve ark., 2003). *paa*'nın *eae*-barındıran *E. coli* O157:H7 suşlarında da yüksek oranda bulunmuş olması, AE lezyonları oluşumunda etkisi olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (An ve ark., 1999). Nitekim Batisson ve ark. (2003), *eae*-pozitif ancak *paa*-negatif PEPEC O45 mutantlarının AE lezyonu geliştirmediğini ve bu suşlara *paa*'nın klonlanmasıyla AE lezyonlarının oluştuğunu bildirmişlerdir. Henüz Paa adezinin, fonksiyonu tam olarak ortaya konulmamakla birlikte başka *E. coli* patotiplerinde (ETEC) de belirlenmiştir (Leclerc ve ark., 2007).

1.7.2.1.9. IrgA homoloğu adezin (Iha - IrgA homologue adesin)

Tarr ve ark. (2000), *E. coli* O157:H7 DNA kozmid kütüphanesini tarayarak, daha önce *Vibrio cholerae*'da virülens faktörü olarak belirlenen siderefor reseptörü IrgA (Iron-regulated gene A) proteinine (Goldberg ve ark., 1992) oldukça benzeyen ve HeLa hücrelerine diffüz aderenz özelliği kazandıran proteini kodlayan kromozomal yerleşimli geni belirleyerek, Iha olarak tanımlamışlardır. Inokule sığır dışkı izolatı *E. coli* O157:H7'lerde, infekte çocuk dışkılarından elde edilen izolatlardan daha fazla

eksprese edildiği gösterilen 78 kDa'luk bu protein (Rashid ve ark., 2006a), *fur* lokusu kontrolü altında demir varlığında baskılanmaktadır (Rashid ve ark., 2006b). Üropatojenik *E. coli*'lerde de siderefor reseptör aktivitesi gösterilerek (Leveille ve ark., 2006), insan (n=12), sığır (n=3) ve gıda (n=7) orijinli suşların hepsinde bulunmuştur (Toma ve ark., 2004).

1.7.2.1.10. Dış membran porini A (OmpA - Outer membrane porin A)

Torres ve Kaper (2003), kanamisin transpozonu ile elde ettikleri *E. coli* O157:H7 mutantlarından birinin (regülatör *tdcA* geni mutantı), HeLa hücrelerine hiperaderent olduğunu belirlemiştir. Araştırmacılar bu hiperaderent mutantın, artmış OmpA ekspresyonu gösterdiğini tespit ederek, OmpA'ya karşı geliştirilen serumlarla, hem hiperaderent mutantı hem de diğer klinik izolatların adezyonlarında azalma olduğunu saptamıştır. Farklı *E. coli* suşlarında konjügasyon mediyatörü, faj reseptörü ve porin özellikleri gösterilen OmpA, *E. coli* O157:H7 serotipinin patogenezinde dendritik hücrelerin aktivasyonunda da rol almaktadır (Torres ve ark., 2006).

1.7.2.1.11. EHEC aderenz faktörü (Efa1 - EHEC factor for adherence) ve ToxB

Nicholls ve ark. (2000), O111:H$^-$ EHEC suşuyla yaptıkları mutasyon çalışmasıyla, *in vitro* adezyon için gerekli olan 9 669 kb'lık bir kromozomal lokusu, *efa1*'i, tanımlamışlardır. Araştırmacılar *efa1* mutantlarıyla *in vitro* adezyonda 7 kat azalma olduğunu belirleyerek, 207 farklı sero/pato-tipte varlığını araştırmış ve inceledikleri tüm O157:H7 serotiplerinde *efa1* geninini belirlemişlerdir. *efa1*'in STEC O5 ve O111 serotiplerinde, buzağılardaki kolonizasyona ve patogeneze etkisi olduğu

gözlemlenmiştir (Stevens ve ark., 2002). *E. coli* O157:H7 suşlarında buzağı ve koyunlarda kolonizasyonu etkilemediği ancak konak-bakteri arasındaki ilişkide önemli rol oynayan EspD'yi postranskripsiyonel olarak azalttığı bildirilmiştir (Stevens ve ark., 2004). Diğer yandan Efa1, EHEC'lerin büyük pO157 plazmidinde virülens faktörü olarak tanımlanan ToxB (Tatsuno ve ark., 2001) ve EPEC'lerde tanımlanan, insan ve farelerde, bölgesel lenfosit aktivasyonunu inhibe edici lenfosit inhibitörik faktör A (LifA) ile homoloji paylaşmaktadır (Klapproth ve ark., 2000). Tatsuno ve ark. (2001) O157:H7 suşlarında oluşturdukları pO157 *toxB* ve kromozomal *efa1* parçası transpozon mutantları ile hem HeLa hücrelerine adezyonun arttığını, hem de bunun LEE patojenite adası kaynaklı tip-III salgılanan proteinlerdeki (EspA, EspB) artıştan ileri gelebileceğini ifade etmiştir.

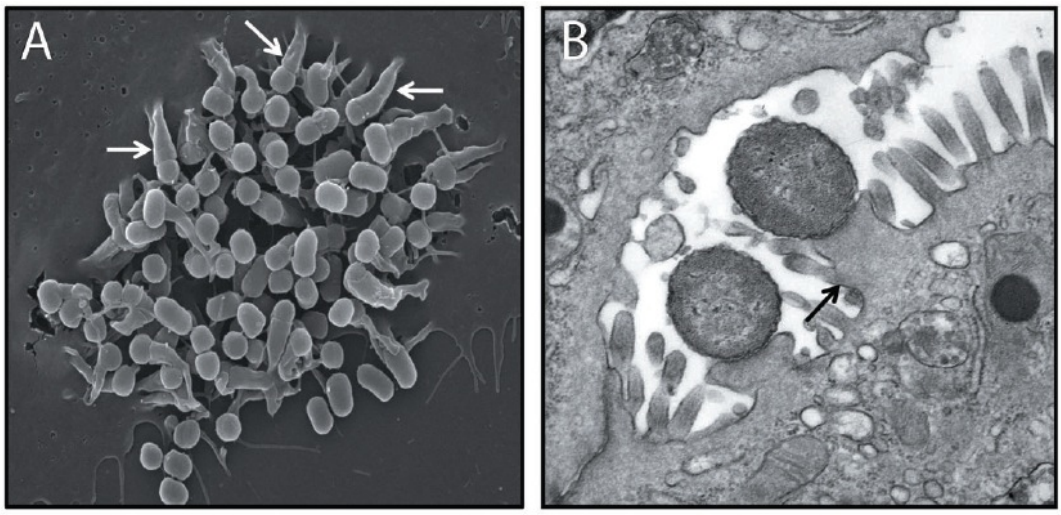
1.7.2.1.12. Sorbitol pozitif fimbria (Spf - Sorbitol positive fimbria)

EHEC suşlarında bildirilen tip-IV fimbria, *E. coli* O157:H7 ile aynı klonal atadan (O55:H7) köken aldığı düşünülen (Feng ve ark., 1998) SF *E. coli* O157:H$^-$ suşlarından kodlanan büyük bir plasmidin bir bölümünde yer alır. İnsan ve sığır kaynaklı hareketsiz ve SF O157'lerde adezyonda önemli rol oynayan Spf, henüz *E. coli* O157:H7 suşlarında bildirilmemiştir (Bardiau ve ark., 2010).

1.7.2.2. Sıkı Adezyon ve LEE Patojenite Adası

LEE patojenite adası, epiteliyal sinyal-iletim yolaklarının aktivasyonu ve bakteri ile enterositler arasındaki yakın ilişkiden sorumlu genleri barındırmaktadır. Bu genler ayrıca, enterositlerde mikrovillus (brush borders) yapılarının kaybolması ve pedestal (ayak) oluşumlarıyla karakterize, "bağlanma ve bozma" (AE, [Moon ve ark., 1983])

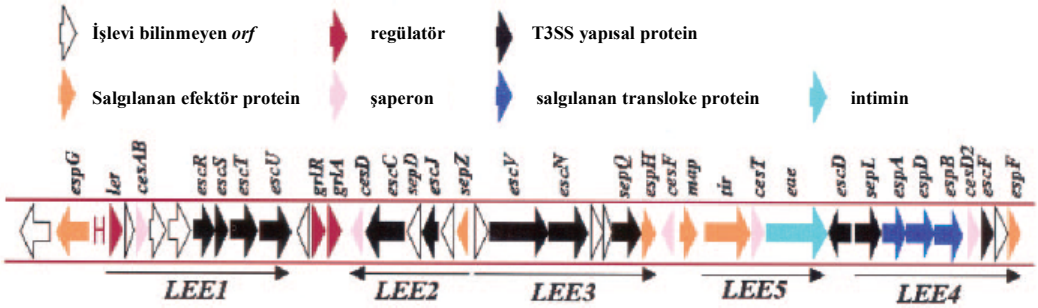
(Şekil 1.4) lezyonlarının şekillenerek, konak hücre iskeletinin değişmesinde kilit rol oynayan proteinleri kodlamaktadır. Bu patojenite adasının ürünleri; tip-III sekresyon aparatını, aparatla konak arasındaki köprüyü, köprünün konak hücredeki ayağını ve aktarıldığında konak hücrede çeşitli etkiler oluşturan, LEE patojenite adası veya ada dışı genlerden kodlanan efektör proteinleri ve bu proteinlerin şaperonlarını kapsar. Yeterli pişirilmemiş kontamine hamburger kaynaklı HC olgusundan elde edilen *E. coli* O157:H7 EDL 933 suşundan sekanslanan; 43.3 kb büyüklüğündeki kromozomal yerleşimli, 54 açık okuma çerçevesi içeren LEE, başlıca 5 polisistronik operonun (*LEE1-4*, *tir*) kontrolündedir ve EPEC suşu *E. coli* E2348/69 LEE'siyle % 95 homoloji paylaşır (Şekil 1.5) (Elliott ve ark., 1998; Perna ve ark., 1998; Crawford ve ark., 2002).



Şekil 1.4. Pedestal (oklar) oluşumlarının SEM (A) ve TEM (B) görüntüleri (Wong ve ark., 2011).

LEE patojenite adasında *tir* operonundan kodlanan *eae* (*E. coli* attaching and effacing), patojenle konak epitelyum hücreleri arasında yakın ilişkiden sorumlu hücre yüzey proteini intimini kodlar (Jerse ve ark., 1990). Yine aynı operonda yer alan *tir* geni ise T3SS ile memeli hücresine aktarılarak intimin için reseptör görevi gören Tir (translocated intimin receptor) proteinini kodlar (Kenny ve ark., 1997). *LEE4* operonunda yer alan *espA* (*E. coli* secreted protein) (Kenny ve ark., 1996), *espB* (Donnenberg ve ark., 1993) ve *espD* (Lai ve ark., 1997) genleri, efektör

proteinlerin konağa aktarımında rol alan proteinleri (sırasıyla; EspA, EspB ve EspD) kodlar. LEE patojenite adası içinden ve dışından (profaj) kodlanan efektör proteinlerin hepsi, *LEE1-3* operonlarından kodlanan *esc/sep* (*E. coli* secretion/secretion of *E. coli* proteins) gen ürünlerinin oluşturduğu T3SS'den, sekresyon sinyal dizilerine ihtiyaç olmaksızın salgılanırlar (Jarvis ve ark., 1995). Tir (Abe ve ark., 1999), EspB ve EspD'nin (Wainwright ve Kaper, 1998) stabil sekresyonları için *ces* (chaperone of *E. coli* secreted protein) genlerinden kodlanan şaperonlara ihtiyaç vardır. Castillo ve ark. (2005), yaptıkları genomik analizler sonucunda, T3SS'nin bir çok *E. coli* için korunmuş bir yapıya sahip olduğunu ve horizontal gen transferi ile aktarılmış olabileceğini, ancak yanındaki sekresyon proteinlerinin dahil olduğu gen gruplarının evrimsel süreçte rekombinasyon, seleksiyon ve mutasyon gibi olgularla şimdiki halini almış olduğunu ifade etmiştir.

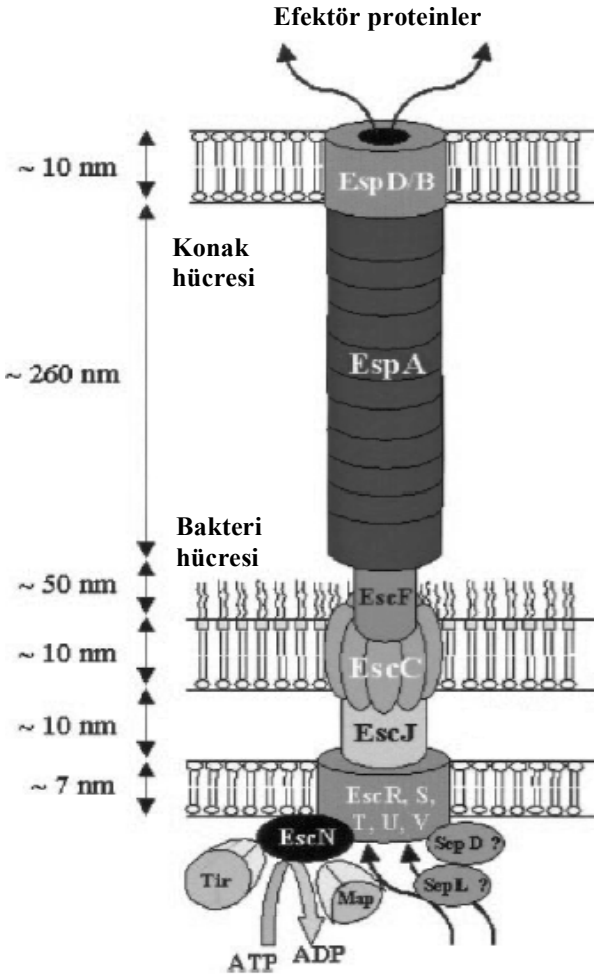


Şekil 1.5. LEE patojenite adası. Başlıca operonlar (*LEE1-4*, 5:*tir*) gösterilmiştir. *esc/sep* tip-III sekresyon aparatını, *esp* salgılanan proteinleri, *ces* tip-III sekresyon sistemi şaperon proteinlerini kodlar (Garmendia ve ark., 2005).

1.7.2.2.1. Tip-III sekresyon sistemi (T3SS)

Birçok Gram negatif patojende bulunan ve virülens faktörlerinin konak hücreye bir basamakta aktarılmasını sağlayan bu filamentöz iğne kompleksi, patojen için en uygun zamanda eksprese edilerek, bakteri membranındaki tabanından, konak

hücredeki ucuna kadar basamak, basamak polimerize olarak şekillendirilir (Garmendia ve ark., 2005). T3SS'de görev alan başlıca proteinler Şekil 1.6'da gösterilmiştir. Enterohemorajik *E. coli* O157:H7 T3SS'nin en önemli karakteristiği, ardarda polimerize olarak T3SS bazalından uzatılan EspA proteinlerinin oluşturduğu kanal (Knutton ve ark., 1998) ve bu kanalın konakta por oluşturan EspB/D şapkasıdır (Ebel ve ark., 1998; Kresse ve ark., 1999).



Şekil 1.6. EPEC/EHEC tip-III sekresyon aparatının şematik görüntüsü. İç membran proteinleri EscR, EscS, EscT, EscU ve EscV; iç membran halkasal proteinleri dış membran halkasal proteinleri EscC'ye bağlayan lipoprotein EscJ; iğne-benzeri yapıda EscF ve buradan başlayarak polimerize olan EspA fragmanları; konak hücre plazma membranında translokasyon porunu oluşturan EspB ve EspD; ATP hidrolizasyonuyla enerji sağlayan EscN ve T3SS hücre içi komponentleri SepD ve SepL (Garmendia ve ark., 2005).

LEE ekspresyonu öncelikle T3SS'nin yapılandırılmasıyla başlar. Başlıca, ilk açık okuma çerçevesi Ler (LEE encoded regulator) (Mellies ve ark., 1999) ve Ler tarafından pozitif regüle edilen GrlA (Global regulator of LEE activator) ve GrlR (Global regulator of LEE repressor)'nin kontrolü altındadır. LEE regülasyonu sıcaklık, pH, ozmolarite, gelişme fazı (durağan fazda RpoS kontrolü, σ^s), bikarbonat, fosfat, sülfat veya konak hormonları (epinefrin/norepinefrin) varlığı, DNA hasarı

sonucu şekillenen SOS yanıtı, quorum sensing (QseA-C, QseE-G) ve horizontal olarak elde edilen regülatörler (plazmidden-kodlanan regülatör [PchA-C]) gibi birçok çevresel ve genetik faktörün etkisindedir (Anand ve Griffiths, 2003; Laaberki ve ark., 2006; Tree ve ark., 2009; Kendall ve ark., 2011; Njoroge ve Sperandio, 2011).

1.7.2.2.2. Transloke intimin reseptörü (Tir - Translocated intimin receptor)

T3SS-kontrolünde gelişen patogenezin merkezinde, konak hücre-aktin sitoiskeletinin tahribi yer almaktadır. Burada, T3SS ile konak hücreye aktarıldıktan sonra, plazma membranına entegre olarak, açıkta bıraktığı 55 amino asitlik bölgesiyle bakteri dış membran adezini "intimin" için reseptör görevi gören Tir, kilit rolü oynamaktadır (Kenny ve ark., 1997). İntimin-Tir bağlanmasını takiben aşağı doğru ilerleyen, konak tirozin kinazlarının da dahil olduğu bir dizi sinyalizasyon olayıyla aktinden zengin pedestallar şekillenmektedir (Campellone ve ark., 2004) (Şekil 1.4). Sadece EHEC'lerde, bu sinyalizasyon olaylarının amplifikasyonunda TccP/EspFu (Tir cytoskeleton coupling protein - Tir sitoiskelet gruplama proteini) görev almaktadır. AE lezyonlarının gelişimi için Tir esansiyel rol oynarken, tavşan ve gnotobiyotik domuz yavrularında TccP/EspFu, kolonizasyonun etkinliğini arttırmasına karşın esansiyel rol oynamamaktadır (Wong ve ark., 2011).

1.7.2.2.3. İntimin, *E. coli* bağlanma ve bozma (*eae* - *E. coli* attaching and effacing)

AE lezyonlarının gelişiminde, 94-97 kDa'luk bir dış membran proteini olan intimin ise anahtar rolü oynamaktadır (Jerse ve ark., 1990). *Yersinia pseudotuberculosis*

invazini ile yüksek homoloji paylaşan intimin (Jerse ve ark., 1990), T3SS ile konak epitelyumuna aktarılan Tir'e bağlanarak, bakterinin konak epitelyumuna sıkı adezyonunu sağlamaktadır. Buzağılarda kolonizasyonun ve enteropatojenitenin gelişebilmesi için intiminin kaçınılmaz olduğu gösterilmiştir (Dean-Nystrom ve ark., 1998).

İntimin, aynı zamanda ökaryotik reseptörlere de bağlanabilmektedir. Saflaştırılmış intimin, C-terminalindeki 280 amino asitlik hücreye-bağlanma aktivitesi gösteren bölüm ile HEp-2 hücrelerine bağlanır (Frankel ve ark., 1995). Çeşitli insan ve hayvan kaynaklı STEC ve EPEC'lerde bu 280 amino asitlik bölümdeki farklılıktan ileri gelen en az 17 (α1, α2, β1, β2, γ1, γ2/θ, δ/κ, ε, ζ, η, η2, ι, λ, μ, ν, ξ, o) intimin tipi (varyantı) tanımlanmıştır (Adu-Bobie ve ark., 1998; Oswald ve ark., 2000; Tarr ve Whittam, 2002; Zhang ve ark., 2002b; Jores ve ark., 2003; Garrido ve ark., 2006). EPEC suşunda α-intimin'in ökaryotik β_1-integrine (Frankel ve ark., 1996), *E. coli* O157:H7 suşlarında eksprese edilen γ-intiminin (Adu-Bobie ve ark., 1998) ise nükleoline bağlanabildiği (Sinclair ve O'Brien, 2002) *tir* mutantlarında gösterilmiştir. *E. coli* O157:H7 ile infeksiyonlarda AE lezyonları şekillenen domuz yavruları, buzağı ve fareleri model olarak alan Sinclair ve ark. (2006), üç hayvan türünde de AE lezyonlarının şekillendiği yerde, patojenin hemen altında immun boyanan Tir'i ve patojene oldukça yakın kümelenen nükleonini tespit etmiştir.

Öte yandan, eae_{O157}'nin EPEC *eae*'si ile değiştirilmesiyle, deneysel olarak infekte edilen gnotobiyotik domuz yavrularında kolonizasyonun kolondan ince bağırsaklara kaydığı, dolayısıyla intiminin kolonizasyon bölgesine etkisi olabileceği ifade edilmiştir (Tzipori ve ark., 1995). *In vitro* organ kültürü ile *E. coli* O157:H7'nin insanlardaki infeksiyonlarında, distal ileumdaki Peyer plaklarındaki follikül-ilişkili epitelyuma olan afinitesinin gösterilmesinin ardından (Phillips ve ark., 2000), Fitzhenry ve ark. (2002); γ-intimin mutantı *E. coli* O157:H7'lerin insan bağırsak eksplantlarının *in vitro* kültürlerinde kolonizasyon oluşturamadığını, α-intimin ile tamamlanan mutant suşun kolonizasyonunun ise, Peyer plaklarının yanı sıra ince bağırsakların proksimaline ve distaline genişlediğini göstererek, intimin varyantlarının kolonizasyonda etkinliği olduğunu bildirmiştir. İntimin

varyasyonunun kolonizasyon tropizmini etkilediği başka çalışmalarla da desteklenmiştir (Chong ve ark., 2007; Mundy ve ark., 2007).

1.7.2.2.4. Efektör proteinler

T3SS'den konak epitelyum hücresine aktarılarak patojenin yararına etkiler oluşturan, LEE patojenite adası kaynaklı (Tir, Map, EspB, EspF, EspG, EspH vb.) ve genomda başka yerlerden (bir çoğu lambdoid fajlardan) eksprese edilen (EspFu/TccP, EspJ, EspK ve NleA/EspI vb.) en az 32 protein bulunduğu biyoinformatik, proteomiks ve translokasyon deneyleri sonucunda bildirilmiştir (Tobe ve ark., 2006). Gerek LEE kaynaklı, gerek LEE dışından (Nle - Non LEE encoded) kodlanan efektörler çok çeşitli etkilere sahiplerdir. Hücre döngüsünün etkilenmesi, fagositozdan korunma, inflamasyon ve apoptozis modülasyonu ve pedestal oluşumunun kaynağı aktin üstüne etkiler, efektörlerin başlıca etki şekilleridir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. *E. coli* O157:H7 Sakai suşu için tanımlanan efektör proteinler ve başlıca görevleri (Wong ve ark., 2011).

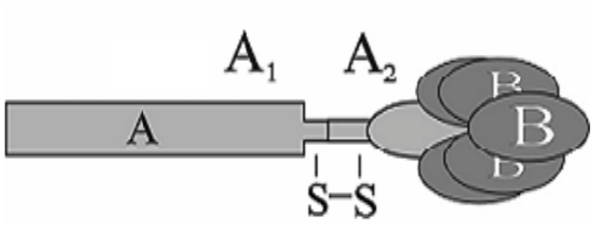
T3SS efektör	Hücrede yerleşimi [1, 2]	Fonksiyon[3]
LEE'den kodlanan		
EspB	Sitozol, HM	Translokonun por parçası, SB bozulması, fagositozun engellenmesi
Tir	HM	İntimin adezyonu için reseptör, aktin pedestal oluşumu, Map ilişkili filipodianın aşağı regülasyonu
EspF	Mitokondri, sitozol, nükleus, SB, apikal membran, lateral membran	Mitokondri, nükleolus ve SB bozulması, membranın yeniden yapılandırılması, fagositozun baskılanması
Map	Mitokondri	Geçici filopodia oluşumu uyarımı, mitokondri ve SB bozulması
EspG	Sitozol, golgi	Mikrotübüllerin bozulması, hücre membran içi trafiğin inhibisyonu
EspH	HM, pedestal	Sinyal mekanizmasının bozulması, fagositozun engellenmesi, aktin pedestal boyunun uzatılması
EspZ	HM	Apoptoz ve hücresel sitotoksikasyonun engellenmesi
LEE dışından kodlanan		
EspI/NleA	Golgi, HM	Hücre içi protein transportunun baskılanması, SB bozulması
EspJ	Sitozol, mitokondri	Fagositozun engellenmesi
EspK	Bilinmemekte	Bilinmemekte
EspL	Pedestal	Aderenzin arttırılması
EspM	Sitozol	Stres fiberlerinin indüklenmesi
EspN	Bilinmemekte	Bilinmemekte
EspO	Bilinmemekte	Bilinmemekte
EspR	Bilinmemekte	Bilinmemekte
EspV	Sitozol	Sitoiskeletin değiştirilmesi
EspW	Bilinmemekte	Bilinmemekte
EspX	Bilinmemekte	Bilinmemekte
EspY	Bilinmemekte	Bilinmemekte
NleB	Sitozol	Transkripsiyon faktörü inhibisyonu (NF-κB)
NleC	Sitozol, nükleus	Transkripsiyon faktörü inhibisyonu (NF-κB)
NleD	Sitozol	Transkripsiyon faktörü inhibisiyonu (AP-1 aktivatör)
NleE	Sitozol	Transkripsiyon faktörü inhibisyonu (NF-κB)
NleF	Bilinmemekte	Bilinmemekte
NleG/NleI	Sitozol	Hücre içi protein kalite kontrolü proteini (E3 ubiquitin)
NleH	ER, HM, Sitozol	Apoptozisin ve sinyalizasyonun (NF-κB) inhibisyonu
Tccp/EspFu	Sitozol	Aktin pedestal oluşumunun tetiklenmesi

[1] Hücre membranı, , [2] Endoplazmik retikulum, [3] Sıkı bağlantı.

1.7.3. Shiga Toksin (Stx) (Verositotoksin [Vtx], Shiga-benzeri Toksin [Slt])

Shiga toksin (Stx), *Shigella dysenteriae* ve bazı *E. coli* suşları gibi *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinin yanı sıra, *Acinetobacter* spp., *Enterobacter cloacae* ve *Aeromonas hymophilus* gibi çeşitli bakteriler tarafından da üretilen bakteriyel bir ekzotoksindir (Doughari ve ark., 2009). STEC'in en kritik virülens faktörü, bitkisel bir toksin olan risin ile benzer etkinlikteki Shiga toksin olup, birbirinden farklı ancak benzer etkinlikte iki antijenik tipi (Stx1 ve Stx2) tanımlanmıştır (Strockbine ve ark., 1986). Stx1 oldukça iyi korunan bir yapıdadır ve *S. dysenteriae* tip 1'in Shiga toksini ile hemen hemen aynıdır (Takao ve ark., 1988).

Bütün Stx molekülleri (70 kDa), birbirine disülfid bağı ile bağlanan iki fragmanın (A1 [27.5 kDa] ve A2 [7.5 kDa]) oluşturduğu bir A alt ünitesinin (~32 kDa), glikolipid yapısında pentamer B alt üniteleri (~7.7 kDa) ile nonkovalent ilişkisinden şekillenen heterohekzomer (AB_5) yapısındadır (O'Brien ve Holmes, 1987) (Şekil 1.7). Katalitik aktivitesi olan A1 fragmanının, A2 fragmanından ayrılabilmesi için, A alt ünitesinin proteolitik olarak yıkımlanması ve ardından indirgenmesi gerekir (O'Brien ve Holmes, 1987). Aksiyon mekanizmaları aynı olmasına karşın, Stx1 ve Stx2 A alt üniteleri % 55 oranında amino asit dizi benzerliği gösterir (Gyles, 2007).



Şekil 1.7. Shiga toksinin şematik yapısı. Aktif olan A1 fragmanı disülfid bağı (S-S) ile A2 fragmanıyla bir arada tutulur (Doughari ve ark., 2009).

Shiga toksinler, *E. coli* suşlarının genomlarında, ekspresyonları baskı altında tutulan (represe), mobil genetik eleman olarak sınıflandırılan ve Shiga toksin kodlayabilen fonksiyonel veya defektif lambdoid profajlardan eksprese edilir (Neely

ve Friedman, 1998; Karch ve ark., 1999; Plunkett ve ark., 1999; Wagner ve ark., 2001b; Wagner ve ark., 2002). *E. coli*'de DNA hasarı şekillenmesi ile tetiklenen SOS yanıtı, RecA-ilişkili olarak lizojeninin sürmesini sağlayan cI represörünün otoproteolizine neden olur. Represörün yıkımlanması ile öncü-erken genlerden N antiterminatör proteini eksprese olur. N proteini etkinliğinde profajın replikasyonu ve kesilerek konak DNA'dan ayrılmasında yer alan etkin geç-erken genlerin ekspresyonu sağlanır (Weaver, 2005). Bu geç-erken gen ürünlerinden bir diğeri olan Q antiterminatör proteini, lizis genleri ile hemen bu genlerin -3' yanında bulunan *stx* genlerinin de olduğu geç genlerin ekspresyonuna imkan sağlar (Neely ve Friedman, 1998; Plunkett ve ark., 1999). Sekans analizleri ile incelenen tüm lambdoid profajlarda *stx* geni, profaj replikasyonu-ilişkili *O* ve *P* genlerini takip eden -3' uçtaki geç faz bölgesinde bulunmuştur (Neely ve Friedman, 1998; Karch ve ark., 1999; Plunkett ve ark., 1999). Bu durum, *stx* ekspresyonunun kontrolünün, faj replikasyonunda görev alan genlerin promotorları tarafından sağlandığı varsayımını güçlendirmektedir (Herold ve ark., 2004). Ayrıca *stx*, *stx* varyantları ve bu genlerin yanında bulunan bölgelerin PCR ile çoğaltılarak sekans analizinin yapıldığı kombine çalışmalarda, analiz edilen bölgeler heterojenite gösterse dahi profajların yerleşim olarak aynı bölgede olduğu bildirilmiştir (Unkmeir ve Schmidt, 2000; Recktenwald ve Schmidt, 2002). Her ne kadar profaj indüksiyonu, Stx ekspresyonlarını arttırsa da, Stx1'in ekspresyonunun artmasında önemli bir başka mekanizma da *stx1* geninin 5' başında bulunan aktif bir promotordan ileri gelmektedir. Düşük demir konsantrasyonunda aktive olan kromozomal *fur* (ferric uptake regülator - demir alımı regülatörü) lokusu ürünü Fur, bu promotor üzerinden Stx1 ekspresyonunu arttırmaktadır (Calderwood ve Mekalanos, 1987; Wagner ve ark., 2002).

Bu genetik düzen ile çeşitli etkiler sonucu profajların indüksiyonu, tedavide izlenecek yol açısından sorun oluşturmaktadır. Çeşitli antimikrobiyellerin düşük dozlarına maruz kalan *E. coli* O157 suşlarından salınan Shiga toksin miktarlarının incelendiği bir çalışmada, trimetoprim ve siprofloksasinin, incelenen diğer antimikrobiyellere oranla daha kuvvetli profaj indükleyicileri olarak bildirilmiştir (Grif ve ark., 1998). Wong ve ark. (2000), *E. coli* O157:H7 infeksiyonu tedavisinde antimikrobiyel kullanımının, çocuklarda HUS gelişimi riskini kayda değer ölçüde arttırdığını bildirmiştir. Gnotobiyotik domuz yavrularıyla oluşturulan bir modelde,

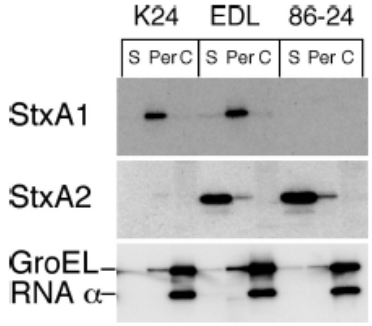
azitromisin kullanılan yavruların *E. coli* O157:H7 infeksiyonundan düşük seviyede komplikasyonlarla kurtulduğu, siprofloksasin kullanılan yavrularda tümünün öldüğünü ve ağır serebellar hemorajilerin şekillendiği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2009). Farklı sınıftan antimikrobiyel ajanların Stx üretimine olan etkinliğinin araştırıldığı bir başka çalışmada, siprofloksasin veya trimetoprim-sulfametoksazol gibi DNA sentezini hedef alan ve *stx* translasyonuna fırsat veren ajanların subinhibitörik konsantrasyonlarının, Stx üretimini arttırdığı; hücre duvarı, transkripsiyon veya translasyon gibi yapı veya aşamaları hedef alan ajanların ise Stx üretimini arttırmadığı ifade edilmiştir (McGannon ve ark., 2010). Aynı araştırmacılar bir yandan, bağırsakta *stx*-kodlayan bakteriyofaj infeksiyonlarına duyarlı başka *E. coli* suşlarının varlığının araştırılmasının da tedavinin etkinliği açısından önemli olabileceğini ifade etmiştir. Nitekim profajların indüksiyonu sonucu serbest kalan progeni fajlar ile *in vivo* ve *in vitro* transdüksiyon gerçekleşebileceği, dolayısıyla yatay gen aktarımı ile yeni STEC'lerin ortaya çıkmasına katkısı olduğu ifade edilmektedir (Schmidt, 2001). Bu fenomenin gerçekleşebildiği, koyun ve çocuk kaynaklı suşlarda *in vitro* olarak gösterilmiştir (Mellmann ve ark., 2008; Döpfer ve ark., 2010). Öte yandan Rahal ve ark. (2011), BALB/c farelerinin *E. coli* O157:H7 infeksiyonunda, Shiga toksin kodlayan genlerin transkripsiyonlarının azaltılabildiği ve farelerin canlı kalım oranının yükseldiği, tedavide seçenek olabilecek, minimum inhibitörik konsantrasyonda rifampisini takiben, minimum bakterisidal konsantrasyonda gentamisin uygulamasının etkinliğinden bahsetmişlerdir.

Profajlar, UV, mitomisin C ve antimikrobiyel ajanların yanı sıra; gıda ambalajlanmasında kullanılan yüksek hidrostatik basınç (Aertsen ve ark., 2005) veya H_2O_2 (Los ve ark., 2009; Los ve ark., 2010), NaCl (Los ve ark., 2009), özellikle Stx1 için düşük çevresel demir konsantrasyonu (Calderwood ve Mekalanos, 1987; Wagner ve ark., 2002), insan nötrofilleri ve ürünleri (Wagner ve ark., 2001a) ile farklı suşlarda farklı düzeylerde spontane olarak da (Livny ve Friedman, 2004) indüklenebilmektedir. Ancak, infekte mukozanın doğal bağışıklık mediyatörlerinden nitrik oksidin, Stx üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Vareille ve ark., 2007).

Stx1 ve Stx2'nin moleküler yapıları birbirine benzer olsa da (Jackson ve ark., 1987; Fraser ve ark., 2004), *E. coli*'deki hücresel dağılımları farklılık göstermektedir (Şekil 1.8). Bu farklılığa, stx_1 ve stx_2 için sırasıyla, düşük demir konsantrasyonu ve

profaj indüksiyonuyla aktive olan promotorların katkısı olabileceği ifade edilmektedir (Shimizu ve ark., 2009).

Shimizu ve ark. (2009) geliştirdikleri çeşitli mutant suşlarla yaptıkları çalışmalarla; (*i*) stx_1 ve stx_2 pozitif EHEC'lerde mitomisin C ile profaj indüksiyonunda Stx2 üretiminin arttığını, ancak incelen stx_1 pozitif suşlardan sadece % 5'inde etkin bir Stx1 artışı olduğunu, (*ii*) mitomisin C ile profaj indüksiyonunun Stx1 üretimine çok az katkısı olduğunu, (*iii*) profaj indüksiyonu olmayan koşullarda, spontane Stx2-kodlayan profaj indüksiyonu ile faj-ilişkili lizisin, spesifik Stx2 sekresyonuna yol açtığını ve bu durumda da Stx1'in popülasyondaki hücrelerin hücre-ilişkili fraksiyonlarında yer almaya devam ettiğini, (*iv*) Stx2-kodlayan faj-ilişkili lizis sisteminin süpernatant fraksiyona Stx sekresyonunda önemli olduğunu, dolayısıyla (*v*) Stx1-kodlayan profajın, stx_1 yanında bulunan demir-kontrolündeki Stx1 promotoru ile karakterizeyken, Stx2-kodlayan profajın spontane indüklenebilen faj ile karakterize olduğunu ortaya koymuştur. Daha önce Stx2'nin sekresyonunda, sekresyon-ilişkili bilgiyi B alt ünitesinin 31. pozisyonundaki serin amino asidinin taşıdığını ifade etmiş olan araştırmacılar (Shimizu ve ark., 2007), Stx2 sekresyonunda faj-lizisi dışında etkin bir başka mekanizma olduğunu da saptamışlardır (Shimizu ve ark., 2009).



Şekil 1.8. Shiga toksinlerin bulunduğu hücre fraksiyonları. Luria-Bertani brot 37°C'de geliştirilerek, S (süpernatant), Per (periplazma) ve C (sitoplazma) fraksiyonlarına ayrılan Stx1 (+) K24, Stx1/2 (+) EDL ve Stx2 (+) 86-24 suşlarının SDS-PAGE (Na-dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi) görüntüleri (Shimizu ve ark., 2009).

Shiga toksinlerin etki mekanizması, B alt ünitesinin etkinliğinde birçok ökaryotik hücre yüzeyinde bulunan ve distalinde galaktoz-α1-4-galaktoz-β1-4glikozseramid karbonhidrat dizisi içeren globotriosil seramid (Gb3, CD77) reseptörüne (Lingwood ve ark., 1987) bağlanarak, reseptör-ilişkili endositoz yoluyla hücre içine alınmalarını (Sandvig ve ark., 1989) takiben, sitozole geçen A1 alt ünitelerinin ökaryotik 28S rRNA'nın 4,324. bazını (adenin) *N*-glikozidaz aktiviteleri ile kesip (Endo ve ark., 1988), elongasyon faktörü-bağımlı aminoaçil t-RNA bağlanmasını ve dolayısıyla protein elongasyonunu inhibe etmelerinden ibarettir.

Gb3 yağ asidi heterojenitesi (Pelizzari ve ark., 1992), hidroksilasyonu (Binnigton ve ark., 2002), zincir uzunluğu ve doymuşluk düzeyi (Kiarash ve ark., 1994) ile plazma membranı kolesterol düzeyi Stx tanınmasında önemlidir. HUS şekillenen hastaların eritrosit Gb3'lerinin yüksek seviyede hidroksilli yağ asidi içerdiği tespit edilmiştir (Newburg ve ark., 1993). Stx, plazma membranındaki Gb3'e bağlandıktan sonra, klathrin-kaplı (Sandvig ve van Deurs, 1996) veya klathrin-bağımsız (Sandvig ve ark., 2002) şekilde endositoz yoluyla hücre içine alınır. Geç endozom şekillenmeden önce erken endozomlardan klathrin-kaplı veziküllerle, sekretorik yolağın aksi istikametinde *trans*-golgi cisimciğine (Mallard ve ark., 1998), oradan da endoplazmik retükuluma (ER) geçer ve ribozomlar üzerine toksik etkisini göstereceği sitozole transloke olur. Katalitik A1 alt ünitesinin hücre içine translokasyonu için por oluşturmaksızın konak hücre mekanizmasını kullanan Stx'ler, erken endozomlarda membran-ilişkili bir endoproteaz olan furin ile Arg251-Met252 rezidüleri arasından yıkımlanır (Garred ve ark., 1995). Disülfid bağı (Şekil 1.7) ile bağlı kalmaya devam eden iki fragman, ER lümeninin indirgeyici ortamında birbirlerinden ayrılırlar. Aktif olan A1 fragmanının çok az miktarının (% 4) sitozole transloke olabilmesine karşın, protein sentezini inhibe ederek konak hücreyi öldürmeye yeterli olduğu bildirilmiştir (Tam ve Lingwood, 2007). A1 fragmanının sitozole translokasyonunda ise; ER'da proteinlerin katlanma kontrolü mekanizmasında görev alan luminal şaperonlar (BiP, Hsp70) gibi işlev gören, HEDJ olarak tanımlanan Hsp40'ın ve transmembranal yerleşimli Sec61 translokonunun görev aldığı rapor edilmiştir (Yu ve Haslam, 2005).

Bağırsağa ulaşan STEC'in hedefi konak hücreleridir. Her ne kadar Stx, protein biyosentezini bozarak etkinliğini gösterse de ilk baştaki enterosit hasarı

başlıca bakteriyel ürünlerden kaynaklanmaktadır. Nitekim konak enterositlerinde az miktarda Gb3 eksprese edilir (Falguieres ve ark., 2008) ve Gb3 miktarı Stx aktivitesinde önemlidir (Jacewics ve ark., 1994; Gyles, 2007). Ancak Stx kaynaklı damar endotellerinde şekillenen hasar ile oluşan vaskülit, mikrosirkülasyonun bozulmasına ve mukoza hasarı ile hemorajiyi tetikler. Önceleri Stx etkinliğinin, protein sentezini inhibe etmesi ile sınırlı olduğu düşünülmesine karşın, günümüzde kendi hücre içi trafiklerini arttıran çeşitli sinyal mekanizmalarını (HeLa hücrelerinde Syk aktivasyonu [Lauvrak ve ark., 2006]), apoptozisi ve monosit/makrofaj kaynaklı, endotellerde daha fazla Gb3 ekspresyonunu tetikleyen, yangısal mediyatörleri indükledikleri bilinmektedir (Johannes ve Römer, 2010). Şekillenen apoptozisin temelinde ise, A1 fragmanı *N*-glikoz aktivitesi etkinliğinde ribozomal translasyonun bozulması ile gelişen ribotoksik stres yanıtı sonucu aktive olan JUN-N terminal kinaz (Jnk) ve mitojenle-aktive olan protein kinaz (MAPK) p38 yatmaktadır (Smith ve ark., 2003; Tesh, 2010).

STEC'ler invaziv karakterde olmadıklarından, bağırsakta üretilen Stx'in, emilerek sistemik sirkülasyona dahil olmak kaydıyla ekstra-gastrointestinal semptomlara neden olduğu varsayılmaktadır. Bu nedenle, hem bağırsakta ne kadar toksin üretildiği, hem de bu üretilen toksinlerin ne kadarının emildiğinin önemi büyüktür (Thorpe ve ark., 2002). Öte yandan, Peyer plaklarındaki follikül-ilişkili epitelyumda bulunan, bağırsak lümeninden organizmaları ve partikülleri immun hücrelerine aktararak mukozal immunitede önemli rol oynayan M hücrelerinin de, Stx translokasyonunda önemli olduğu bildirilmiştir. Etienne-Mesmin ve ark. (2011), *E. coli* O157:H7 referans suşları, izojenik mutantları ve klinik izolatların, M hücrelerince makrofajlara aktarılarak, makrofajlar içinde canlı kaldığı sürece Stx üretmeye devam ettiklerini ve apoptozla Stx salınımını indükledikleri bildirmiştir.

En başta iki immunolojik tipi (Stx1 ve Stx2) belirlenen Stx'lerin (Strockbine ve ark., 1986), A ve B alt üniteleri arasındaki homoloji; nükleotid dizisi için sırasıyla % 57 ve % 60, amino asit dizisi için sırasıyla % 55 ve % 57 olarak rapor edilmiştir. Ancak böyle bir benzerlik bulunmasına rağmen, birbirlerine karşı geliştirilen poliklonal antikorlarla nötralize olmamaktadırlar (Jackson ve ark., 1987). Tanımlandıkları dönemden günümüze kadar geçen sürede yapılan dizi analizleri, hem Stx1'in, hem de Stx2'nin A (Zhang ve ark., 2002a; Bürk ve ark., 2003; Leung

ve ark., 2003) ve B (Pierard ve ark., 1998; Schmidt ve ark., 2000; Leung ve ark., 2003; Osek ve ark., 2003) alt ünitelerindeki farklılıktan kaynaklanan çeşitli varyantları olduğunu ortaya koymuştur (Çizelge 1.4). Bu varyantlar, amino asit dizilerinde ve dolayısıyla Gb3 reseptörlerine olan afinitelerindeki farklardan dolayı, çeşitli hücre kültürlerinde ve/veya hayvanlarda farklı düzeylerde toksisite göstermektedir (Jackson ve ark., 1987; Ito ve ark., 1990; Schmitt ve ark., 1991; Meyer ve ark., 1992; Paton ve ark., 1992; Paton ve ark., 1993; Paton ve ark., 1995; Pierard ve ark., 1998, Friedrich ve ark., 2002). Genel anlamıyla, diğer STEC'lere oranla O157:H7 serotipleri, daha çok Stx1 ve/veya Stx2 veya yalnız Stx2, hatta Stx2c varyantını taşımaktadır (Pierard ve ark., 1998; Eklund ve ark., 2002; Friedrich ve ark., 2002; Nakao ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2002a; Leotta ve ark., 2008; Zheng ve ark., 2008; Lefebvre ve ark., 2009; Michel ve Kase, 2009).

Çizelge 1.4. Çeşitli STEC kaynaklı Stx varyantları.

Stx varyantı	**Shiga toksin ile sekans homolojisi**		**Kaynak**
	A alt ünitesi	**B alt ünitesi**	
Stx1	% 97	% 98	Strockbine ve ark. (1986)
Stx1c	% 97	% 98	Zhang ve ark. (2002a)
Stx1d	-	-	Gourmelon ve ark. (2006)
Stx2	% 53	% 64	Strockbine ve ark. (1986)
Stx2c	% 53	% 61	Schmitt ve ark. (1991)
Stx2d	% 54	% 61	Pierard ve ark. (1998)
$Stx2d_{act}$	-	-	Kokai-Kun ve ark. (2000)
Stx2e	% 53	% 61	Marques ve ark. (1997)
Stx2f	% 54	% 60	Schmidt ve ark. (2000)
Stx2g	% 63	% 77	Leung ve ark. (2003)

1.7.4. Plazmid O157 (pO157)

Plazmid, kromozomal DNA'dan bağımsız bir şekilde kendini çoğaltabilen ekstrakromozomal DNA'dır. Mobil genetik elemanlardan biri olan plazmid, bulunduğu konağa çeşitli yararlı etkiler sağlar. Bu etkiler arasında; antibiyotik ya da

ağır metallere direnç, toksin ya da başka virülens faktörleri üretimi ve hidrokarbonların biyotransformasyonu vb. sayılabilir.

E. coli O157:H7 iyi korunan, konjügatif olmayan, 92-104 kb büyüklüğünde bir plazmid içermektedir. İki farklı salgın izolatında tüm plazmid sekansı bildirilmiştir (Burland ve ark., 1998; Makino ve ark., 1998). Toplam 100 açık okuma çerçevesi içeren pO157'nin (Burland ve ark., 1998) 35 proteininin *E. coli* O157:H7 infeksiyonlarının patogenezinde rol aldığı varsayılmakla beraber, 19 geni karakterize edilmiştir (Lim ve ark., 2010). pO157 kaynaklı önemli virülens faktörleri arasında hemolizin (*ehxA*/*hlyA*) (Schmidt ve ark., 1994), katalaz-peroksidaz (*katP*) (Brunder ve ark., 1996), tip-II sekresyon sistemi aparatı (*etpC-O*) (Schmidt ve ark., 1997), serin proteaz (*espP*) (Brunder ve ark., 1997) (bkz. İlk adezyon), adezin (*toxB*) (Tatsuno ve ark., 2001), Zn-metalloproteaz (*stcE*) (Lathem ve ark., 2002) yer almaktadır. pO157'nin patogenezdeki etkinliğine ilişkin gerek *in vivo*, gerek *in vitro* çalışmalar çelişkili sonuçlar ortaya çıkarmış olmasına karşın (Lim ve ark., 2010), sağlıklı sığırların kolonizasyonuna ve asidik koşullarda canlı kalmaya etkisi olduğu bildirilmiştir. Örneğin, izojenik pO157 mutantı, sentetik sığır mide asidi ve safraya, vahşi suşa göre daha uzun süre dayanmıştır, ancak rekto anal mukozada daha az kolonize olmuştur (Sheng ve ark., 2006; Lim ve ark., 2007b). Aynı suşlara SDS-PAGE uygulayan araştırmacılar, mutant suştaki artmış asit direncinin, yükselmiş glutamat dekarboksilaz enziminden kaynaklandığını belirleyerek, pO157'nin kromozomal genlerin regülasyonuna etkisi olduğunu da belirlemiştir (Lim ve ark., 2007b).

1.7.4.1. Enterohemolizin (EhxA - EHEC-hemolizin [HlyA])

Beutin ve ark. (1989), inceledikleri STEC'lerin büyük bir bölümünde (% 89), ekstraintestinal infeksiyon oluşturan *E. coli* suşlarındaki α-hemolizinden farklı bir hemolitik fenotipi ilk kez tanımlamıştır. Enterohemolizin (daha sonra EHEC-hemolizin [Schmidt ve ark., 1995] veya Ehx [Bauer ve Welch, 1996]) olarak

tanımladıkları bu özellikteki suşlar, standart kanlı agarda hemoliz oluşturmamasına rağmen, Ca^{++} varlığında defibrine (veya yıkanmış) koyun kanlı agarda küçük ve türbid hemoliz alanları şekillendirmiştir. Enterohemolizin hücre-ilişkili bir hemolizinken, α-hemolizin hücre dışına salındığı için daha geniş hemoliz alanları oluşturmaktadır (Schmidt ve ark., 1995). Özellikle HUS şekillenen hastaların serum örneklerinin O157:H7 hemolizini ile reaksiyon vermesi, enterohemolizinin patogenezde önemli olduğunu düşündürmektedir (Schmidt ve ark., 1995).

pO157'den sekansı bildirilen ilk virülens faktörü olan EhxA (Scmidt ve ark., 1994; Schmidt ve ark., 1995), α-hemolizin ve diğer RTX (repeat in toxin - GGXGXD, glisin tekrarları) ailesi üyeleri por-oluşturan sitolizinlerle % 60 civarında homoloji paylaşmaktadır. RpoS sigma faktörüne ihtiyacı olan ve H-NS ile baskılanan (Li ve ark., 2008) ancak LEE'den kodlanan Ler (Iyoda ve ark., 2011) ve GrlA (Saitoh ve ark., 2008)'nın yukarı regülasyonundaki enterohemolizinin inaktif yapısal proteinini kodlayan *ehxA*, dört geni (*ehxCABD*) içeren tek bir operonda yer alır. EhxC, 107 kDa'luk EhxA'ya yağ asidi grubunu ekleyip aktif halini oluştururken, EhxB ve EhxD, membran proteini TolC ile birlikte sekresyon mekanizmasını şekillendirir. C-terminalinde taşıdığı sekresyon sinyali ile tip-I sekresyon sistemi (ABC transportör) tarafından salgılanarak ekstrasellüler Ca^{++} varlığıyla hücre ilişkili son konformasyonel şeklini alır (Jumpertz ve ark., 2010).

Patogenezdeki rolü tam olarak ortaya konmamış olmasına karşın (Cookson ve ark., 2007), *E. coli* O157:H7'nin bağırsaktaki üremesi sırasında, EhxA ile eritrositlerden serbest kalan hemoglobini demir kaynağı olarak kullanabileceği ifade edilmiştir (Paton ve Paton, 1998). Defibrine koyun kanını, insan eritrositlerini ve sığır lenfoma hücre kültürlerini lize edebilen enterohemolizin, iki farklı insan lenfoma hücre kültürünü lize edememiştir (Bauer ve Welch, 1996; Paton ve Paton, 1998). Bu özelliklerinin yanı sıra, lipopolisakkarid ve Stx'lerin dışında, insan monositlerinden TNF-α değil ancak IL-1β salınımını uyararak yangı gelişiminde etkisi olduğu bildirilmiştir (Taneike ve ark., 2002). pO157 veya EhxA mutantlarıyla da patogenezde ayırıcı bir rolü belirlenemeyen enterohemolizin (Cookson ve ark., 2007), incelenen birçok STEC ve *E. coli* O157:H7 suşunda var olduğundan, olası STEC belirleyicisi olarak kullanılmaktadır (Beutin ve ark., 1989; Schmidt ve ark.,

1995; Osek ve ark., 2003; Toma ve ark., 2004; Rashid ve ark., 2006a; Leotta ve ark., 2008; Lefebvre ve ark., 2009).

1.7.4.2. Katalaz-peroksidaz (KatP)

pO157'den identifiye edilen bir başka gen, katalaz-peroksidaz aktivitesine sahip *katP*'dir (Brunder ve ark., 1996). pO157'de 2.2 kb'lık genden kodlanan ve periplazm ile sitoplazma yerleşimli KatP'nin, konak bağırsak kolonizasyonu sırasında oksidatif stresi azaltarak virülense ve immuniteden kaçışa katkısı olabileceği bildirilmiştir (Lim ve ark., 2010). KatP fonksiyonel bir katalaz-peroksidaz olmasına karşın, delesyonu gerçekleştirilen mutantında azalmış bir peroksit direnci izlenmemesi, H_2O_2 direncinde rol almadığını düşündürmüştür (Brunder ve ark., 1996). Ancak Ulrich (2009), KatP ve diğer kromozomal orijinli katalaz-peroksidaz mutantları ile yaptığı gen ekspresyonu çalışmalarıyla; KatP'nin OxyR regülasyonunda olduğunu, durağan fazda RpoS etkinliğinde ekspresyonunun baskılandığını ve bakteriyi OxyR-ilişkili bir şekilde peroksit-kaynaklı oksidatif hasardan koruduğunu bildirmiştir.

1.7.4.3. EHEC C1 esteraz inhibitörü (StcE - Secreted protease of C1 esterase inhibitor from EHEC)

StcE, diğer diyarejenik *E. coli*'lerde bulunmayan ancak *E. coli* O157:H7'nin pO157 plazmidinden, Ler'in yukarı-regülasyonunda kodlanarak, yine aynı plazmidden kodlanan tip-II sekresyon sistemi (Schmidt ve ark., 1997) ile salgılanan bir Zn-metalloproteazdır. StcE, Genel bir proteaz olmayıp sadece aktif faz proteinlerinden C1 esteraz inhibitörünü (C1-INH) kesen bir proteaz olarak tanımlanmıştır (Lathem ve ark., 2002). Komplement sisteminin ve diğer yangısal mekanizmaların regülatörü

olan C1-INH, StcE ile kesilse dahi klasik komplement aktivasyonunu baskılayan fonksiyonunu korumaktadır (Lathem ve ark., 2004). Önerilen modele göre StcE, fonksiyonel kısmını hücre membranında lokalize ettiği C1-INH'nü kullanarak, infeksiyon bölgesindeki yangı ve hasar gören dokudan bağırsak lümenine ulaşan komplement-ilişkili lizisi azaltmaktadır (Lathem ve ark., 2004). StcE'nin, tükürük ve bağırsak gibi başka dokularda bulunan, glikoprotein 340 ve müsin 7 glikoproteinlerini kesebildiği, dolayısıyla konak hücrelerini örten koruyucu tabakanın degredasyonuyla aderenze katkısı olduğu da ifade edilmiştir (Grys ve ark., 2005). Yüzeyinde müsin-tip glikoproteinler (CD43 ve CD45) barındırdığından nötrofiller ile StcE proteaz ilişkisini inceleyen Szabady ve ark. (2009), StcE'nin nötrofil migrasyon kapasitesini azaltarak nötrofil retensiyonuna ve oksidatif patlama miktarını arttırarak daha fazla doku hasarına sebep olduğunu ifade etmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışmada, Kırıkkale ilindeki mezbahada kesimleri yapılan toplam 100 Akkaraman koyundan, bir yıllık sürede, kesim işlemini takiben aynı hayvana ait RAMS ve KSS olmak üzere toplam 200 örnek materyal olarak toplandı. Örnek toplama dönemine 2012 yılı Haziran ayında başlanıp, 2013 yılı Mayıs ayında son verildi. Örnekleme dönemleri, mevsimsel farklılıkları ortaya koyabilmek için sıcak (Mayıs-Ekim) ve soğuk (Kasım-Nisan) aylar olacak şekilde ikiye ayrılarak her dönemde 50 adet olmak üzere toplam 100 hayvandan örnek toplandı (Çizelge 2.1). Örneklenen hayvan sayısı, ilgili ay içerisinde örnekleme yapılan gün(ler)de kesime getirilen koyun sayısına göre belirlendi ve getirilen koyunların en az % 50'si rastgele seçilerek örnekleme yapıldı. Örneklerin toplandığı koyunların cinsiyetleri ve yaş aralıkları kaydedildi. Alt çenede bir çift kalıcı kesici dişe sahip olan hayvanlar > 12 ay olarak kabul edilirken, bir yaşın altındaki hayvanların yaş aralığı tayini için hayvan sahibinden ve hayvan sahibinin olmadığı durumlarda hayvanların sağlık raporlarından yararlanıldı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.1. Sıcak ve soğuk aylara göre örneklenen hayvan sayıları.

Sıcak Aylar	**n**	**Soğuk Aylar**	**n**
Mayıs	16	Kasım	6
Haziran	10	Aralık	9
Temmuz	0	Ocak	7
Ağustos	8	Şubat	12
Eylül	7	Mart	12
Ekim	9	Nisan	4
Toplam	50	*Toplam*	50

RAMS örnekleri koyunların kesimlerini takiben svap ile anüsten 3-5 cm içeri girilerek, dairesel hareketler ile rektoanal mukozaya sürülerek elde edildi. Alınan svaplar, eldiven ile temas eden çubuk bölgeleri kırılarak uzaklaştırıldıktan sonra,

steril 3 ml Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid CM0129) içeren tüplere aktarıldı (Rice ve ark., 2003).

Çizelge 2.2. Örnekleme yapılan koyunların yaş ve cinsiyet dağılımı.

Yaş	n (%)	Cinsiyet*	n (%)
< 6 ay	18 (% 18)	E	9 (% 9)
		D	9 (% 9)
6 – 12 ay	40 (% 40)	E	34 (% 34)
		D	6 (% 6)
> 12 ay	42 (% 42)	E	30 (% 30)
		D	12 (% 12)

* D: dişi; E: erkek.

KSS örnekleri, ticari olarak temin edilebilen steril kuru süngerli (5 x 10 cm) çubuklarla (3M, SSL100, ABD, Şekil 2.1), deri yüzme ve iç organ çıkarma işlemlerini takiben soğutma işlemi öncesinde toplandı. Örnekler, karkaslarda kontaminasyonun fazla olduğu; but iç bölgesi (anüsün caudo-ventralinden) ve kuyruk ventrali ile toraksın laterali ve abdomenin bıçak ile açıldığı median hattın lateralindeki bölgelerin, her bir bölgeden en az 100 cm^2 olacak şekilde toplamda en az 700 cm^2 alanın bastırılarak sürülmesi ile elde edildi (Anonim, 1996; Anonim, 2001b). Süngerler örnekleme işlemini takiben, çubuk bölümü kırılarak kendi steril poşetlerine konuldu ve ağızları kapatıldı.



Şekil 2.1. KSS örneklerinin toplanmasında kullanılan ticari süngerli çubuklar.

Örneklenen her hayvandan elde edilen numuneler aynı numara ile numaralandırılarak, soğuk muhafaza altında 2 saatten kısa sürede laboratuvara getirilerek *E. coli* O157:H7 izolasyonuna başlandı.

2.1.1. *E. coli* O157 İzolasyonu ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Diğer Kimyasallar

Tryptone Soya Broth

Tryptone Soya Borth (Oxoid CM0129)

Hazırlanışı

Ön zenginleştirme aşamasında kullanmak üzere, hazır besiyerinden 30 g tartılarak 1 L distile suda çözündürüldü ve pH değeri 7.3 ± 0.2'ye ayarlandıktan sonra kapaklı tüplere 3'er ml aktarılarak otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.

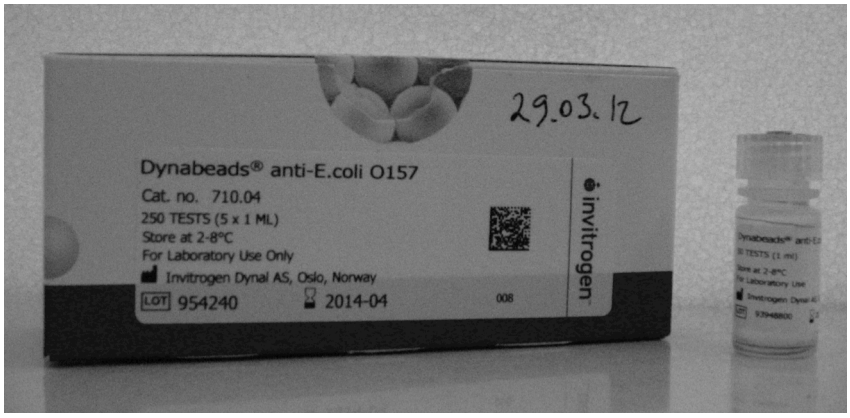
Novobiyosin Katkılı EC Broth

EC Broth (Oxoid CM0853)
Novobiocin (Sigma N1628)

Hazırlanışı

Ön zenginleştime aşamasında kullanmak üzere, hazır besiyerinden 37 g tartılarak 1 L distile suda çözündürüldü ve pH değeri 6.9 ± 0.2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Kullanılacağı zaman, aynı gün steril ultra saf su ile hazırlanmış novobiyosin antibiyotik solüsyonu son konsantrasyonu 20 mg/L olacak şekilde aseptik olarak eklendi.

Dynabeads anti-*E. coli* O157



Şekil 2.2. Dynabeads anti-*E. coli* O157 kiti (710.04, Dynal Biotech ASA, Oslo, Norveç).

Hazırlanışı

IMS tekniğinde kullanılmak üzere 5 x 1 ml ve 250 testlik şekilde hazırlanmış ticari preparat direkt üreticisinin önerdiği doğrultuda kullanıldı.

Phosphate Buffered Saline-Tween 20 (PBS-Tween 20)

Phosphate Buffered Saline-Tween 20 (Sigma P3563)

Hazırlanışı

IMS işleminde mikro-boncukların yıkanması ve tekrar süspanse edilmesinde kullanılmak üzere hazır paketinde ticari olarak temin edilen toz PBS-Tween 20 1L distile su içerisinde karıştırılarak eritilip, pH kontrolü (pH 7.4) yapıldıktan sonra otoklavla 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.

Cefixime-Tellurite Katkılı Sorbitol MacConkey Agar (CT-SMAC)

Sorbitol MacConkey Agar (Oxoid CM0813)
Cefixime-Tellurite Supplement (Oxoid SR0172)

Hazırlanışı

Selektif ve ayırıcı katı besiyeri olarak kullanılmak üzere hazır besiyerinden 51,5 g tartılarak 1 L distile suda kaynatılarak çözündürüldü ve pH değeri 7.1 ± 0.2'ye ayarlandıktan sonra otoklavla 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Su banyosunda 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, 2 ml steril ultra saf su ile hazırlanan sefiksim-tellürit katkısı, her 500 ml'ye bir vial olacak şekilde aseptik olarak katılarak petrilere döküldü.

E. coli O157 Latex Test

E. coli O157 Latex Test (Oxoid DR0620)

Hazırlanışı

CT-SMAC'ta üreyen sorbitol negatif kolonilerin lateks aglütinasyon testi ile değerlendirilmesi için oda sıcaklığına getirilen test solüsyonları (Şekil 2.3), ticari preparatın üreticisinin önerdiği şekilde kullanıldı.



Şekil 2.3. *E. coli* O157 Latex Test kiti.

2.1.2. *E. coli* O157 İzolatlarının *E. coli* O157:H7 Olarak İdentifiye Edilmesi ve Virülens Genlerinin Belirlenmesi İçin Yapılan PCR Analizlerinde Kullanılan Kimyasallar

Chelex-100

Chelex-100 (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD)

Bileşimi

Chelex-100 solüsyonu	% 6 (v/v)

Proteinase K

Proteinase K (AppliChem GmBH, Darmstadt, Almanya)

Bileşimi

Proteinaz K solüsyonu	20 mg/ml

Taq DNA Poylmerase Seti

Taq DNA Polymerase Seti (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Almanya)

Bileşimi

Taq DNA Polymerase	500 U (5 U/µl)
PCR Buffer	10 x
$MgCl_2$	25 mM

dNTP Seti

dNTP Seti (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Almanya)

Bileşimi

dATP	100 mM
dCTP	100 mM
dGTP	100 mM
dTTP	100 mM

Hazırlanışı

Tüm dNTP'ler eşit miktarda karıştırılarak 10 mM'lık konsantrasyonda hazırlanarak kullanıldı.

DNA Ladder ve Yükleme Solüsyonu

DNA Ladder 100 bp extended (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Almanya)
6 x Orange G Loading Dye (DZLB6X-5, Dr. Zeydanlı, Ankara, Türkiye)

Primerler

Hazırlanışı

Çizelge 2.3'de belirtilen şekilde HPLC saflıkta sentezlenen hazır liyofilize primerler, temin edilen firmanın sentez raporunda önerildiği şekilde 100 pmol/µl olacak şekilde steril ultra saf su ile sulandırıldıktan sonra dondurularak muhafaza edildi. PCR analizleri için primerlerin 10 pmol/µl'lik konsantrasyonları kullanıldı

Çizelge 2.3. *E. coli* O157 izolatlarının *E. coli* O157:H7 olarak identifiye edilmesi, virülens genleri ve varyantlarının belirlenmesi için PCR analizlerinde kullanılan primer çiftleri.

Gen	Primer	Nükleotid Sekansı (5′ - 3′)	Ürün (bp)	Kaynak
rfbE$_{O157}$	RfbE-a	CTACAGGTGAAGGTGGAATGG	327	Wang ve ark.
	RfbE-b	ATTCCTCTCTTTCCTCTGCGG		(2002)
fliC$_{h7}$	FLICH7-F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	625	Fratamico ve
	FLICH7-R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC		ark. (2000)
stx$_1$	SLT1-F	TGTAACTGGAAAGGTGGAGTATACA	210	Fratamico ve
	SLT1-R	GCTATTCTGAGTCAACGAAAAATAAC		ark. (2000)
stx$_2$	SLTII-F	GTTTTTCTTCGGTATCCTATTCC	484	Fratamico ve
	SLTII-R	GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC		ark. (2000)
eaeA	AE22	ATTACCATCCACACAGACGGT	397	Fratamico ve
	AE20-2	ACAGCGTGGTTGGATCAACCT		ark. (2000)
hly	MFS1-F	ACGATGTGGTTTATTCTGGA	166	Fratamico ve
	MFS1-R	CTTCACGTCACCATACATAT		ark. (2000)
lpfA1-3	LPFA1-CF	GGTTGGTGACAAATCCCCG	244	Torres ve ark.
	LPFA1-CR1	CGTCTGGCCTTTACTCAGA		(2009)
espA	EspAa	CACGTCTTGAGGAAGTTTGG	299	McNally ve ark.
	EspAb	CCGTTGTTAATGTGAGTGCG		(2001)
eae-α1	EAE-FB	AAAACCGCGGAGATGACTTC	820	Blanco ve ark.
	EAE-A	CACTCTTCGCATCTTGAGCT		(2004)
eae-α2	IH2498aF	AGACCTTAGGTACATTAAGTAAGC	517	Blanco ve ark.
	IH2498aR	TCCTGAGAAGAGGGTAATC		(2004)
eae-β	EAE-FB	AAAACCGCGGAGATGACTTC	830	Blanco ve ark.
	EAE-B	CTTGATACACTTGATGACTGT		(2004)
eae-β1	EA-B1-F	CGCCACTTAATGCCAGCG	811	Blanco ve ark.
	EAE-B	CTTGATACACCTGATGACTGT		(2004)
eae-β2	EA-B2-F	CCCGCCACTTAATCGCACGT	807	Blanco ve ark.
	EAE-B	CTTGATACACCTGATGACTGT		(2004)
eae-γ1	EAE-FB	AAAACCGCGGAGATGACTTC	804	Blanco ve ark.
	EAE-C1	AGAACGCTGCTCACTAGATGTC		(2004)
eae-γ2/θ	EAE-FB	AAAACCGCGGAGATGACTTC	808	Blanco ve ark.
	EAE-C2	CTGATATTTTATCAGCTTCA		(2004)
stx1$_c$	Stx1c-1	TTTTCACATGTTACCTTTCCT	498	Zhang ve ark.
	Stx1c-2	CATAGAAGGAAACTCATTAGG		(2002a)
stx1$_d$	VT1AvarF	CTTTTCAGTTAATGCGATTGCT	192	Bürk ve ark.
	VT1AvarR	AACCCCATGATATCGACTGC		(2003)
stx2$_c$	Stx2c-a	GCGGTTTTATTTGCATTAGT	124	Wang ve ark.
	Stx2c-b	AGTACTCTTTTCCGGCCACT		(2002)
stx2$_d$	Stx2d-a	GGTAAAATTGAGTTCTCTAAGTAT	175	Wang ve ark.
	Stx2d-b	CAGCAAATCCTGAACCTGACG		(2002)
stx2$_e$	Stx2e-a	ATGAAGTGTATATTGTTAAAGTGGA	303	Imberechts ve
	Stx2e-b	AGCCACATATAAATTATTTCGT		ark. (1992)
stx2$_f$	Stx2f-a	TGTCTTCAGCATCTTATGCAG	150	Schmidt ve ark.
	Stx2f-b	CATGATTAATTACTGAAACAGAAAC		(2000)
stx2$_g$	209F	GTT ATATTTCTGTGGATATC	573	Leung ve ark.
	781R	GAATAACCGCTACAGTA		(2003)

Tris-Borik Asit-Etilendiamin Tetra Asetik Asit (TBE) Solüsyonu

Bileşimi

Tris-Hydroxymethylaminoethane (Merck 1.01549)	54.5 g
Boric Acid (Merck 1.12015)	27.8 g
Tritriplex II (Merck 1.08417)	2.9 g

Hazırlanışı

Belirtilen miktarlarda tartılan kimyasal maddeler, distile su ile 1 L'ye tamamlanarak 5 x TBE stok solüsyonu elde edildi. Stok solüsyondan alınan 200 ml'nin 1 L'ye tamamlanmasıyla analizlerde kullanılan 1 x TBE solüsyon elde edildi.

Ethidium Bromide Solüsyonu

Bileşimi

Ethidium Bromide (BioChemica, GmbH, Darmstadt, Almanya)
Ultra saf su

Hazırlanışı

Bir μg/ml şeklinde ultra saf su ile hazırlanan ethidium bromide solüsyonu kullanıldı.

Agaroz Jel

Bileşimi

Agarose (Agarose Basica LE, Prona, İspanya)
1 x TBE

Hazırlanışı

Agaroz jel elektroforezinde kullanılmak üzere 1 x TBE solüsyonu ile % 1.5 (w/v) olarak hazırlanan karışım, mikrodalga fırında tamamen eritildikten sonra yaklaşık 50 °C dökme sıcaklığına soğutuldu. Soğumayı takiben içerisine, hazırlandığı hacmin μl

cinsinden (küvet büyüklüğüne göre: 150 µl veya 250 µl) ethidium bromide solüsyonu eklenerek, elektroforez küvetine (CSL MSMixi-Duo, Corston, İngiltere) döküldü ve oda sıcaklığında donduktan sonra kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. *E. coli* O157 izolasyonu

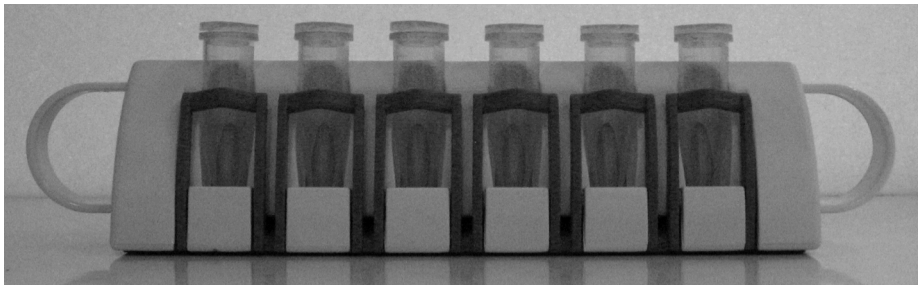
RAMS ve KSS örneklerinden *E. coli* O157'nin izolasyonunda, immuno manyetik seperasyon (IMS) bazlı kültür tekniği kullanıldı (Anonim, 2001a).

2.2.2. Ön Zenginleştirme

RAMS sürüntüleri, içerisinde bulundukları 3 ml TSB (Oxoid CM0129) içeren tüplerde 1 dakika vortekslendikten (Velp Scientific, Zx3 vortex, Milano, İtalya) sonra 37 ºC'de 18 saat inkübe (Nüve EN120, Ankara, Türkiye) edildi (Rice ve ark., 2003). İçerisinde KSS örnekleri bulunan torbalara ise, 20 mg/L novobiyosin (Sigma N1628) içeren 90 ml *E. coli* broth (mEC broth, Oxoid CM0853) eklenerek stomacher (Seward Laboratory, Labblender 400 Stomacher, Londra, İngiltere)'de 1 dakika muamele edildikten sonra, 37 ºC'de 18 saat inkübe (Nüve EN120) edildi (Jeong ve ark., 2007).

2.2.3. İmmuno Manyetik Seperasyon (IMS)

İnkübasyonu takiben, her bir örnek için içerisine 20'şer µl anti-*E. coli* O157 Dynabead (anti-*E. coli* O157 Dynabeads, Dynal ASA, Oslo, Norveç)'i konulan steril eppendorf tüplerine zenginleştirme sıvılarından 1'er ml eklendi. Karışım iyice vortekslenerek homojenize edildikten sonra eppendorflar, manyetik çubuğu çıkartılmış Dynal manyetik partikül konsantratör portüpüne (Dynal MPC-S, Dynal Biotec, 120.20) (Şekil 2.4) yerleştirilerip oda sıcaklığında 10 dakika karıştırılarak inkübe edildi. Örneklerde bulunması muhtemel *E. coli* O157'lerin anti-O157 antikorları ile kaplanmış mikro-boncuklara bağlanması için yapılan bu inkübasyon işlemini takiben, konsantratör portüpün arkasına manyetik çubuğun yerleştirilmesi ile oluşturulan manyetik alan sayesinde mikro-boncukların eppendorf tüp duvarında toplanarak zenginleştirme sıvısından seperasyonu sağlandı (Şekil 2.4). Üç dakikalık inkübasyonu takiben eppendorf tüpte kalan sıvı, mikropipet ile duvara temas edilmeden dikkatlice aspire edildi. Manyetik çubuğun konsantratör portüpten çıkarılmasını takiben mikro-boncuklar % 0.05 Tween 20 içeren Phosphate-Buffered Saline (PBS) (pH 7.4) (Sigma, P3563) ile yıkandı. Toplamda üç kez tekrarlanan inkübasyon, manyetik konsantrasyon, aspirasyon ve yıkama işlemini takiben mikro-boncuklar 100 µl PBS ile süspanse edildi.



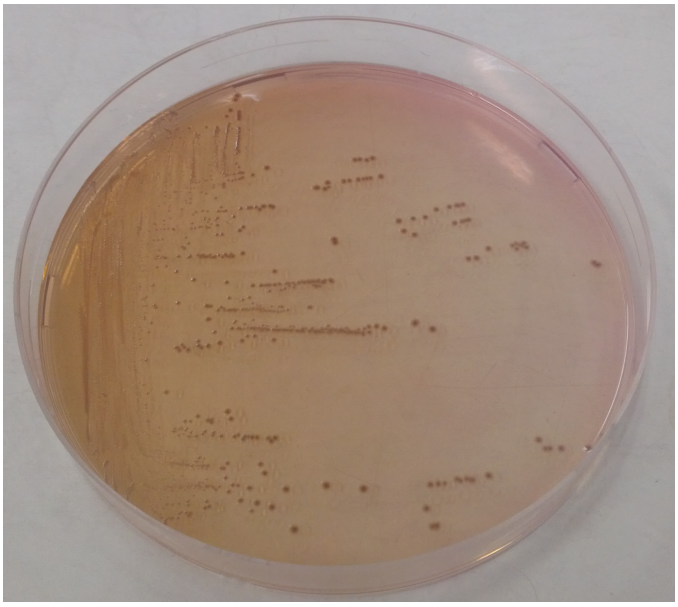
Şekil 2.4. Dynal manyetik partikül konsantratör portüpü.

2.2.4. Katı Besiyerine Ekim

IMS ile zenginleştirilmiş materyalden 50'şer µl, sefiksim (0.05 mg/L) ve potasyum tellürit (2.5 mg/L) katkılı (Oxoid SR0172) iki ayrı Sorbitol MacConkey (CT-SMAC, Oxoid CM0813) agara ekildi. Mikro-boncuklara bağlanan *E. coli* O157'lerin mikro-boncuklardan serbestleşerek daha rahat üremelerini sağlamak amacıyla steril tahta çubuk ile iyice yayıldı. Ekimleri gerçekleştirilen petriler 42 ºC'de 18 saat inkübe (Heal Force HF90, Şangay, Çin) edildi.

2.2.5. Lateks Aglütinasyonu ile Kolonilerin *E. coli* O157 Olarak İdentifikasyonu

İnkübasyonu takiben, CT-SMAC agarda üreyen sorbitol negatif pigmentsiz kolonilerden (Şekil 2.5) her bir numune örneği için en fazla 5 adet seçilerek, kolonilerin bir bölümü O157 antijeni yönünden lateks aglütinasyon hazır test kiti (*E. coli* O157 Latex Test, Oxoid DR0620) ile üreticisinin önerisi doğrultusunda test edildi. Aglütinasyon pozitif koloniler *E. coli* O157 olarak identifiye edilerek, kolonilerin kalan kısımları saflık kontrolü için yeni bir CT-SMAC agara ekilerek 37 °C'de bir gece inkübe (Nüve EN120, Ankara, Türkiye) edildi. Farklı morfolojilerde kolonilerin üremesi durumunda, aynı örnek için sorbitol negatif pigmentsiz koloniler tekrar aglütinasyon test kiti ile test edildi.



Şekil 2.5. CT-SMAC agarda sorbitol negatif *E. coli* O157:H7 kolonilerinin görünümü.

2.2.6. İzolatların Muhafazası

Saflığından emin olunan *E. coli* O157 izolatları, 3 ml steril TSB (Oxoid CM0129)'ye aktarılarak 37 °C'de bir gece inkübe (Nüve EN120, Ankara, Türkiye) edildi. İnkübasyonu takiben her bir izolat, % 20 steril gliserinli cryoviallerde -86 °C'de (Sanyo MDF-U5186S, Japonya) muhafaza edildi.

2.2.7. PCR Tekniği

Fenotipik olarak belirlenen ve muhafazaya alınan *E. coli* O157 izolatlarının, O157 varlığının doğrulanması, H7 ve diğer virülens genlerinin varlığının araştırılması için PCR tekniği kullanıldı. Her bir gen analizi için hazırlanan PCR ve multipleks PCR master karışımları ile kullanılan PCR koşulları Çizelge 2.4'te verilmiştir. Elde edilen DNA ekstraktlarından 10 µl template DNA olarak kullanıldı. PCR analizlerinde pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılan referans suşlar ise Çizelge 2.5'te verilmiştir.

2.2.8. İstatistiksel Analizler

Koyunlardaki *E. coli* O157 prevalansına mevsimin ve yaş aralıklarının etkisinin değerlendirilmesinde "Pearson ki kare", cinsiyetin etkisinin değerlendirilmesinde ise "Fischer exact" testleri kullanıldı (SPSS, versiyon 14.01).

Çizelge 2.4. PCR analizlerinde kullanılan master karışımları ve PCR koşulları.

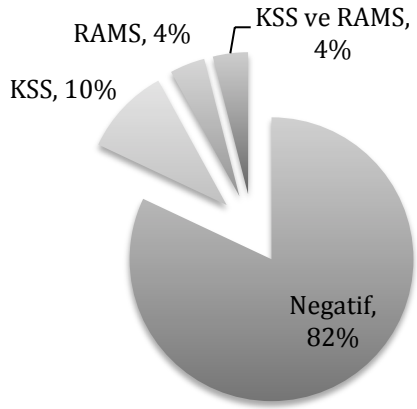
	Master Karışımı (µl)						PCR koşulları (°C/dk)					
Hedef Gen	10x buffer	25 mM $MgCl_2$	10 mM dNTP mix	10 pmol/µl primer	Taq polimeraz	Ultra saf su	İlk denatürasyon	Denatürasyon	Bağlanma	Elongasyon	Tekrar (adet)	Son elongasyon
rfbE$_{O157}$	5	3	2	RfbE-a: 0.25 RfbE-b: 0.25	0.5	29	94/2	94/0.2	54/1	72/1	35	72/10
fliC$_{h7}$	5	3	2	FLICH7-F: 0.25 FLICH7-R: 0.25	0.5	29	94/2	94/0.2	54/1	72/1	35	72/10
stx$_1$ *stx*$_2$ *eaeA* *hly*	5	3	2	SLT1-F: 2.5 SLT1-R: 2.5 SLTII-F: 2.5 SLTII-R: 2.5 AE22: 2.5 AE20-2: 2.5 MFS1-F: 1.25 MFS1-R: 1.25	0.5	12	94/2	94/0.2	57/1	72/1	35	72/10
lpfA1-3	5	3	1	LPFA1-CF: 2.5 LPFA1-CR1: 2.5	0.4	26	94/5	94/0.5	52/0.5	72/0.5	35	72/5
espA	5	3	1	EspAa: 2.5 EspAb: 2.5	0.2	26	94/5	94/0.75	57/0.75	72/1.5	30	72/10
stx2$_c$ *stx2*$_e$	5	10	1	Stx2c-a: 0.5 Stx2c-b: 0.5 Stx2e-a: 1 Stx2e-b: 1	0.4	20.6	94/5	94/1	53/1	72/1	30	72/5
eae-γ1	5	3	1	EAE-FB: 2.5 EAE-C1: 2.5	0.2	25.8	94/5	94/1	60/1	72/1	35	72/5

Çizelge 2.5. PCR analizlerinde pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılan referans suşlar, virülens özellikleri ve kaynakları.

Suş İsmi	**Serotipi**	**Virülens Özelliği**	**Kaynak**
E. coli ATCC 43895 (EDL 933)	O157:H7	*rfbE*$_{O157}^{+}$, *fliC*$_{h7}^{+}$, *stx1c*$^{+}$, *stx2c*$^{+}$, *eaeγ1*$^{+}$, *hly*$^{+}$, *lpfA1-3*$^{+}$, *espA*$^{+}$	KU, Vet. Fak., Gıda Hij. ve Tekn. ABD
E. coli NCTC 12900 (ATCC 700728)	O157:H7	*rfbE*$_{O157}^{+}$, *fliC*$_{h7}^{+}$, *stx1*$^{-}$, *stx2*$^{-}$, *eaeγ1*$^{+}$, *hly*$^{+}$, *lpfA1-3*$^{+}$, *espA*$^{+}$	KU, Vet. Fak., Gıda Hij. ve Tekn. ABD
E. coli 137/98	O157:NM	*stx2*$_c^{+}$	Osek ve ark. (2003)
E. coli 551/98	O62:H^{-}	*stx2*$_d^{+}$	Osek ve ark. (2003)
E. coli 107/86	O139:K12	*stx2*$_e^{+}$	Osek ve ark. (2003)
E. coli 214/125	O^{-}:H18	*stx2*$_f^{+}$	Osek ve ark. (2003)

3. BULGULAR

Tez çalışmasında, Haziran 2012 – Mayıs 2013 ayları arasında Kırıkkale ilindeki mezbahada kesimleri yapılan toplam 100 Akkaraman ırkı koyundan kesim işlemini takiben alınan 100'er adet RAMS ve KSS örneği olmak üzere toplam 200 örnek toplanarak, örneklerden IMS bazlı kültür tekniği ile *E. coli* O157 varlığı araştırıldı. İzolatların PCR tekniği ile *E. coli* O157 olarak doğrulanmasını veya *E. coli* O157:H7 olarak identifikasyonunu takiben, virülens genleri ve varyantlarının varlığı incelenerek moleküler karakterizasyonları yapıldı.



Şekil 3.1. Koyunlardan IMS bazlı kültür tekniği ile *E. coli* O157 izolasyon oranları.

3.1. IMS Bazlı Kültür Tekniği ile *E. coli* O157 İzolasyonu

Bir yıl boyunca 100 adet koyundan alınan ve IMS bazlı kültür tekniği ile analiz edilen örneklerin 18'inde (% 18) *E. coli* O157 tespit edilmiştir. Etken, 100 koyunun

10'unda (% 10) KSS örneklerinden, 4'ünden (% 4) RAMS örneklerinden ve 4'ünde (% 4) hem KSS hem de RAMS örneklerinde tespit edilmiştir (Şekil 3.1).

Ondört KSS ve 8 RAMS örneğinden toplam 75 sorbitol negatif *E. coli* O157 (NSF) kolonisi izole edilmiştir. Dört ve 5 numaralı koyunların KSS örneklerinden şüpheli olarak seçilen 4 adet O157 lateks aglütinasyon pozitif koloninin (4KA-C ve 5KA), saflaştırma için CT-SMAC üzerine geçildiğinde sorbitol fermentasyonu pozitif (SF) olduğu tespit edilmiştir.

3.2. İzolatların *E. coli* O157 Olarak Doğrulanması ve *E. coli* O157:H7 Olarak İdentifikasyon Sonuçları

Koyunlardan yapılan örnekleme ve IMS bazlı kültür tekniği sonucu izole edilen toplam 79 *E. coli* O157'nin (75 NSF ve 4 SF) tamamından $rfbE_{O157}$ geni, 68'inden ise $fliC_{h7}$ geni tespit edilmiştir. Yapılan PCR analizleri ile 79 izolatın 11'i (7 NSF ve 4 SF) (% 13.9) *E. coli* O157:$H7^-$, 68'i (% 86.1) *E. coli* O157:$H7^+$ olarak identifiye edilmiştir (Şekil 3.2) (Çizelge 3.1). Bu sonuçlara göre 100 koyunun 6'sından (% 6) *E. coli* O157 (4 örnekten NSF ve 2 örnekten SF), 12'sinde (% 12) ise sorbitol negatif *E. coli* O157:H7 izole ve identifiye edilmiştir.

3.2.1. Koyun Örneklerinde *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7'nin Mevsimsel Dağılımı

Sıcak ayları (Mayıs – Ekim) kapsayan örnekleme döneminde *E. coli* O157, 50 koyunun 11'inde (% 22) tespit edilmişken, soğuk ayları (Kasım – Nisan) kapsayan dönemde etken 50 koyunun 7'sinde (% 14) tespit edilmiştir (Çizelge 3.1).

Mevsimsel pozitiflik sadece RAMS örneklerine göre değerlendirildiğinde; sıcak aylarda 4 (% 8) koyunun *E. coli* O157 taşıdığı tespit edilmişken, soğuk aylarda 4 (% 8) koyunun *E. coli* O157 taşıdığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). *E. coli* O157:H7 yönünden ise sıcak aylarda sadece 1 (% 2) koyunun ve soğuk aylarda ise 4 (% 8) koyunun *E. coli* O157:H7 taşıdığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Mevsimsel pozitiflik sadece KSS örneklerine göre değerlendirildiğinde; sıcak aylarda 7 (% 14) koyun karkasının *E. coli* O157 ile kontamine olduğu tespit edilmişken, soğuk aylarda 7 (% 14) karkasın *E. coli* O157 ile kontamine olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$). *E. coli* O157:H7 yönünden değerlendirildiğinde ise sıcak aylarda 4 (% 8) karkasın ve soğuk aylarda ise 7 (% 14) karkasın tamamının *E. coli* O157:H7 ile kontamine olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Sıcak aylar ile soğuk aylar arasında gerek RAMS ve gerekse KSS örneklerinden *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7 tespitinde istatistiki olarak önemli bir fark bulunmamıştır.

3.2.2. Koyunlarda Cinsiyetlere Göre *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7 Dağılımı

Çalışmada toplam 73 (% 73) erkek ve 27 (% 27) dişi hayvandan örnekleme yapıldı. Buna göre erkek hayvanların 9'undan (% 12.3) ve dişi hayvanların 5'inden (% 18.5) *E. coli* O157 izole ve identifiye edilmiştir.

E. coli O157, erkek hayvanların sadece KSS ve sadece RAMS veya KSS ve RAMS örneklerinden sırasıyla; 5'inde (% 6.8), 4'ünde (% 5.5) ve 4'ünde (% 5.5) tespit edilirken, dişi hayvanların sadece KSS örneklerinin 5'inde (% 18.5) belirlenmiştir (Çizelge 3.1). Cinsiyete göre *E. coli* O157:H7 tespiti yönünden değerlendirilecek olursa, erkek hayvanların sırasıyla 4 (% 5.5) KSS, 1 (% 1.4) RAMS ve 4 (% 5.5) KSS ve RAMS örneğinden etken tespit edilirken, dişi hayvanların 3 (% 11.1) KSS örneğinden tespit edilmiştir.

RAMS pozitifliği ile hayvanların *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7 taşıyıcılığı göz önünde bulundurulduğunda, erkek hayvanların 8'inin (% 10.9) *E. coli* O157

taşıdığı ve bunların 5'inin (% 6.8) *E. coli* O157:H7 olduğu tespit edilmişken dişi hayvanlar (0/27, % 0) ile prevalans farkı istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

3.2.3. Koyunların Yaş Aralıklarına Göre *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7 Dağılımı

E. coli O157; 6 aylıktan küçük kuzuların (18/100, % 18) 2'sinden (% 11.1), 6 – 12 ay arası tokluların (40/100, % 40) 10'undan (% 25), 12 aylıktan büyük erişkin hayvanların ise (42/100, % 42) 6'sından (% 14.2) tespit edilirken *E. coli* O157:H7; sırasıyla hiç birinde (% 0), 6'sında (% 15) ve 6'sında (% 14.3) belirlenmiştir (Çizelge 3.1). Kuzu ile toklu, toklu ile erişkin, kuzu ile erişkin veya 12 aydan genç hayvanlar ile erişkin hayvanlar arasındaki gerek *E. coli* O157 ve gerekse *E. coli* O157:H7 tespit oranları istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

Etkenin RAMS örneklerinde bulunuşu veya diğer bir deyişle koyunların etkeni taşıyıcılığı olarak değerlendirildiğinde; 6 aydan küçük hayvanlarda etkene hiç rastlanmazken, 6 - 12 ay arası tokluların 6'sında (% 15) *E. coli* O157, 3'ünde (% 7.5) *E. coli* O157:H7 ve 12 aydan büyük hayvanların 2'sinde (% 4.8) *E. coli* O157:H7 tespit edilmiştir ve aradaki fark istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

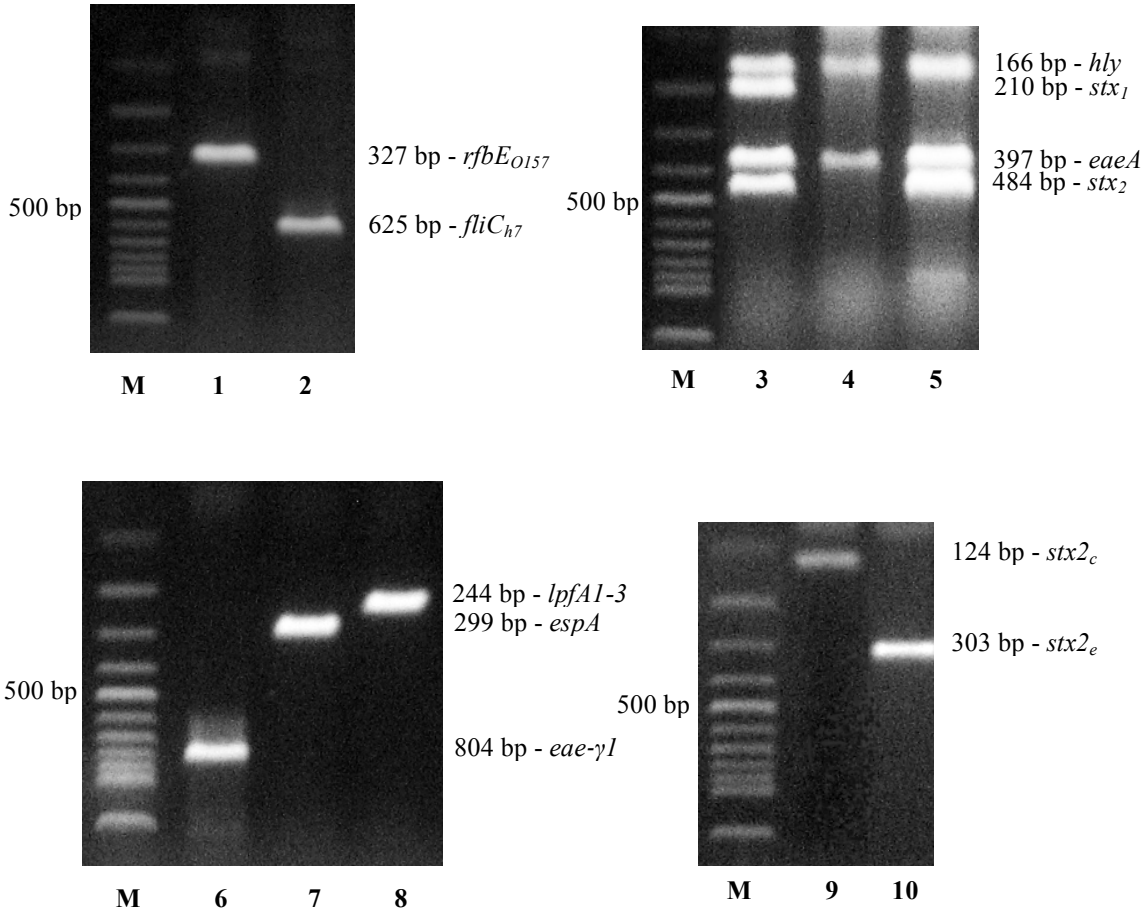
Çizelge 3.1. İzolatların O157 ve H7 karakterleri ile tespit edildikleri koyunların cinsiyet ve yaş aralığı dağılımları.

Koyun No.	Cinsiyet[a]	Yaş (ay)	Örnek[b]	O157	H7	İzolat Kodu[c]				
4	D	< 6	KSS	+	-	4KA*	4KB*	4KC*		
5	D	< 6	KSS	+	-	5KA*				
16	E	6 - 12	KSS	+	+	16KA				
24	E	6 - 12	RAMS	+	+	24RA	24RB			
26	E	6 - 12	RAMS	+	-	26RA				
30	E	6 - 12	RAMS	+	-	30RA	30RB	30RC		
32	E	6 - 12	RAMS	+	-	32RA	32RB			
34	E	6 - 12	KSS	+	-	34KA				
44	D	> 12	KSS	+	+	44KA	44KB	44KC	44KD	44KE
46	E	6 - 12	KSS ve RAMS	+	+	46KA 46RA	46KB 46RB	46KC 46RC	46KD 46RD	 46RE
47	E	6 - 12	KSS ve RAMS	+	+	47KA 47RA	47KB 47RB	47KC 47RC	47KD 47RD	 47RE
49	E	6 - 12	KSS	+	+	49KA	49KB	49KC	49KD	49KE
51	E	> 12	KSS	+	+	51KA	51KB	51KC	51KD	51KE
71	E	> 12	KSS ve RAMS	+	+	71KA 71RA	71KB 71RB	71KC 71RC	71KD 71RD	71KE 71RE
72	E	> 12	KSS ve RAMS	+	+	72KA 72RA	72KB 72RB	72KC 72RC	72KD 72RD	72KE 72RE
95	E	6 - 12	KSS	+	+	95KA	95KB	95KC	95KD	95KE
97	D	> 12	KSS	+	+	97KA	97KB	97KC	97KD	97KE
98	D	> 12	KSS	+	+	98KA	98KB			

[a] D: dişi; E: erkek
[b] KSS: karkas sünger sürüntüsü; RAMS: rektoanal mukozal svap
[c] K: KSS; R: RAMS
* SF (sorbitol fermentasyon pozitif)

3. 3. *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7 İzolatlarının Virülens Gen Profilleri

Bu çalışmada tespit edilen 79 *E. coli* O157 izolatının başlıca virülens gen profilleri Çizelge 3.2'de görülmektedir. Elde edilen 79 izolatın hiç birinin stx_1 barındırmadığı ancak 68 *E. coli* O157:H7'den 45'inin (% 57) $stx2_c$ yönünden pozitif olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, bütün izolatların *lpfA1-3* genini barındırdığı (% 100), yalnız bir izolatın hly^- olduğu, SF *E. coli* O157 izolatlarının *espA* genine sahip olmamasına karşın diğer tüm izolatların $espA^+$ olduğu ve tüm $eaeA^+$ izolatların (77/79, % 97.4) $eae\gamma_1$ varyantı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre toplam 100 koyundan 8'inin (% 8) KSS örneklerinde STEC O157:H7 belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Seçilen pozitif kontrollerden PCR ile elde edilen gen fragmanlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M:** 100 bp DNA marker; **1:** *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (*rfbE*$_{O157}$); **2:** *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (*fliC*$_{h7}^{+}$); **3:** *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (*stx1*$^{+}$, *stx2*$^{+}$, *eaeA*$^{+}$, *hly*$^{+}$); **4:** *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 (*stx1*$^{-}$, *stx2*$^{-}$, *eaeγ1*$^{+}$, *hly*$^{+}$); **5:** *E. coli* O157:H7 izolatı (44KA) (*stx1*$^{-}$, *stx2*$^{+}$, *eaeA*$^{+}$, *hly*$^{+}$); **6:** *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (*eae-γ1*$^{+}$); **7:** *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (*espA*$^{+}$); **8:** *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (*lpfA1-3*$^{+}$); **9:** *E. coli* O157:NM 137/98 (*stx2*$_c^{+}$); **10:** *E. coli* O139:K12 107/86 (*stx2*$_e^{+}$).

Toplam 79 izolattan 6 farklı gen profili ortaya çıkmıştır. İzolatlar sahip oldukları virülens gen dağılımına göre; *i) E. coli* O157:H7 (*eaeγ*$_1^{+}$, *hly*$^{+}$, *stx1*$^{-}$, *stx2*$_c^{+}$, *lpfA1-3*$^{+}$, *espA*$^{+}$) (45/79, % 57), *ii) E. coli* O157:H7 (*eaeγ*$_1^{+}$, *hly*$^{+}$, *stx1*$^{-}$, *stx2*$^{-}$, *lpfA1-3*$^{+}$, *espA*$^{+}$) (23/79, % 29.1), *iii) E. coli* O157 (*eaeγ*$_1^{+}$, *hly*$^{+}$, *stx1*$^{-}$, *stx2*$^{-}$, *lpfA1-3*$^{+}$, *espA*$^{+}$) (5/79, % 6.3), *iv) E. coli* O157 (*eaeγ*$_1^{+}$, *hly*$^{+}$, *stx1*$^{-}$, *stx2*$^{-}$, *lpfA1-3*$^{+}$, *espA*$^{-}$)

(3/79, % 3.8), *v) E. coli* O157 (*eaeA*$^-$, *hly*$^+$, *stx1*$^-$, *stx2*$^-$, *lpfA1-3*$^+$, *espA*$^-$) (2/79, % 2.5) ve *vi) E. coli* O157 (*eae*γ_1^+, *hly*$^-$, *stx1*$^-$, *stx2*$^-$, *lpfA1-3*$^+$, *espA*$^-$) (1/79, % 1.3) olarak sınıflandırılmıştır.

Çizelge 3.2. *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7 izolatlarının moleküler karakterizasyonu.

İzolat[a]	n	Ay[b]	Yaş (ay)	Cinsiyet[c]	O157	H7	*eae*	*hly*	*stx*$_1$	*stx*$_2$	*lpf*	*espA*
4KA[*]	1	Haziran	< 6	D	+	-	γ_1	-	-	-	+	-
4K (B, C)[*]	2	Haziran	< 6	D	+	-	γ_1	+	-	-	+	-
5KA[*]	1	Haziran	< 6	D	+	-	γ_1	+	-	-	+	-
16KA	1	Ağustos	6 - 12	E	+	+	γ_1	+	-	-	+	+
24R (A, B)	2	Eylül	6 - 12	E	+	+	γ_1	+	-	-	+	+
26RA	1	Eylül	6 - 12	E	+	-	-	+	-	-	+	+
30RA	1	Ekim	6 - 12	E	+	-	-	+	-	-	+	+
30R (B, C)	2	Ekim	6 - 12	E	+	-	γ_1	+	-	-	+	+
32R (A, B)	2	Ekim	6 - 12	E	+	-	γ_1	+	-	-	+	+
34KA	1	Ekim	6 - 12	E	+	-	γ_1	+	-	-	+	+
44K (A, B, C, D, E)	5	Aralık	> 12	D	+	+	γ_1	+	-	*c*	+	+
46K (A, B, C, D)	4	Aralık	6 - 12	E	+	+	γ_1	+	-	*c*	+	+
46R (A, B, C, D, E)	5	Aralık	6 - 12	E	+	+	γ_1	+	-	*c*	+	+
47K (A, B, C, D)	4	Aralık	6 - 12	E	+	+	γ_1	+	-	*c*	+	+
47R (A, B, C, D, E)	5	Aralık	6 - 12	E	+	+	γ_1	+	-	*c*	+	+
49K (A, B, C, D, E)	5	Aralık	6 - 12	E	+	+	γ_1	+	-	*c*	+	+
51K (A, B, C, D, E)	5	Ocak	> 12	E	+	+	γ_1	+	-	*c*	+	+
71K (A, B, C, D, E)	5	Mart	> 12	E	+	+	γ_1	+	-	-	+	+
71R (A, B, C, D, E)	5	Mart	> 12	E	+	+	γ_1	+	-	-	+	+
72K (A, B, C, D, E)	5	Mart	> 12	E	+	+	γ_1	+	-	-	+	+
72R (A, B, C, D, E)	5	Mart	> 12	E	+	+	γ_1	+	-	-	+	+
95K (A, B, C, D, E)	5	Mayıs	6 - 12	E	+	+	γ_1	+	-	*c*	+	+
97K (A, B, C, D, E)	5	Mayıs	> 12	D	+	+	γ_1	+	-	*c*	+	+
98K (A, B)	2	Mayıs	> 12	D	+	+	γ_1	+	-	*c*	+	+

[a] K: KSS (karkas sünger sürüntüsü); R: RAMS (rektoanal mukozal svap)
[b] Mayıs - Ekim (Sıcak aylar); Kasım - Nisan (Soğuk aylar)
[c] D: dişi; E: erkek
[*] SF (sorbitol fermentasyon pozitif)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kırıkkale ilindeki mezbahada kesimi gerçekleştirilen koyunlarda bir yıl boyunca alınan örneklerin IMS bazlı kültür tekniği ile analizi sonucu toplam 100 adet koyunun 18'inde (% 18) *E. coli* O157 tespit edilmiştir. Etken, 100 koyunun 14 (% 14)'ünde karkastan, 8 (% 8)'inde ise RAMS örneklerinden izole ve identifiye edilmiştir. Sekiz koyun (% 8) karkas izolatının STEC O157:H7 olduğu tespit edilmiştir.

Dünyanın çeşitli ülkelerinde IMS bazlı kültür tekniği ile *E. coli* O157 izolasyonun yapıldığı çalışmalarda koyun karkas prevalansları bildirilmiştir. Buna göre; Chapman ve ark. (2001b) İngiltere'de inceledikleri kuzu karkas örneklerinin % 0.7 (10/1500)'sinde, Kalchayanand ve ark. (2007) ABD'de inceledikleri üç farklı mezbahadan elde edilen iç organ çıkarımı öncesi kuzu karkas örneklerinin % 3.5 (10/282)'inde, İrlanda'da Lenahan ve ark. (2007) karkas soğutma aşamasından önce temin edilen örneklerin % 1.5 (6/400)'inde, Prendergast ve ark. (2011) % 2.9 (3/103)'unda ve Thomas ve ark. (2012) % 0.6 (3/500)'sında, Mersha ve ark. (2009) Etiyopya'da karkasların yıkanmasından önce alınan örneklerin % 9.8 (11/112)'inde ve Avustralya'da Phillips ve ark. (2006; 2013) sırasıyla % 0.5 (6/1117) ve % 0.2 (3/1226)'sinde etkeni tespit etmişlerdir. Yapılan literatür taramalarında, Türkiye'de koyun karkaslarında *E. coli* O157 varlığına ilişkin bir rapora rastlanamamıştır. Ancak Alişarlı ve Akman (2004), IMS kullanmadan klasik kültür tekniği ile inceledikleri 150 koyun kıymasının 3 (% 2)'ünde etkeni tespit etmişlerdir. Bu çalışmadaki prevalansın tez çalışmasının bulgularına kıyasla daha düşük olmasının nedenleri arasında, Türkiye'de koyunlarda *E. coli* O157 prevalansının yıllar içerisinde yükselmiş olabileceği; tez çalışmasında izolasyon amacıyla seçilen IMS bazlı kültür tekniğinin, etkenin saptanmasında Alişarlı ve Akman'nın (2004) çalışmasında kullanılan klasik kültür tekniğine kıyasla daha yüksek etkinliğe sahip olması (Onoue ve ark., 1999; Chapman ve ark., 2001a) ve/veya etkenin araştırıldığı coğrafi bölgenin, örnek türünün ve mezbahalardaki hijyen uygulamalarının farklı olması gerekçeleri sayılabilir.

Bu çalışmada, önceki çalışmalara ait sonuçlara oranla karkas prevalansının yüksek bulunmasında en önemli faktörlerden birinin Türkiye'deki mezbahaların teknik ve hijyenik yetersizliği olduğu düşünülmektedir. Örneklerin toplanması sırasında gözlemlenen ve karkas kontaminasyonunu arttıracak uygulamalar arasında, personelin deri açma, ayak kesme ve anüsün çevre dokulardan ayrılması dahil kesim prosesi boyunca bütün hayvanlar için tek bir bıçak ile gerçekleştirmesi ve anüsün torba ile bağlanmaması sayılabilir. Örnek alınan toplam 4 koyunun (no. 46, 47, 71 ve 72) hem KSS hem de RAMS örneklerinden elde edilen izolatların tam olarak aynı virülens profiline sahip olması (Çizelge 3.2), bağırsak içeriği kaynaklı karkas kontaminasyonuna işaret ederek, kesim prosesi esnasındaki gözlemleri desteklemektedir. Koyun postunun kontaminasyon düzeylerinin araştırılması bu çalışmanın amaçları arasında yer almamaktadır. Ancak derinin yüzülmesi dahil koyun postuyla sıklıkla temas eden personelin el hijyeninin yetersizliğinin, yüksek oranda kontamine olabilen koyun postundan (Lenahan ve ark., 2007; Thomas ve ark., 2012) etkenlerin karkasa aktarılmasında önemli olabileceği düşünülmektedir. Nitekim, deri ile karkas kontaminasyon düzeyleri arasındaki korelasyon sığırlarda yapılan bir çalışma ile açıkça gösterilmiştir (Elder ve ark., 2000).

E. coli O157:H7'nin sığırlardaki kolonizasyon bölgesine ilişkin pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir ve primer kolonizasyon bölgesinin terminal rektumdaki, rekto-anal birleşim yerinin 2-5 cm proksimalinde yer alan, lenfoid folliküllerce zengin rektoanal mukoza olduğu bildirilmiştir (Naylor ve ark., 2003; Rice ve ark., 2003). Buna ilaveten, RAMS ile yapılan örneklemenin, rektumdan dışkı alınarak yapılan örneklemeden daha duyarlı, daha az maliyetli ve üstün olduğu da ifade edilmiştir (Davis ve ark., 2006; Lim ve ark., 2007a). Bu kapsamda, koyunlarda da RAMS örnekleme metodunu kullanan pek çok çalışma mevcuttur (Blanco ve ark., 2003; Chapman ve ark., 1997; Chapman ve ark., 2001b; Sheng ve ark., 2004). Nitekim Best ve ark., (2009) ile Walle ve ark. (2011)'nın sonuçları da koyunlarda *E. coli* O157:H7 kolonizasyon bölgesi olarak terminal rektum mukozasını işaret etmektedir.

Çalışmada koyun RAMS örneklerinin % 8'inde etkenin tespit edilmiş olması, koyunların *E. coli* O157 taşıyıcılığının yüksek olduğunu göstermiştir. Ankara'da koyun dışkı ve kolon dokusu örneklerinden IMS bazlı kültür tekniği ile % 6.4

(14/218) oranında etken tespit edilirken (Goncuoglu ve ark., 2010), bir diğer çalışmada Kırıkkale ilinde kesime getirilen sığırların RAMS örneklerinin % 4.2 (10/240)'sinde etken belirlenmiştir (Ayaz ve ark., 2014). Koyunların sığırlardan daha yüksek bir *E. coli* O157 prevalansına sahip olması, koyunların sığırlara kıyasla daha kalabalık ve sıkışık sürü özelliği göstermeleri ile açıklanabilir. Bu bağlamda Turutoglu ve ark. (2007), 15 farklı sürüden, sürünün % 5'ini temsil edecek şekilde rastgele örnekleme yaptıkları, toplam 175 koyunun *E. coli* O157 yönünden analiz edildiği çalışmada, örneklerin 16 (% 9.1)'sında etkene rastlamışlardır. Araştırmacılar, 7 (% 47) sürüdeki en az bir koyunun *E. coli* O157 yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir. İnfekte koyunların etkeni 2 ila 8 hafta arasında dışkıyla saçmaya devam ettikleri (Cornick ve ark., 2000) ve etkenin nemliliğe bağlı olarak çiftlikteki yüzeylerde 4 haftaya (Williams ve ark., 2005), koyun dışkısında ise 15 haftaya (Ogden ve ark., 2002) kadar canlılığını koruyabildiği bildirilmektedir. Bu nedenle, meralara çıkartılan infekte koyunların, hem sürü içi ve sürüler arası bulaşmada, hem de otlar uzadığında merada yayılacak sığırların infekte olmasında oldukça önemli rol oynayabilecekleri düşünülmektedir.

Dünyada çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar ışığında koyunların *E. coli* O157 taşıyıcılığına ilişkin bildirimler mevcuttur. Bu çalışmada koyunların *E. coli* O157 taşıyıcılığık oranı (% 8); İngiltere'de (% 0.7 ve % 0, Milnes ve ark., 2008; Alhelfi ve ark., 2013), Norveç'te (% 0, Johnsen ve ark., 2001), Hollanda'da (% 4, Heuvelink ve ark, 1998), İrlanda'da (% 0, Lenahan ve ark., 2007) ve İskoçya'da (% 6.5 ve % 5.8, Ogden ve ark., 2005; Solecki ve ark., 2009) ve ABD Virginia'da (% 1.7, Pao ve ark., 2005) bildirilen değerlerden yüksek bulunmuştur. Tez çalışmamdaki koyun prevalansı, iklim ve coğrafi konum olarak benzerlik gösteren İtalya (% 0.8, Battisti ve ark., 2006), İspanya (% 7.3, Oporto ve ark., 2008) ve Yunanistan (% 1.9, Pinaka ve ark., 2013) gibi ülkelerde elde edilen değerlerden yüksek bulunmasına karşın Meksika'da yürütülen bir çalışmadaki sonuçtan (% 17, Amezquita-Lopez ve ark., 2012) düşük bulunmuştur. Bildirilen çoğu çalışmada IMS bazlı kültür tekniği kullanılmış olduğundan, prevalanslarda izlenen farklılık ülkelere göre mera alanlarının kontaminasyon düzeylerinin farklı olmasıyla ilişkilendirilebileceği gibi çalışmalarda örneklenen hayvanların yaş grupları, cinsiyetleri ve örnekleme sezonu ile alakalı olabilir. Bu çalışmada belirlenen yaklaşık on koyundan birinin etkeni

taşıması ve mezbahadaki teknik ve hijyenik koşulların yetersizliği, karkas kontaminasyon düzeyinin yüksek olmasına sebep olmakta ve bu da halk sağlığı sorunu olarak kendini göstermektedir. Bu kapsamda mezbahaların teknik ve hijyenik yetersizliklerinin giderilmesi ve koyun karkas kontaminasyonunun azaltılabilmesi için kesim işleminde görev alan personelin bilinçlendirilmesi gerekmektedir.

Çalışmadaki amaçlardan bir diğeri, koyunlarda *E. coli* O157:H7 varlığının iklim ile olan ilişkisinin değerlendirilmesidir. Bu kapsamda, örneklenen hayvan sayısının bölge açısından sıcak (Mayıs-Ekim) ve soğuk (Kasım-Nisan) aylarda 50'şer adet olacak şekilde dağılımı sağlanmıştır. Sıcak aylarda (KSS ve RAMS) % 22 (11/50) olan tespit oranı, istatistiki olarak önemli bulunmamasına karşın soğuk aylarda % 14 (7/50) olarak tespit edilmiştir. Ancak hem RAMS pozitifliği bazında koyunların etkeni taşıma oranları değerlendirildiğinde, hem de karkaslarda etkenin bulunma oranı değerlendirildiğinde (sırasıyla, % 8'er ve % 14'er), iki mevsim grubunda hiç bir fark gözlenmemiştir (Çizelge 3.2). *E. coli* O157:H7 sığırlardaki varlığının sıcak aylarda soğuk aylara oranla daha yüksek seyrettiği uzun süredir bilinmektedir (Gyles, 2007). Hatta çeşitli hipotezler, bu fenomeni gün uzunluğu (Edrington ve ark., 2006) veya tiroid hormonları seviyesiyle (Schultz ve ark., 2005) ilişkilendirmektedir. Ancak bu değişkenlerin özellikle koyunlar için incelendiği bir çalışma henüz gerçekleştirilmemiştir. Kudva ve ark. (1997b), protein ve sindirilebilir enerjisi düşük, lif oranı yüksek çayır otu ile beslenen ve deneysel olarak infekte edilen koyunların, mısır ve yonca peletinden oluşan protein ve sindirilebilir enerjisi yüksek, lif oranı düşük yemle beslenen koyunlardan yaklaşık iki kat daha uzun süre ve daha yüksek düzeylerde *E. coli* O157:H7 saçtığını bildirmiştir. Etkenin prevalansında mevsimsel farklılıkların şekillenmesinde, meraların yetersiz olduğu özellikle soğuk aylarda, gebelik dönemiyle beraber konsantre yemlerle desteklenen koyunların, bahar döneminde meralara çıkmaya başlaması ve yüksek süt verimi için kaba yem ile desteklenmeleri etkili olabilecek faktörlerden biri olabilir. Nitekim yemler arası ani geçiş de *E. coli* O157:H7 saçılım süresi ve düzeyini etkilemektedir (Kudva ve ark., 1997b). Chapman ve ark. (1997) bir yıl süre ile inceleme yaptıkları sığır ve koyunlarda, sıcak aylarda prevalansın yükseldiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar toplam 1000 koyunun 22 (% 2.2)'sini etken yönünden pozitif bularak, bunların 17'sini yaz aylarında tespit etmiş, ancak mevsimsel varyasyonun önemli

olmadığını ifade etmişlerdir. Benzer şekilde Prendergast ve ark. (2011) toplam 10 koyun izolatının 6'sını yaz aylarında elde etmiştir. Sığır örneklerinde mevsimsel yönden farklılık gözlemlemiş olan Milnes ve ark. (2008), koyun ve domuzlarda böyle bir fark tespit etmemişlerdir. Bu çalışmalarda koyunlar için mevsimsel varyasyon önemli bulunmamasına rağmen, Kudva ve ark. (1996; 1997a) takip ettikleri 35 koyunluk sürüde, yaz aylarında belirgin şekilde yükselen bir prevalans belirtmişlerdir. Bu belirgin yükselişin temelinde, tez çalışmamdan farklı olarak, tek bir sürünün takip edilmesi ve sürü içi *E. coli* O157:H7 bulaşma dinamiğinin daha etkin olabileceği gibi faktörler rol oynamış olabilir. Tespit oranında önemli bir artış, Chapman ve ark. (2000) tarafından yaz girişinde örneklenen kuzu sosis ve burger köftelerinde de bildirilmiştir.

Sığırlarda *E. coli* O157:H7 varlığı yaş grupları ve cinsiyet ile ilişkilendirilmiştir. Bu kapsamda genel olarak sığırlar yaşlandıkça etken taşıyıcılıkları azalmaktadır. Özellikle sütten kesilen buzağılar ve danalarda (5-24 ay) prevalans % 12'ye ulaşırken, 2 yaş üstündeki hayvanlarda bu oran (% 2) ciddi olarak azalmaktadır (Rugbjerg ve ark., 2003). Battisti ve ark. (2006) 30 günlük süt kuzularında etkene hiç rastlamazken, 6 aydan küçük sütten kesilmiş kuzularda etkeni % 0.8 oranında tespit etmiştir. Heuvelink ve ark. (1998) ise, kuzularda ve koyunlarda etkeni sırasıyla; % 4.1 ve % 3.8 oranında tespit etmiştir. Çalışmada, 6 aydan küçük kuzularda etken RAMS örneklerinde hiç belirlenmemişken (0/18), 6-12 ay arası tokluların etkeni taşıyıcılığı (6/40, % 15) 12 aydan olgun koyunlardan (2/42, % 4.8) fazladır ($p>0.05$). Bu durum koyunlardaki *E. coli* O157:H7 taşıyıcılığının sığırlarınkine benzer olduğunu göstermektedir. Çalışmada elde edilen bulgular, genellikle kış ortasında (Aralık-Ocak) doğum yapan koyunların kuzularının sütten kesilme dönemleri, bahar sonu ve yaz başı gibi sıcaklıkların yükselmeye başladığı dönemlerle örtüşmektedir. Ancak yaş aralığının ve sıcaklık düzeylerinin koyunların *E. coli* O157:H7 taşıyıcılığı üzerine etkisinin belirlenebilmesi için daha kapsamlı çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada erkek hayvanlardaki *E. coli* O157 taşıyıcılığı (8/73, % 10.9), istatistiki olarak önemli olmamakla beraber, dişi hayvanlardaki orandan (0/27, % 0) daha yüksektir. Bu farklılığın istatistiki olarak önemsiz olması, örneklenen dişi hayvan sayısının az olmasından kaynaklanmaktadır. Koyunların etkeni taşıma

oranına ilişkin yapılan diğer çalışmalarda erkek ve dişi hayvanların karşılaştırıldığı bir veri bulunmamasına karşın, dişi sığırlarda daha yüksek oran bildirilmiştir (Rugbjerg ve ark., 2003). Yine Kırıkkale'de sığırlarla yapılan bir çalışmada erkek sığırların dişilerden daha yüksek oranda *E. coli* O157:H7 taşıdığı ancak farklılığın istatistiki olarak önemli bulunmadığı ifade edilmiştir (Ayaz ve ark., 2014). Koyunlarda cinsiyetin *E. coli* O157:H7 taşıyıcılığına etkisinin aydınlatılabilmesi için gelecekte benzer sayıda dişi ve erkek hayvanların örneklendiği çalışmalar gerçekleştirilmelidir.

Çalışmada elde edilen izolatların moleküler karakterizasyonu sonucunda, 79 izolattan hiç birinin, bazı çalışmalarla uyumlu (Battisti ve ark., 2006; Lenahan ve ark., 2009; Solecki ve ark., 2009; Amezquita-Lopez ve ark., 2012; Thomas ve ark., 2012) bazı çalışmalardan farklı olarak (Lenahan ve ark., 2007; Oporto ve ark., 2008; Pinaka ve ark., 2013) stx_1 barındırmadığı tespit edilmiştir. Ancak, 45 izolatın (% 57) $stx2_c$ barındırdığı ve dolayısıyla 8 koyunun (% 8) KSS örneklerinde STEC O157:H7 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.2). Friedrich ve ark. (2002), asemptomatik bireyler ile HUS veya HUS'la seyretmeyen diyareli hastalardan elde edilen 626 STEC etkeniyle yaptıkları çalışmada, *stx2* varyantlarının bulunuşu ile infeksiyonun klinik bulgularını ilişkilendirmiştir. Araştırma sonucunda $stx2_c$ barındıran suşların HUS şekillendirebileceği, buna karşın $stx2_d$ ve $stx2_e$ varyantlarını barındıran suşların daha düşük HUS riskine sebep olarak hafif bir hastalık tablosu şekillendirebileceğini ifade etmişlerdir. Benzer şekilde Lefebvre ve ark. (2009), $stx2_c$ barındıran STEC O157:H7 suşlarının, stx_1-stx_2 veya stx_1-$stx2_c$ barındıranlardan daha yüksek *in vitro* sitotoksisite gösterdiklerini bildirmiştir. *E. coli* O157:H7 suşlarının stx_2 barındırıp barındırmaması koyunlarda dışkıyla saçılım süresi ve düzeyini önemli ölçüde etkilememesine karşın (Cornick ve ark., 2007), Shiga toksin barındıran fajların, duyarlı ve virülent diğer *E. coli* serotiplerine horizontal olarak *stx* genlerini aktarması mümkün olmaktadır (Döpfer ve ark., 2010). Bu kapsamda, çalışmada 100 koyun karkasının 8'inde $stx2_c$ barındıran STEC O157:H7 tespit edilmiş olması, halk sağlığı açısından riskin oldukça yüksek olduğunu ve karkas kontaminasyonunun azaltılması için alınacak önlemlerin derhal uygulanmaya başlanması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

İntiminin ruminantlarda *E. coli* O157:H7 kolonizasyonunu kolaylaştırdığı (Cornick ve ark., 2002) ve varyantlarının insanlardaki doku tropizmini etkilediği

belirlenmiştir (Fitzhenry ve ark., 2002; Chong ve ark., 2007; Mundy ve ark., 2007). Koyun *E. coli* O157:H7 izolatlarında intimin varyantlarının araştırıldığı çalışmalar henüz oldukça sınırlıdır (Blanco ve ark., 2003). Adu-Bobie ve ark. (1998) ve Blanco ve ark. (2003) ile uyumlu olarak, bu çalışmada koyunlardan izole edilen ve intimin barındıran bütün *E. coli* O157 ve O157:H7 izolatlarının (% 97.4) *eae-γ1* varyantı barındırdığı tespit edilmiştir.

LEE patojenite bölgesinde yer alan ve *E. coli* O157:H7 bağırsak epiteline adezyonunda görev alarak ardı ardına polimerize olup bakteri hücresinden konak hücreye uzatılan EspA proteinlerinin oluşturduğu kanal (Knutton ve ark., 1998), efektör proteinler ve sıkı adezyonun şekillenmesi için gerekli intimin reseptörü olan Tir'in konak hücreye aktarılmasında oldukça yüksek öneme sahiptir. Lenahan ve ark. (2009) bazı koyun orijinli *E. coli* O157:H7 izolatlarında (6/33) *espA* genini tespit edemediklerini ve bu izolatların patojenitelerinin zayıf olabileceğini bildirmiştir. Bu çalışmada ise sadece Shigatoksijenik olmayan 4 SF *E. coli* O157 (4KA, 4KB, 4KC ve 5KA) izolatında *espA* tespit edilmemiştir. Bu veriler doğrultusunda, elde edilen *espA* bulunduran izolatların (% 94.9) AE lezyonlarının oluşumunda önemli bir diğer potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir.

Ruminantlarda etkenin bağırsaklara adezyonunda önemli rol alan, kuzularda *E. coli* O157:H7 kolonizasyonunun devamlılığına katkısı olduğu belirlenen ve insanlarda ince bağırsaklarda şekillenen AE lezyonlarının bölgesini etkileyebilen Lpf (Jordan ve ark., 2004; Fitzhenry ve ark., 2006; Torres ve ark., 2007), çalışmada izole edilen bütün *E. coli* O157 ve O157:H7'lerde tespit edilmiştir. Torres ve ark. (2009), Lpf'i şekillendiren genlerin tespitinin, intimin varyantları ile kombine olarak patojenik *E. coli* izolatlarının tanımlanmasında kullanılabileceğini ifade etmiştir. Bu kapsamda, çalışmada *lpfA1-3* geninin tespitine ilişkin kullanılan primer çiftleri, Torres ve ark. (2009) raporunu destekler şekilde bütün *E. coli* O157 suşlarında *eae-γ1* ile beraber pozitif sonuç vermiştir, yalnız iki izolatta (26RA ve 30RA) intimin tespit edilmemiştir.

E. coli O157:H7 hemolizini olan HlyA, bu çalışmada yalnız 1 SF *E. coli* O157 (4KA) dışında bütün izolatlarda tespit edilmiştir. *hlyA* (*ehxA*), bu çalışmayla uyumlu şekilde pek çok koyun kaynaklı *E. coli* O157:H7 izolatında yüksek oranlarda tespit edilmiştir (Chapman ve ark., 2001b; Blanco ve ark., 2003; Oporto ve ark.,

2008; Lenahan ve ark., 2007; Lenahan ve ark., 2009; Amezquita-Lopez ve ark., 2012). Bu durum, özellikle HUS şekillenen hastaların serum örneklerinin O157:H7 hemolizini ile reaksiyon vermesini (Schmidt ve ark., 1995) açıklar niteliktedir.

İlginç bir şekilde bu çalışmada, rastlantısal olarak 2 dişi kuzu karkasından 4 adet SF *E. coli* O157 (4KA-C ve 5KA) izole edilmiştir. Bu izolatlar her ne kadar SF *E. coli* O157 olmaları yönüyle Almanya'dan bildirilen SF *E. coli* O157:H$^-$'e benzelerse de (Karch ve Bielaszewska, 2001), sahip oldukları virülens genleri bazında stx_2 barındırmamaları ve hatta birinin (4KA) EHEC hemolizini barındırmaması yönüyle diğer çalışmlarda bildirilenlerden farklılık göstermektedir. Bu etkenlerin kuzu karkaslarındaki varlığının önemli bir risk oluşturduğu düşünülmemesine karşın, Shiga toksin kodlayan lambdoid profajların, hücreleri strese sokan çeşitli faktörler sonucu genomdan ayrılabildiği (Shaikh ve Tarr, 2003) ve dolayısıyla SF STEC O157'lere de rastlanabileceği unutulmamalıdır. Ayrıca bu çalışmada ve son yıllarda yapılan çalışmalarda (Karch ve Bielaszewska, 2001; Ayaz ve ark. 2014) SF *E. coli* O157'lerin de rapor ediliyor olması etkenin izolasyon prosedüründe sorbitol fermentasyonun ayırıcı bir özellik olarak kullanılmasının yeterli olup olmadığı konusunda şüpheler uyandırmaktadır.

Sonuç olarak, Kırıkkale ilinde mezbahaya getirilen koyunların % 8'inin *E. coli* O157 veya O157:H7 ile kolonize olarak etkeni taşıdıkları, % 14'ünün karkaslarında etkenin bulunduğu ve toplam % 8'inin karkasında halk sağlığı yönünden oldukça önemli ve tehlike arz eden STEC O157:H7 olduğu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda, hem koyunların etkeni yüksek oranda taşıdığı hem de mezbahalarda koyun karkaslarının yüksek oranda etken ile kontamine olabildikleri belirlenmiştir. Türkiye'de koyun rektoanal mukozal svap ve karkaslarının *E. coli* O157 ve O157:H7 ile kontaminasyon oranlarının ilk kez belirlendiği bu çalışma, kesim hijyeninin sağlanmasının ve kesim prosesinde karkasın dışkı ile kontaminasyonunun önlenmesin önemini ortaya koyar niteliktedir.

Koyunların etkeni taşıyıcılığı yönünden mevsimin veya cinsiyetin önemli bir fark oluşturmadığı tespit edilmiş olmasına karşın, etken 6 aydan olgun ve 1 yaşından genç hayvanlarda daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Yüksek karlılığı nedeniyle yetiştiriciler tarafından sık tercih edilebilen toklu besisi, bu yönüyle *E. coli* O157:H7 infeksiyonları riskini arttırabilmektedir.

Koyunların % 18'inde IMS bazlı kültür tekniği ile izole edilerek, PCR ile moleküler karakterizasyonları gerçekleştirilen 79 *E. coli* O157 izolatın büyük bir bölümünün, insanlardaki infeksiyonun patogenezinde rol oynayan önemli virülens genlerine sahip olduğu ve bu anlamda çiğ veya yetersiz pişirilmiş koyun etlerinin halk sağlığı açısından oldukça yüksek risk taşıdığı düşünülmektedir.

Koyun ve koyun etlerinin yüksek oranda *E. coli* O157:H7 ile kontamine olabileceği göz önünde bulundurularak; gıda güvenilirliği açısından mezbahaların hijyenik ve teknik şartlarının resmi otoriteler tarafından iyileştirilmesi, mezbahalarda çalışan personelin eğitilerek karkas kontaminasyonunun en düşük düzeyde tutulabilmesi için personelde gerekli duyarlılığın ve bilincin oluşturulması, koyun eti ve koyun etinden üretilen ürünlerin yeterli ısı işlemi gördüğünden emin olunması, tüketime hazır gıdaların ve bu gıdaları hazırlamada kullanılan mutfak gereçlerinin çiğ kuzu/koyun eti ile temasının engellenmesi, koyunlarla (alım/satım pazarları, kurbanlık bölgeleri ve çiftlikler gibi) temastan sonra ellerin iyice yıkanması, koyunların gezinebileceği mera/çayır gibi alanlarda hijyen uygulamalarının titizlikle gerçekleştirilmesi ve koyun dışkısının doğrudan tarım alanlarının gübrelenmesi amacıyla kullanılmaması, koyun kaynaklı *E. coli* O157:H7 infeksiyonlarından korunma ve kontrolde alınması gereken önemli tedbirlerdendir.

KAYNAKLAR

ABE A, GRADO M, PFUETZNER RA, SANCHEZ-SANMARTIN C, DEVINNY R, PUENTE JL, STRYNADKA NCJ, FINLAY BB (1999) Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion. *Molecular Microbiology*, 33, 1162-1175.

ACHESON DWK, KEUSCH GT (1996) Which Shiga toxin-producing types of *E. coli* are important? *American Society for Microbiology News*, 62, 3012-306.

ADU-BOBIE J, FRANKEL G, BAIN C, GONCALVES AG, TRABULSI LR, DOUCHE G, KNUTTON S, DOUGAN G (1998) Detection of intimins α, β, γ, and δ, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 662-668.

AERTSEN A, FASTER D, MICHIELS CW (2005) Induction of shiga toxin-converting phage in *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1155-1162.

ALHELFI NA, ADAM H, JONES DL, WILLIAMS AP (2013) Absence of *E. coli* O157:H7 in sheep and cattle faeces in North Wales. *Veterinary Record*, doi: 10.1136/vr.101660.

ALİŞARLI M, AKMAN HN (2004) Perakende satılan kıymaların *Escherichia coli* O157 yönünden incelenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15, 65-69.

AMEZGUITA-LOPEZ BA, QUINONES B, COOLEY MB, LEON-FELIX J, CASTRO-del C, MADRELL RE, JIMENEZ M, CHAIDEZ C (2012) Genotypic analyses of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 recovered from feces of domestic animals on rural farms in Mexico. *PLOS One*, 12, e51565.

AN H, FAIRBROTHER JM, DESAUTELS C, HAREL J (1999) Distribution of a novel locus called Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 473, 179-184.

ANAND SK, GRIFFITHS (2003) Quorum sensing and expression of virulence in *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 1-9.

ANONİM (1996) Pathogen reduction, Hazard analysis and critical control points (HACCP) systems; Final rule. United States Department of Agriculture, 9 CFR Part 304, p:38806-38989.

ANONİM (2001a) Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. *International Standards*, ISO 16654:2001(E).

ANONİM (2001b) The Commission of European Communities. Commission decision of 8 June 2001, 2001/471/EC. *Official Journal of the European Communities*, L165, 48-53.

ANONİM, 2013. FAO Statistical Yearbook 2012. Europe and Central Asia Food and Agriculture, Rome, Italy.

AKSOY A, YILDIRIM M, KAÇMAZ B, APAN TZ, GÖÇMEN JS (2007) Verotoxin production in strains of *Escherichia coli* isolated from cattle and sheep, and their resistance to antibiotics. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 31, 225-231.

ASAKURA H, MAKINO S, SHIRAHATA T, TSUKAMOTO T, KURAZONO H, IKEDA T, TAKESHI K (1998) Detection and genetical characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from wild deer. *Microbiology and Immunology*, 42, 815-822.

AUGER EA, REDDING KE, PLUMB T, CHILDS LC, MENG SY, BENNETT GN (1989) Construction of lac fusions to the inducible arginine and lysine decarboxylase genes of *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, 3, 609-620.

AYAZ ND, GENCAY YE, EROL I (2014) Prevalence and molecular characterization of sorbitol fermenting and non-fermenting *Escherichia coli* O157:$H7^{+}$/$H7^{-}$ isolated from cattle at slaughterhouse and slaughterhouse wastewater. *International Journal of Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.002.

BARDIAU M, SZALO M, MAINIL JG (2010) Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. *Veterinary Research*, 41, 57.

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

BATISSON I, GUIMOND MP, GIRARD F, AN H, ZHU C, OSWALD E, FAIRBROTHER JM, JACQUES M, HAREL J (2003) Characterization of the novel factor Paa involved at the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 71, 4516-4525.

BATTISTI A, LOVARI S, FRANCO A, di EGIDIO A, TOZZOLI R, CAPRIOLI A, MORABITO S (2006) Prevalence of *Escherichia coli* O157 in lams at slaughter in Rome, central Italy. *Epidemiology and Infection*, 134, 415-419.

BÄUMLER AJ, HEFFRON F (1995) Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 177, 2087-2097.

BÄUMLER AJ, TSOLIS RM, HEFFRON F (1996) The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 279-283.

BELONGIA EA, OSTERHOLM MT, SOLER JT, AMMEND DA, BRAUN JE, MACDONAL KL (1993) Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. *The Journal of the American Medical Association*, 269, 883-888.

BEST A, LA RAGIONE RM, SAYER AR, WOODWARD MJ (2005) Role for flagella but not intimin in the persistent infection of the gastrointestinal tissues of specific-pathogen-free chicks by shiga toxin-negative *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*, 73, 1836-1846.

BEST A, CLIFFORD D, CRUDGINGTON B, COOLEY WA, NUNEZ A, CARTER B, WEYER U, WOODWARD MJ, LA RAGIONE RM (2009) Intermittent *Escherichia coli* O157:H7 colonization at the terminal rectum mucosa of conventionally-reared lambs. *Veterinary Research*, 40, 09.

BEUTIN L, MONTENEGRO MA, ØRSKOV I, ØRSKOV F, PRADA J, ZIMMERMANN SSTEPHAN R (1989) Close association of verotoxin (shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 2559-2564.

BEUTIN L, GEIER D, ZIMMERMANN S, KARCH H (1995) Virulence markers of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains from healthy domestic animals of different species. *Journal of Clinical Microbiology,* 33, 631-635.

BINNIGTON B, LINGWOOD D, NUTIKKA A, LINGWOOD CA (2002) Effect of globotriaosyl ceramide fatty acid α-hydroxylation on the binding by verotoxin 1 and verotoxin 2. *Neurochemical Research*, 27, 807-813.

BIELASZWESKA M, SCHMIDT H, LIESEGANG A, PRAGER R, RABSCH W, TSCHALPE H, CIZEK A, JANDA J, BLAHOVA K, KARCH H (2000) Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H^- and a source of human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3470-3473.

BIELASZWESKA M, MELLMANN A, ZHANG W, KÖCK R, FRUTH A, BAUWENS A, PETERS G, KARCH H (2011) Characterization of *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11, 671-676.

BLANCO M, BLANCO JE, MORA A, REY J, ALONSO JM, HERMOSO M, HERMOSO J, ALONSO MP, DAHBI G, GONZALES EA, BERNARDEZ MI, BLANCO J (2003) Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from health sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1351-1356.

BLANCO M, BLANCO JE, MORA A, DAHBI G, ALONSO MP, GONZALEZ EA, BERNARDEZ MI, BLANCO J, (2004) Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin gene (*eae*-ξ). *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 645-651.

BONO JL, SMITH TPL, KEEN JE, HARHAY GP, McDANELD TG, MANDRELL RE, JUNG WK, BESSER TE, GERNER-SMIDT P, BIELASZWESKA M, KARCH H, CLAWSON ML (2012) Phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 isolated from cattle and clinically ill humans. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 2047-2062.

BRUNDER W, SCHMIDT H, KARCH H (1996) KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology*, 142, 3305-3315.

BRUNDER W, SCHMIDT H, KARCH H (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Molecular Microbiology*, 24, 767-778.

BURLAND V, SHAO Y, PERNA NT, PLUNKETT G, SOFIA HJ, BLATTNER FR (1998) The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acid Research*, 26, 4196-4204.

BÜRK C, DIETRICH R, AÇAR G, MORAVEK M, BÜLTE M, MÄRTLBAUER E (2003) Identification and characterization of a new variant of shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2106-2112.

CALDERWOOD SB, MEKALANOS JJ (1987) Iron regulation of shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *Journal of Bacteriology*, 169, 4759-4764.

CAMPELLONE KG, RANKIN S, PAWSON T, KIRSCHNER MW, TIPPER TJ, LEONG JM (2004) Clustering of Nck by a 12-residue Tir phosphopeptide is sufficient to trigger localized actin assembly. *Journal of Cell Biology*, 164, 407-416.

CASTANIE-CORNET MP, PENFOUND TA, SMITH D, ELLIOTT JF, FOSTER JW (1999) Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181, 3525-3535.

CASTELLANI A, CHALMERS AJ (1919) Manual of Tropical Medicine, 3rd ed, Williams Wood and Co., New York, p: 941.

CASTILLO A, EGUIARTE LE, SOUZA V (2005) A genomic population genetics analysis of the pathogenic enterocyte effacement island in *Escherichia coli*: the search for the unit of selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 1542-1547.

CDC (1982) Epidemiologic Notes and Reports Isolation of *E. coli* 0157:H7 from Sporadic Cases of Hemorrhagic Colitis -- United States. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 31, 580-585.

CHAPMAN PA, SIDDONS CA, CERDAN MALO AT, HARKIN MA (1997) A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiology and Infection*, 119, 245-250.

CHAPMAN PA, SIDDONS CA, CERDAN MALO AT, HARKIN MA (2000) A one year study of *Escherichia coli* O157 in raw beef and lamb products. *Epidemiology and Infection*, 124, 207-213.

CHAPMAN PA, ELLIN M, ASHTON R (2001a) A comparison of immunomagnetic seperation and culture, Reveal and VIP for the detection of *E. coli* O157 in enrichment cultures of naturally-contaminated raw beef, lamb and mixed meat products. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 171-175.

CHAPMAN PA, CERDAN MALO AT, ELLIN M, ASHTON R, HARKIN MA (2001b) *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorksire, UK. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 139-150.

CHEKABAB SM, PAQUIN-VEILLETTE J, DOZOIS CM, HAREL J (2013) The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiology Letters*, 341, 1-12.

CHONG Y, FITZHENRY R, HEUSCHKEL R, TORRENTE F, FRANKEL G, PHILLIPS AD (2007) Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7 - initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion *ex vivo*. *Microbiology*, 153, 794-802.

CRAIG LM, PIQUE ME, TAINER JA (2004) Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 363-378.

CRAWFORD JA, BLANK TE, KAPER JB (2002) The LEE-encoded type-III secretion system in EPEC and EHEC: Assembly, function and regulation. In: *Escherichia coli*: Virulence mechanism of a versatile pathogen. Ed: MICHAEL S. DONNENBERG, Academic Press, San Diego, p: 337-359.

COOKSON AL, BENNETT J, THOMSON-CARTER F, ATTWOOD GT (2007) Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (EhxA) from shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli. Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6360-6369.

CORNICK NA, BOOHER SL, CASEY TA, MOON HW (2000) Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4926-4934.

CORNICK NA, BOOHER SL, MOON HW (2002) İntimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. *Infection and Immunity*, 70, 2704-2707.

CORNICK NA, HELGERSON AF, SHARMA V (2007) Shiga toxin and Shia toxin-encoding phage do not facilitate *Escherichia coli* O157:H7 colonization of sheep. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 344-346.

DAVIS MA, RICE DH, SHENG H, HANCOCK DD, BESSER TE, COBBOLD R, HOVDE CJ (2006) Comparison of cultures from rectoanal-junction mucosal swaps and feces for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy heifers. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3766-3770.

DEAN-NYSTROM EA, BOSWORTH BT, MOON HW, O'BRIEN AD (1998) *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. *Infection and Immunity*, 66, 4560-4563.

van DIEMEN PM, DZIVA F, STEVENS MP, WALLIS TS (2005) Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- genes required for intestinal colonization in calves. *Infection and Immunity*, 73, 1735-1743.

DIPINETO L, SANTANIELLO A, FONTANELLA M, LAGOS K, FIORETTI A, MENNA LF (2006) presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. *Letters of Applied Microbiology*, 43, 293-295.

DONNENBERG MS (2002) Introduction. In: *Escherichia coli*: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen. Ed. MICHAEL S. DONNENBERG, Academic Press, San Diego, p: xxi-xxv.

DONNENBERG MS, YU J, KAPER JB (1993) A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Journal of Bacteriology*, 175, 4670-4680.

DOUGHARI JH, NDAKIDEMI PA, HUMAN IS, BENNADE S (2009) Shiga toxins (Verocytotoxins). *African Journal of Microbiological Research*, 3, 681-693.

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

DOYLE MP, PADHYE VV (1989) *Escherichia coli*. In: Foodborne Bacterial Pathogens. Ed. MICHAEL P. DOYLE, Marcel Dekker, New York, p: 235-282.

DOYLE ME, ARCHER J, KASPAR CW, WEISS R (2006) Human illness caused by *E. coli* O157:H7 from food and non-food sources. *Food Research Institute Briefings*, University of Wisconsin, US. [Electronic Journal] Erişim: (https://fri.wisc.edu/fs_reviews.php?brief=4).

DÖPFER D, SEKSE C, BEUTIN L, SOLHEIM H, WAL FJ, BOER A, SLETTEMEÅS JS, WASTESON Y, URDAHL AM (2010) Pathogenic potential and horizontal gene transfer in ovine gastrointestinal *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1552-1562.

DUNN JR, KEEN JE, MORELAND D, THOMPSON RA (2004) Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer from Louisiana. *Journal of Wildlife Diseases*, 40, 361–365.

DZIVA F, van DIEMEN PM, STEVENS MP, SMITH AJ, WALLIS TS (2004) Identification of *Escherichia coli* O157:H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology*, 150, 3631-3645.

DZIVA F, MAHAJAN A, CAMERON P, CURRIE C, MCKENDRICK IJ, WALLIS TS, SMITH DGE, STEVENS MP (2007) EspP, a type-V secreted serine protease of enterohemorrhagic

Escherichia coli O157:H7, influences intestinal colonization of calves and adherence to bovine primary intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters*, 271, 258-265.

EASTON DM, TOTSIKA M, ALLSOPP LP, PHAN MD, IDRIS A, WURPEL DJ, SHERLOCK O, ZHANG B, VENTURINI C, BEATSON SA, MAHONY TJ, COBBOLD RN, SCHEMBRI MA (2011) Characterization of EhaJ, a new autotransporter protein from enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 2, 120.

EBEL F, PODZADEL T, ROHDE M, KRESSE AU, KRÄMER S, DEIBEL C, GUZMAN CA, CHAKRABORTY T (1998) Initial binding of shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. *Molecular Microbiology*, 30, 147-161.

EDRINGTON TS, CALLAWAY TR, IVES SE, ENGLER MJ, LOOPER ML, ANDERSON RC, NISBET DJ (2006) Seasonal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants: a new hypothesis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3, 413-421.

EKLUND M, LEINO K, SIITONEN A (2002) Clinical *Escherichia coli* strains carrying *stx* genes: *stx* variants and *stx*-positive virulence profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4585-4592.

ELDER RO, KEEN JE, SIRAGUSA GR, BARKOCY-GALLAGHER GA, KOOHMARAIE M, LAEGREID WW (2000) Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides and carcasses of beef cattle during processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 2999-3003.

ELLIOTT SJ, WAINWRIGHT LA, MCDANIEL TK, JARVIS KG, DENG Y, LAI LC, MCNAMARA BP, DONNENBERG MS, KAPER JB (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Molecular Microbiology*, 28, 1-4.

ENDO Y, TSURUGI K, YUTSUDO T, TAKEDA Y, OGASAWARA T, IGARASHI K (1988) Site of action of vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of shiga toxin on eukaryotic ribosomes. *European Journal of Biochemistry*, 171, 45-50.

ERDEM AL, AVELINO F, XICOHTENCATL-CORTES J, GIRON JA (2007) Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189, 7426-7435.

ERDOĞAN H, LEVENT B, ERDOĞAN A, GÜLEŞEN R, ARSLAN H (2011) Gastroenteritli olgularda verotoksijenik *Escherichia coli* O157:H7 insidansının araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 45, 519-525.

EROL I, JEONG KC, BAUMLER DJ, VYKHODEST B, CHOI SH, KASPAR CW (2006) H-NS controls metabolism and stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7 that influence mouse passage. *BMC Microbiology*, 15, 72.

EROL İ (2007) Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi, 1. baskı, Pozitif Matbaacılık, s: 78-92.

ETIENNE-MESMIN L, CHASSAING B, SAUVANET P, DENIZOT J, BLANQUET-DIOT S, DARFEUILLE-MICHAUD A, PRADEL N, LIVRELLI V (2011) Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *PLoS One*, 6, e23594.

FALGUIERES T, MAAK M, VON WEYHEM C, SARR M, SASTRE X, POUPON MF, ROBINE S, JOHANNES L, JANSSEN KP (2008) Human colorectal tumors and metastases express Gb3 and can be targeted by an intestinal pathogen-based delivery tool. *Molecular Cancer Therapy*, 7, 2498-2508.

FAOSTAT, 2013. Erişim: (www.fao.org), Erişim tarihi: 27.11.2013.

FARFAN MJ, CANTERO L, VIDAL R, BOTKIN DJ, TORRES AG (2011) Long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 bind to extracellular matrix proteins. *Infection and Immunity*, 79, 3744-3750.

FARFAN MJ, TORRES AG (2012) Molecular mechanisms mediating colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infection and Immunity*, 80, 903-913.

FENG P, LAMPEL KA, KARCH H, WHITTAM TS (1998) Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *The Journal of Infectious Diseases*, 177, 1750-1753.

FITZHENRY RJ, PICKARD DJ, HARTLAND EL, REECE S, DOUGAN G, PHILLIPS AD, FRANKEL G (2002) Intimin types influences the site of human intestinal mucosal colonization by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut*, 50, 180-185

FITZHENRY R, DAHAN S, TORRES AG, CHONG Y, HEUSCHKEL R, MURCH SH, THOMSON M, KAPER JB, FRANKEL G, PHILLIPS AD (2006) Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7. *Microbes and Infection*, 8, 1741-1749.

FRANKEL G, CANDY DCA, FABIANI E, ADU-BOBIE J, GIL S, NOVAKOVA M, PHILLIPS AD, DOUGAN G (1995) Molecular characterization of a carboxy-terminal eukaryotic-cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 63, 4323-4328.

FRANKEL G, LIDER O, HERSHKOVIZ R, MOULD AP, KACHALSKY SH, CANDY DCA, CAHALON L, HUMPHRIES MJ, DOUGAN G (1996) The cell-binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to β_1 integrins. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 20369-20364.

FRASER ME, FUJINAGA M, CHERNEY MM, MELTON-CELSA AR, TWIDDY EM, O'BRIEN AD, JAMES MNG (2004) Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *The Journal of Biochemical Chemistry*, 279, 27511-27517.

FRATAMICO PM, BAGI LK, PEPE T (2000) A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in foods and bovine feces. *Journal of Food Protection*, 63, 1032-1037.

FRIEDRICH AW, BIELASZEWSKA M, ZHANG WL, PULZ M, KUCZIUS T, AMMON A, KARCH H (2002) *Escherichia coli* harboring shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *The Journal of Infectious Diseases*, 185, 74-84.

FUKUSHIMA H, HOSHINA K, GOMYODA M (1999) Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in cattle feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5177-5181.

GARMENDIA J, FRANKEL G, CREPIN VF (2005) Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: Translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity*, 73, 2573-2385.

GARRED O, VAN DEURS B, SANDVIG K (1995) Furin induced cleavage and activation of shiga toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 10817-10820.

GARRIDO P, BLANCO M, MORENO-PAZ M, BRIONES C, DAHBI G, BLANCO J, BLLANCO J, PARRO V (2006) STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal shiga toxin–producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clinical Chemistry*, 52, 192-201.

GIRON JA, HO AS, SCHOOLNIK GK (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 254, 710-713.

GIRON JA, TORRES AG, FREER E, KAPER JB (2002) The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 44, 361-379.

GOLDBERG MB, BOYKO SA, BUTTERTON JR, STOEBNER JA, PAYNE SM, CALDERWOOD SB (1992) Characterization of *Vibrio cholerae* virulence factor homologous to family of Ton-B dependent proteins. *Molecular Microbiology*, 6, 2407-2418.

GONCUOGLU M, ORMANCI FSB, AYAZ ND, EROL I (2010). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from cattle and sheep. *Annals of Microbiology*, 60, 489-494.

GOODSON M, ROWBURY RJ (1989) Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sub-lethal acid pH value. *Letters in Applied Microbiology*, 8, 77-79.

GORDEN J, SMALL P (1993) Acid resistance in enteric bacteria. *Infection and Immunity*, 61, 364-367.

GOURMELON M, MONTET MP, LOZACH S, LE MENNEC C, POMMEPUY M, BEUTIN L, VERNOZY-ROZAND C (2006) First isolation of shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 85-97.

GÖKÇE E, ÜNVER A, ERDOĞAN HM (2010) İshalli neonatal kuzularda enterik patojenlerin belirlenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16, 717-722.

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

GRIF K, DIERICH MP, KARCH H, ALLERBERGER F (1998) Strain-specific differences in the amount of shiga toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17, 761-766.

GRYS TE, SIEGEL MB, LATHEM WW, WELCH RA (2005) The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infection and Immunity*, 73, 1295-1303.

GYLES CL (2007) Shiga-toxin producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Sciences*, 85, E45-E62.

HANSEN AM, QIU Y, YEH N, BLATTNER FR, DURFEE T, JIN DJ (2005) SspA is required for acid resistance in stationary phase by downregulation of H-NS in *Escherichia coli. Molecular Microbiology*, 56, 719-734.

HAUSWALDT S, NITSCHKE M, SAYK F, SOLBACH W, KNOBLOCH JKM (2013) Lessons learned form outbreaks of Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Current Infectious Disease Reports*, 15, 4-9.

HENDERSON IR, NAVARRO-GARCIA F, DESVAUX M, FERNANDES RC, ALA'ALDEEN D (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Microbiology Reviews*, 68, 692-744.

HENGGE-ARONIS R (1993) Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli. Cell*, 72, 165-168.

HEROLD S, KARCH H, SCHMIDT H (2004) Shiga toxin-encoding bacteriophages - genomes in motion. *International Journal of Medical Microbiology*, 294, 115-121.

HERSH BM, FAROOG FT, BARSTAD DN, BLANKENHORN DL, SLONCZEWSKI JL (1996) A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178, 3978-3981.

HEUVELINK AE, van den BIGGELAAR FLAM, de BOER E, HERBES RG, MELCHERS WJG, HUIS IN'T VELD JHJ, MONNENS LAH (1998) Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 878-882.

HEUVELINK AE, ZWARTKRUIS-NAHUIS JTM, van den BIGGELAAR FLAM, van LEEUWEN WJ, AND DE BOER E (1999) Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 67-75.

HUSSEIN HS (2007) Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *Journal of Animal Science*, 85, E63-E72.

HUSSEIN HS, SAKUMA T (2005) Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *Journal of Dairy Science*, 88, 450-465.

IMBERECHTS H, DE GREVE H, LINTERMANS P (1992) The pathogenesis of edema disease in swine. *Veterinary Microbiology*, 31, 221-233.

ITO H, TERAI A, KURAZONO H, TAKEDA Y, NISHIBUCHI M (1990) Cloning and nucleotid sequencing of vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microbial Pathogenesis*, 8, 47-60.

IYODA S, HONDA N, SAITOH T, SHIMUTA K, TERAJIMA J, WATANABE H, OHNISHI M (2011) Coordinate control of the locus of enterocyte effacement and enterohemolysin genes by multiple common virulence regulators in enterohemorrhagic *Escherichia coli. Infection and Immunity*, 79, 4628-4637.

JACEWICZ MS, MOBASSALEH M, GROSS SK, BALASUBRAMANIAN KA, DANIEL PF, RAGHAVAN S, MCCLUER RH, KEUSCH GT (1994) Pathogenesis of *Shigella* diarrhea: XVII. A mammalian cell membrane glycolipid, Gb3, is required but not sufficient to confer sensitivity to shiga toxin. *The Journal of Infectious Diseases*, 169, 538-546.

JACKSON MP, NEILL RJ, O'BRIEN AD, HOLMES RK, NEWLAND JW (1987) Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiology Letters*, 44, 109-114.

JANDHYALA DM, ROGERS TJ, KANE A, PATON AW, PATON JC, THORPE CM (2010) Shiga toxin 2 and flagellin from shiga-toxigenic *Escherichia coli* superinduce interleukin-8 through synergistic effects on host stress-activated protein kinase activation. *Infection and Immunity*, 78, 2984-2994.

JARVIS KG, GIRON JA, JERSE AE, MCDANIEL TK, DONNENBERG MS, KAPER JB (1995) Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 7996-8000.

JENKE C, LEOPOLD SR, WENIGER T, ROTHGÄNGER J, HARMSEN D, KARCH H, MELLMANN A (2012) Identification of intermediate in evolutionary model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Emerging Infectious Disease*, 18, 582-588.

JEONG KC, KANG MY, HEIMKE C, SHERE JA., EROL I, KASPAR CW (2007) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from the gall bladder of inoculated and naturally-infected cattle. *Veterinary Microbiology*, 119, 339-345.

JERSE AE, YU J, TALL BD, KAPER JB (1990) 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 of the United States of America*, 87, 7839-7843.

JOHANNES L, RÖMER W (2010) Shiga toxins - from cell biology to biomedical applications. *Nature Reviews*, 8, 105-116.

JOHNSEN G, WASTESON Y, HEIR E, BERGET OI, HERIKSTAD H (2001) *Escherichia coli* O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 193-200.

JORDAN DM, CORNICK N, TORRES AG, DEAN-NYSTROM EA, KAPER JB, MOON HW (2004) Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo. *Infection and Immunity*, 72, 6168-6171.

JORES J, ZEHMKE K, EICHBERG J, RUMER L, WIELER LH (2003) Description of a novel intimin variant (type zeta) in the bovine O84:NM verotoxin-producing *Escherichia coli* strain 537/89 and the diagnostic value of intimin typing. *Experimental Biology and Medicine*, 228, 370-376.

JUMPERTZ T, CHERVAUX C, RACHER K, ZOUHAIR M, BLIGHT MA, HOLLAND IB, SCHMITT L (2010) Mutations affecting the C terminus of *Escherichia coli* hemolysin A reduce hemolytic activity by altering the folding of the toxin. *Microbiology*, 156, 2495-2505.

KALCHAYANAND N, ARTHUR TM, BOSILEVAC JM, BRICHTA-HARHAY DM, GUERINI MN, SHACKELFORD SD, WHEELER TL, KOOHMARAIE M (2007) Microbiological characterization of lab carcasses at commercial processing plants in the United States. *Journal of Food Protection*, 70, 1811-1819.

KARCH H, RUSSMANN H, SCHMIDT H, SCHWARZKOPF A, HEESEMANN J (1995) Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1602-1605.

KARCH H, SCHMIDT H, JANETZKI-MITTMANN C, SCHEEF J, KRÖGER M (1999) Shiga toxins even when different are encoded at identical positions in the genomes of related temperate bacteriophages. *Molecular and General Genetics,* 262, 600-607.

KARCH H, BIELASZEWSKA M (2001) Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H$^-$ strains: Epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2043-2049.

KARMALI MA, STEELE BT, PETRIC M, LIM C (1983) Sporadic cases of haemolytic-uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*, 2, 619-620.

KARMALI MA (1989) Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2, 15-38.

KEEN, JE, WITTUM JE, DUNN JR, BONO JL, DURSO LM (2006) Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 in agricultural fair livestock, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 780-786.

KENDALL MM, GRUBER CC, RASKO DA, HUGHES DT, SPERANDIO V (2011) Hfq virulence regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain 86-24. *Journal of Bcteriology*, 193, 6843-6851.

KENNY B, LAI LC, FINLAY BB, DONNENBERG MS (1996) EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 22, 313-323.

KENNY B, DEVINNY R, STEIN M, REINSCHEID DJ, FREY EA, FINLAY BB (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*, 91, 511-520.

KIARASH A, BOYD B, LINGWOOD CA (1994) Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially recognize different globotriosyl ceramide fatty acid homologues. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 11138-11146.

KLAPPROTH JMA, SCALETSKY ICA, MCNAMARA BP, LAI LC, MALSTROM C, JAMES SP, DONENBERG MS (2000) A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infection and Immunity*, 68, 2148-2155.

KNUTTON S, ROSENSHINE I, PALLEN MJ, NISAN I, NEVES BC, BAIN C, WOLFF C, DOUGAN G, FRANKEL G (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *The EMBO Journal*, 17, 2166-2176.

KOKAI-KUN JF, MELTON-CELSA AR, O'BRIEN AD (2000) Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of shiga toxin type 2d. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 3713-3721.

KONOWALCHUK J, SPEIRS JI, STAVRIC S (1977) Vero response to cytotoxin of *Escherichia coli. Infection and Immunity*, 18, 775-779.

KRESSE AU, ROHDE M, GUZMAN CA (1999) The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. *Infection and Immunity*, 67, 4834-4842.

KUDVA IT, HATFIELD PG, HOVDE CJ (1996) *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 431-433.

KUDVA IT, HATFIELD PG, HOVDE CJ (1997a) Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 892-899.

KUDVA IT, HUNT CW, WILLIAMS CJ, NANCE UM, HOVDE CJ (1997b) Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3878-3886.

LAABERKI MH, JANABI N, OSWALD E, REPOILA F (2006) Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: Interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 197-210.

LAI LC, WAINWRIGHT LA, STONE KD, DONENBERG MS (1997) A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infection and Immunity*, 65, 2211-2217.

LATHEM WW, GRYS TE, WITOWSKI SE, TORRES AG, KAPER JB, TARR PI, WELCH RA (2002) StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Molecular Microbiology*, 45, 277-288.

LATHEM WW, BERGBAKEN T, WELCH RA (2004) Potentiation of C1 esterase inhibitor by StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7. *The Journal of Experimental Medicine*, 199, 1077-1087.

LAUVRAK SU, WÄLCHLI S, IVERSEN TG, SLAGSVOLD HH, TORGERSEN ML, SPIELSBERG B, SANDVIG K (2006) Shiga toxin regulates its own entry in a Sky-dependent manner. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 1096-1109.

LAW D (2000) Virulence factors of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 729-745.

LEBLANC JJ (2003) Implications of virulence factors in *Escherichia coli* O157:H7 pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*, 29, 277-296.

LECLERC S, BOERLIN P, GYLES C, DUBREUIL JD, MOUREZ M, FAIRBROTHER JM, HAREL J (2007) *paa*, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. *Research in Microbiology*, 158, 97-104

LEDESMA MA, OCHOA SA, CRUZ A, ROCHA-RAMIREZ LM, MAS-OLIVA J, ESLAVA CA, GIRON JA, XICOHTENCATL-CORTES J (2010) The hemorrhagic coli pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 is an inducer of proinflammatory cytokine secretion in intestinal epithelial cells. *PLoS One*, 5, e12127.

LEFEBVRE B, DIARRA MS, VINCENT C, MOISAN H, MALOUIN F (2009) Relative cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from beef cattle and humans. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 357-364.

LENAHAN M, O'BRIEN S, KINSELLA K, SWEENEY T, SHERIDAN JJ (2007) Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 on Irish lamb carcasses, fleece and in faeces samples. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2401-2409.

LENAHAN M, O'BRIEN SB, BYRNE C, RYAN M, KENNEDY CA, McNAMARA EB, FANNING S, SHERIDAN JJ, SWEENEY T (2009) Molecular characterization of Irish *E. coli* O157:H7 isolates of human, bovine, ovine and porcine origin. *Journal of Applied Microbiology*,107, 1340-1349.

LEOTTA AG, MILIWEBSKY ES, CHINEN I, ESPINOSA EM, AZZOPARDI K, TENNANT SM, ROBINS-BROWNE RM, RIVAS M (2008) Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. *BMC Microbiology*, 8, 46.

LEUNG PHM, PEIRIS JSM, NG WWS, ROBINS-BROWNE RM, BETTELHEM KA, YAMI WC (2003) A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7549-7553.

LEVEILLE S, CAZA M, JOHNSON JR, CLABOTS C, SABRI M, DOZOIS CM (2006) Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group a strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor. *Infection and Immunity*, 74, 3427-3436.

LEYER GJ, WANG LL, JOHNSON EA (1995) Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3752-3755.

LI H, GRANAT A, STEWART V, GILLESPIE JR (2008) RpoS, H-NS, and DsrA influence EHEC hemolysin operon (*ehxCABD*) transcription in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *FEMS Microbiology Letters*, 285, 257-262.

LIM JY, LI J, SHENG H, BESSER TE, POTTER K, HOVDE CJ (2007a) *Escherichia coli* O157:H7 colonization at the rectoanal junction of long-duration culture-positive cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1380-1382.

LIM JY, SHENG H, SEU KS, PARK YH, HOVDE CJ (2007b) Characterization of an *Escherichia coli* O157:H7 plasmid O157 deletion mutant and its survival and persistence in cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2037-2047.

LIM JY, YOON JW, HOVDE CJ (2010) A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 1-10.

LIN J, SMITH MP, CHAPIN KC, BAIK HS, BENNETT GN, FOSTER JW (1996) Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3094-3100.

LINGWOOD CA, LAW H, RICHARDSON S, PETRIC M, BRUNTON JL, DE GRANDIS S, KARMALI M (1987) Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 8834-8839.

LIU Y, WANG C, TYRRELL G, LI XF (2010) Production of Shiga-like toxins in viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7. *Water Research*, 711-718.

LIVNY J, FRIEDMAN DI (2004) Characterizing spontaneous induction of Stx encoding phages using a selectable reporter system. *Molecular Microbiology*, 51, 1691-1704.

LOS JM, LOS M, WEGRZYN G, WEGRZYN A (2009) Differential efficiency of induction of various lambdoid prophages responsible for production of shiga toxins in response to different induction agents. *Microbial Pathogenesis*, 47, 289-298.

LOS JM, LOS M, WEGRZYN A, WEGRZYN G (2010) Hydrogen-peroxide-mediated induction of shiga toxin-converting lambdoid prophage ST2-8624 in *Escherichia coli* O157:H7. *Immunology and Medical Microbiology*, 58, 322-329.

LOW AS, DZIVA F, TORRES AG, MARTINEZ JL, ROSSER T, NAYLOR S, SPEARS K, HOLDEN N, MAHAJAN A, FINDLAY J, SALES J, SMITH DGE, LOW JC, STEVENS MP, GALLY DL (2006) Cloning, expression, and characterization of fimbrial operon F9 from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*, 74, 2233-2244.

MAHAJAN A, CURRIE CG, MACKIE S, TREE J, MCATEER S, MCKENDRICK I, MCNEILLY TN, ROE A, LA RAGIONE RM, WOODWARD MJ, GALLY DL, SMITH DGE (2009) An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157H7 with bovine intestinal epithelium. *Cellular Microbiology*, 11, 121-137.

MAKINO K, ISHII K, YASUNAGA T, HATTORI M, YOKOYAMA K, YUTSUDO CH, KUBOTA Y, YAMAICHI Y, IIDA T, YAMAMOTO K, HONDA T, HAN CG, OHTSUBO E, KASAMATSU M, HAYASHI T, KUHARA S, SHINAGAWA S (1998) Complete nucleotide sequences of 93- kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA Research*, 5, 1-9.

MALKI A, LE HT, MILLES S, KERN R, CALDES T, ABDALLAH J, RICHARME G (2008) Solubilization of protein aggregates by the acid stress chaperones HdeA and HdeB. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 13679-13687.

MALLARD F, ANTHONY C, TENZA D, SALAMERO J, GOUD B, JOHANNES L (1998) Direct pathway from early /recycling endosomes to the golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *The Journal of Cell Biology*, 143, 973-990.

MAO Y, DOYLE MP, CHEN J (2001) Insertion mutagenesis of *wca* reduces acid and heat tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Bacteriology*, 183, 3811-3815.

MARQUES LRM, PEIRIS JSM, CRYZ SJ, O'BRIEN AD (1997) *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of shiga-like toxin II. *FEMS Microbiology Letters*, 44, 33-38.

MATTHEWS L, LOW JC, GALLY DL, PEARCE MC, MELLOR DJ, HEESTERBEEK JAP, CHASE-TOPPING M, NAYLOR SE, SHAW DJ, REID SWJ, GUNN GJ, WOOLHOUSE MEJ (2006a) Heterogeneous shedding of *Escherichia coli* O157 in cattle and its implications for control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 547-552.

MATTHEWS L, McKENDRICK IJ, TERNENT H, GUNN GJ, SYNGE B, WOOLHOUSE MEJ (2006b) Super-shedding cattle and the transmission dynamics of *Escherichia coli* O157. *Epidemiology and Infection*, 134, 131-142.

MATULKOVA P, GOBIN M, TAYLOR J, OSHIN F, O'CONNOR K, OLIVER I (2013) Crab meat: a novel vehicle for *E. coli* O157 identified in an outbreak in South West England, August 2011. *Epidemiology and Infection*, 141, 2043-2050.

McGANNON CM, FULLER CA, WEISS AA (2010) Different classes of antibiotics differentially influences shiga toxin production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 3790-3798.

McNALLY A, ROE AJ, SIMPSON S, THOMSON-CARTER FM, HOEY DEE, CURRIE C, CHAKRABORTY T, SMITH DGE, GALLY DL (2001) Differences in levels of secreted locus of enterocyte effacement proteins between human-disease associated and bovine *Escherichia coli* O157. *Infection and Immunity*, 69, 5107-5114.

MEAD PS, SLUTSKER L, DIETZ V, MCCAIG LF, BRESEE JS, SHAPIRO C, GRIFFIN PM, TAUXE RV (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607–625.

MELLIES JL, ELLIOTT SJ, SPERANDIO V, DONNENBERG MS, KAPER JB (1999) The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: Identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Molecular Microbiology*, 33, 296–306.

MELLMANN A, LU S, KARCH H, XU J, HARMSEN D, SCHMIDT MA, BIELASZEWSKA M (2008) Recycling of shiga toxin 2 genes in sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 67-72.

MERSHA G, ASRAT D, ZEWDE BM, KYULE M (2009) Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in faeces, skin and carcasses from sheep and goats in Ethiopia. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 71-76.

MEYER T, KARCH H, HACKER J, BOCKLAGE H, HEESEMANN J (1992) Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin II-related gene from *Escherichia coli* O157:H7 strain 7279. *Zentralblatt fuer Bakteriologie*, 276, 176-188.

MICHEL PA, KASE JA (2009) Genetic profiles of shiga toxin and intimin genes found in stool broth cultures: a 2-year reference laboratory study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 65, 85-92.

MICHINO H, ARAKI K, MINAMI S, TAKAYA S, SAKAI N, MIYAZAKI M, ONO A, YANAGAWA H (1999) Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American Journal of Epidemiology*, 150, 787-796.

MILLER BD, RIGDON CE, BALL J, ROUNDS JM, KLOS RF, BRENNAN BM, ARENDS KD, KENNELLY P, HEDBERG C, SMITH KE (2012) Use of trace back methods to confirm the source of a multistate *E. coli* O157:H7 outbreak due to in-shell hazelnuts. *Journal of Food Protection*, 75, 320-327.

MILNES AS, STEWART I, CLIFTON-HADLEY FA, DAVIES RH, NEWELL DG, SAYERS AR, CHEASTY T, CASSAR C, RIDLEY A, COOK AJC, EVANS SJ, TEALE CJ, SMITH RP, McNALLY A, TOSZEGHY M, FUTTER R, KAY A, PAIBA GA (2008) Intestinal cattiade of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. *Epidemiology and Infection*, 136, 739-751.

MIYAMOTO Y, IIMURA M, KAPER JB, TORRES AG, KAGNOFF MF (2006) Role of shiga toxin versus H7 flagellin in enterohemorrhagic *Escherichia coli* signaling of human colon epithelium *in vivo*. *Cellular Microbiology*, 8, 869-879.

MOHAWK KL, O'BRIEN AD (2011) Mouse models of *Escherichia coli* O157:H7 infection and shiga toxin injection. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 258185.

MONTOSSI F, FONT-I FURNOLS M, del CAMPO M, SAN JULIAN R, BRITO G, SANUDO C (2013) Sustainable sheep production and consumer preference trens: Compatibilities, contradictions and unresolved dilemmas. *Meat Science*, 95, 772-789.

MOON HW, WHIPP SC, ARGENZIO RA, LEVINE MM, GIANELLA RA (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestine. *Infection and Immunity*, 41, 1340-1351.

MUNDY R, SCHÜLLER S, GIRARD F, FAIRBROTHER JM, PHILLIPS AD, FRANKEL G (2007) Functional studies of intimin *in vivo* and *ex vivo*: implications for host specificity and tissue tropism. *Microbiology*, 153, 959-967.

NABAE K, TAKAHASHI M, WAKUI T, KAMIYA H, NAKASHIMA K, TANIGUCHI K, OKABE N (2013) A Shiga toxin-producin *Escherichia coli* O157 outbreak associated with consumption of rice cakes in 2011 in Japan. *Epidemiology and Infection*, 141, 1897-1904.

NAKAO H, KIMURA K, MURAKAMI H, MARUYAMA T, TAKEDA T (2002) Subtyping of shiga toxin 2 variants in human-derived shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Japan. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34, 289-297.

NAYLOR SW, LOW JC, BESSER TE, MAHAJAN A, GUNN GJ, PEARCE MC, MCKENDRICK IJ, SMITH DGE, GALLY DL (2003) Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infection and Immunity*, 71, 1505-1512.

NEELY MN, FRIEDMAN DI (1998) Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage function in toxin release. *Molecular Microbiology*, 28, 1255-1267.

NEWBURG DS, CHATURVEDI P, LOPEZ EL, DEVOTO S, FAYAD A, CLEARY TG (1993) Susceptibility to hemolytic-uremic syndrome relates to erythrocyte glycosphingolipid patterns. *The Journal of Infectious Diseases*, 168, 476-479.

NICHOLLS L, GRANT TH, ROBINS-BROWNE RM (2000) Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of clinical isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 35, 275-288.

NJOROGE J, SPERANDIO V (2011) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence regulation by two bacterial adrenergic kinases QseC and QseE. *Infection and Immunity*, 80, 688-703.

O'BRIEN AD, HOLMES RK (1987) Shiga and shiga-like toxins. *Microbiological Reviews*, 51, 206-220.

OGDEN ID, HEPBURN NF, MACRAE M, STRACHAN NJC, FENLON DR, RUSBRIDGE SM, PENNINGTON TH (2002) Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Letters of Applied Microbiology*, 34, 100-104.

OGDEN ID, MACRAE M, STRACHAN NJC (2005) Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in sheep faeces at pasteur in Scotland. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 646-651.

ONOUE Y, KONUMA H, NAKAGAWA H, HARA-KUDO Y, FUJITA T, KUMAGAI S (1999) Collaborative evaluation of detection methods for *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts and ground beef. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 27-36.

OPORTO B, ESTEBAN JI, ADURIZ G, JUSTE RA, HURTADO A (2008) *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* in healty cattle, sheep and swine herds in Northern Spain. *Zoonoses and Public Health*, 55, 73-81.

OSEK J (2003) Development of a multiplex PCR approach for the identification of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1217-1225.

OSWALD E, SCHMIDT H, MORABITO S, KARCH H, MARCHES O, CAPRIOLI A (2000) Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity*, 68, 64-71.

PAO S, PATEL D, KALANTARI A, TRITSCHLER JP, WILDEUS S, SAYRE BL (2005) Detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 in feces of small ruminants and their isolation with various media. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2158-2161.

PATON AW, PATON JC, HEUZENROEDER MW, GOLDWATER PN, MANNING A (1992) Cloning and nucleotide sequence of a variant Shiga-like toxin II gene from *Escherichia coli* OX3:H21 isolated from a case of sudden infant death syndrome. *Microbial Pathogenesis*, 13, 225-236.

PATON AW, PATON JC, MANNING PA (1993) Polymerase chain reaction amplification, cloning and sequencing of variant *Escherichia coli* Shiga-like toxin type II operons. *Microbial Pathogenesis*, 15, 77-82.

PATON AW, BOURNE AJ, MANNING PA, PATON JC (1995) Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons. *Infection and Immunity*, 63, 2450-2458.

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

PELIZZARI A, PANG H, LINGWOOD CA (1992) Binding of verotoxin 1 to its receptor is influenced by differences in receptor fatty acid content. *Biochemistry*, 31(5), 1363-1370.

PENNINGTON TH (2000) VTEC: Lessons learned from British outbreaks. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 90S-98S.

PERNA NT, MAYHEW GF, POSFAI G, ELLIOTT S, DONNENBERG MS, KAPER JB, BLATTNER FB (1998) Molecular evolution of pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*, 66, 3810-3817.

PHILLIPS AD, NAVABPOUR S, HICKS S, DOUGAN G, WALLIS T, FRANKEL G (2000) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut*, 47, 377-381.

PHILLIPS D, JORDAN D, MORRIS S, JENSON I, SUMNER J (2006) Microbiological quality of Australian sheep meat in 2004. *Meat Science*, 74, 261-266.

PHILLIPS D, THOLATH S, JENSON I, SUMNER J (2013) Microbiological quality of Australian sheep meat in 2011. *Food Control*, 31, 291-294.

PIERARD D, MUYLDERMANS G, MORIAU L, STEVENS D, LAUWERS S (1998) Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 3317-3322.

PINAKA O, POURNARAS S, MOUCHTOURI V, PLAKOKEFALOS E, KATSIAFLAKA A, KOLOKYTHOPOULOU F, BARBOUTSI E, BITSOLAS N, HADJICHRISTODOULOU C (2013) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Central Greece: prevalence and virulence genes of O157:H7 and non-O157 in animal feces, vegetables, and humans. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32, 1401-1408.

PLUNKETT III G, ROSE DJ, DURFEE TJ, BLATTNER FR (1999) Sequence of shiga toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7: shiga toxin as a phage late-gene product. *Journal of Bacteriology*, 181, 1767-1778.

PRICE SB, WRIGHT JC, DEGRAVES FJ, CASTANIE-CORNET MP, FOSTER JW (2004) Acid resistance systems required for survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine gastrointestinal tract and in apple cider are different. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4792-4799.

PRENDERGAST DM, LENDRUM L, PEARCE R, BALL C, McLERNON J, O'GRADY D, SCOTT L, FANNING S, EGAN J, GUTIERREZ M (2011) Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in beef and sheep abattoirs in Ireland and characterization of isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multi-Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 519-527.

RAHAL EA, KAZZI N, SABRA A, ABDELNOOR AM, MATAR GM (2011) Decrease in shiga toxin expression using a minimal inhibitory concentration of rifampicin followed by bactericidal gentamicin treatment enhances survival of *Escherichia coli* O157:H7-infected BALB/c mice. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10, 34.

RASHID RA, TABATA TA, OATLEY MJ, BESSER TE, TARR PI, MOSELEY SL (2006a) Expression of putative virulence factors of *Escherichia coli* O157:H7 differs in bovine and human infections. *Infection and Immunity*, 74, 4142-4248.

RASHID RA, TARR PI, MOSELEY SL (2006b) Expression of the *Escherichia coli* IrgA homologue adhesin is regulated by the ferric uptake regulation protein. *Microbial Pathogenesis*, 41, 207-217.

RAY PE, LIU XH (2001) Pathogenesis of shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrology*, 16, 823-839.

RECKTENWALD J, SCHMIDT H (2002) The nucleotid sequence of shiga toxin (stx) 2e-encoding phage phiP27 is not related to other stx phage genomes, but the modular genetic structure is conserved. *Infection and Immunity*, 70, 1896-1908.

REID SD, SELANDER RK, WHITTAM TS (1999) Sequence diversity of flagellin (*fliC*) allels in pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181, 153-169.

RICE DH, SHENG HQ, WYNIA SA, HOVDE CJ (2003) Rectoanal mucosal swab culture is more sensitive than fecal culture and distinguishes *Escherichia coli* O157:H7-colonized cattle and those transiently shedding the same organism. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 4924-4929.

ROTARIU O, OGDEN ID, MACRITCHIE L, FORBES KJ, WILLIAMS AP, CROSS P, HUNTER CJ, TEUNIS PFM, STRACHEN NJC (2011) Combining risk assessment and epidemiological risk factors to elucidate the sources of human *E. coli* O157 infections. *Epidemiology and Infection*, 140, 1414-1429.

RUGBJERG H, NIELSEN EM, ANDERSEN JS (2003) Risk factors associated with faecal shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in eight known-infected Danish dairy herds. *Preventative Veterinary Medicine*, 58, 101-113.

RUSSO TA, JOHNSON JR (2000) Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* (ExPEC). *Journal of Infectious Diseases*, 181, 1753-1754.

SAITOH T, IYODA S, YAMAMOTO S, LU Y, SHIMUTA K, OHNISHI M, TERAJIMA J, WATANABE H (2008) Transcription of the Ehx enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli. Journal of Bacteriology*, 190, 4822-4830.

SAMADDER P, XICOHTENCATL-CORTES J, SALDANA Z, JORDAN D, TARR PI, KAPER JB, GIRON JA (2009) The *Escherichia coli ycbQRST* operon encodes fimbriae with laminin-binding and epithelial cell adherence properties in shiga-toxigenic *E. coli* O157:H7. *Environmental Microbiology*, 11, 1815-1826.

SANDVIG K, OLSNES S, BROWN JE, PETERSON OW, VAN DEURS B (1989) Endocytosis from coated pits of shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysanteriae* 1. *The Journal of Cell Biology*, 108, 1331-1343.

SANDVIG K, van DEURS B (1996) Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of shiga toxin and ricin. *Physiological Reviews*, 76, 949-966.

SANDVIG K, GRIMMER S, LAUVRAK SU, TORGERSEN ML, SKRETTING G, VAN DEURS B, IVERSEN TG (2002) Pathways followed by ricin and shiga toxin into cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 117, 131-141.

SCHMIDT H (2001) Shiga toxin-converting bacteriophages. *Research in Microbiology*, 152, 687-695.

SCHMIDT H, KARCH H, BEUTIN L (1994) The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiology Letters*, 117, 189-196.

SCHMIDT H, BEUTIN L, KARCH H (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infection and Immunity*, 63, 1055-1061.

SCHMIDT H, HENKEL B, KARCH H (1997) A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiology Letters*, 148, 265-272.

SCHMIDT H, SCHEEF J, MORABITO S, CAPRIOLI A, WIELER LH, KARCH H (2000) A new shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Applied and Environmental Microbiology*, 66,1205-1208.

SCHMITT CK, MCKEE ML, O'BRIEN AD (1991) Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infection and Immunity*, 59, 1065-1073.

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

SCHULTZ CL, EDRINGTON TS, SCHROEDER SB, HALLFORD DM, GENOVESE KJ, CALLAWAY TR, ANDERSON RC, NISBER DJ (2005) Effect of tyroid on faecal shedding of *E. coli* O157:H7 and *Escherichia coli* in naturally infected yearling beef cattle. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1176-1180.

SHAIK N, TARR PI (2003) *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations and evolutionary implications. *Journal od Bacteriology*, 185, 3596-3605.

SHENG H, DAVIS MA, KNECHT HJ, HOVDE CJ (2004) Rectal administration of *Escherichia coli* O157:H7: novel model for colonization of ruminants. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4588-4595.

SHENG H, LIM JY, KNECHT HJ, LI J, HOVDE CJ (2006) Role of *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in colonization at the bovine terminal rectal mucosa. *Infection and Immunity*, 74, 4685-4693.

SHERMAN PM, SONI R (1988) Adherence of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O157:H7 to human epithelial cells in tissue culture: role of outer membranes as bacterial adhesins. *Journal of Medical Microbiology*, 26, 11-17.

SHIMIZU T, KAWAKAMI S, SATO T, SASAKI T, HIGASHIDE M, HAMABATA T, OHTA T, NODA M (2007) The serine 31 residue of the B subunit of shiga toxin 2 is essential for secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 75, 2189-2200.

SHIMIZU T, OHTA Y, NODA M (2009) Shiga toxin 2 is specifically released from bacterial cells by two different mechanisms. *Infection and Immunity*, 77, 2813-2823.

SINCLAIR JF, O'BRIEN AD (2002) Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesion intimin-γ of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 2876-2885.

SINCLAIR JF, DEAN-NYSTROM EA, O'BRIEN AD (2006) The established intimin receptor tir and the putative eucaryotic intimin receptors nucleolin and β1 integrin localize at or near the site of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence to enterocytes in vivo. *Infection and Immunity*, 74, 1255-1265.

SMALL P, BLANKENHORN D, WELTY D, ZINSER E, SLONCZEWSKI JL (1994) Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *Journal of Bacteriology*, 176, 1729-1737.

SMITH VE, KANE AV, CAMPBELL ST, ACHESON DWK, COCHRAN BH, THORPE CM (2003) Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 71, 1497-1504.

SOLECKI O, MACRAE M, STRACHAN N, LINDSTEDT BA, OGDEN I (2009) *E. coli* O157 from sheep in Northeast Scotland: prevalence, concentration shed, and molecular characterization by Multilocus Variable Tandem Repeat Analysis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 849-854.

STEVENS MP, DIEMEN PM, FRANKEL G, PHILLIPS AD, WALLIS TS (2002) Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. *Infection and Immunity*, 70, 5158-5166.

STEVENS MP, ROE AJ, VLISIDOU I, DIEMAN PM, LA RAGIONE RM, BEST A, WOODWARD MJ, GALLY DL, WALLIS TS (2004) Mutation of *toxB* and truncated version of *efa-1* gene in *Escherichia coli* O157:H7 influences the expression and secretion of locus of enterocyte effacement-encoded proteins but not intestinal colonization in calves or sheep. *Infection and Immunity*, 72, 5402-5411.

STROCKBINE NA, MARQUES LR, NEWLAND JW, SMITH R, HOLMES K, O'BRIEN AD (1986) Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biological activities. *Infection and Immunity*, 53, 135-140.

SZABADY RL, LOKUTA MA, WALTERS KB, HUTTENLOCHER A, WELCH RA (2009) Modulation of neutrophils function by a secreted mucinase of *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS One*, 5, e1000320.

TAKAO T, TANABE T, HONG YM, SHIMONISHI Y, KURAZONO H, YUTSUDO T, SASAKAWA C, YOSHIKAWA M, TAKEDA Y (1988) Identity of molecular structure of

shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157:H7 with that of shiga toxin. *Microbial Pathogenesis*, 5, 57-69.

TAM PJ, LINGWOOD CA (2007) Membrane-cytosolic translocation of verotoxin A1 subunit in target cells. *Microbiology*, 153, 2700-2010.

TANEIKE I, ZHANG HM, WAKISAKA-SAITO N, YAMAMOTO T (2002) Enterohemolysin operon of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a virulence function of inflammatory cytokine production from human monocytes. *FEBS Letters*, 524, 219-224.

TARR PI, FOUSER LS, STAPLETON AE, WILSON RA, KIM HH, VARY JC Jr, CLAUSEN CR (1996) Hemolytic-uremic syndrome in a six-year-old girl after urinary tract infection with Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2. *The New England Journal of Medicine*, 335, 635-638.

TARR PI, BILGE SS, VARY JR. JC, JELACIC S, HABEEB RL, WARD TR, BAYLOR MR, BESSER TE (2000) Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infection and Immunity*, 68, 1400-1407.

TARR CL, WHITTAM TS (2002) Molecular evolution of the intimin gene of O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184, 479-487.

TATSUNO I, HORIE M, ABE H, MIKI T, MAKINO K, SHINAGAWA H, TAGUCHI H, KAMIYA S, HAYASHI T, SASAKAWA C (2001) *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infections and Immunity*, 69, 6660-6669.

TESH VL (2010) Induction of apoptosis by shiga toxins. *Future Microbiology*, 5, 431-453.

THOMAS KM, McCANN MS, COLLERY MM, MOSCHONAS G, WHYTE P, McDOWELL DA, DUFFY G (2012) Transfer of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 and O145 from fleece to carcass during sheep slaughter in an Irish export abattoir. *Food Microbiology*, 34, 38-45.

THORPE CM, RITCHIE JM, ACHESON DWK (2002) Enterohemorrhagic and other shiga toxin-producing *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli*: Virulence mechanism of a versatile pathogen. Ed: MICHAEL S. DONNENBERG, Academic Press, San Diego, p: 119-155.

TİK, Türkiye İstatistik Kurumu (2013) Küçükbaş hayvan sayıları. Erişim: (http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002), Erişim tarihi: 11.10.2013.

TOBE T, BEATSON SA, TANIGUCHI H, ABE H, BAILEY CM, FIVIAN A, YOUNIS R, MATTHEWS S, MARCHES O, FRANKEL G, HAYASHI T, PALLEN MJ (2006) An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 14941-14946.

TOMA C, ESPINOSA EM, SONG T, MILIWEBSKY E, CHINEN I, IYODA S, IWANAGA M, RIVAS M (2004) Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4937-4946.

TORRES AG, GIRON JA, PERNA NT, BURLAND V, BLATTNER FR, AVELINO-FLORES F, KAPER JB (2002) Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*, 70, 5416-5427.

TORRES AG, KAPER JB (2003) Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infection and Immunity*, 71, 4985-4995.

TORRES AG, KANACK KC, TUTT CB, POPOV V, KAPER JB (2004) Characterization of second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 238, 233-244.

TORRES AG, LI Y, TUTT CB, XIN L, EAVES-PYLES T, SOONG L (2006) Outer membrane protein A of *Escherichia coli* O157:H7 stimulates dendritic cell activation. *Infection and Immunity*, 74, 2676-2685.

TORRES AG, MILFLORES-KLORES L, GARCIA-GALLEGOS JG, PATEL SD, BEST A, LA RAGIONE RM, MARTINEZ-LAGUNA Y,WOODWARD MJ (2007) Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Medical Microbiology*, 297, 177-185.

TORRES AG, SLATER TM, PATEL SD, POPOV VL, ARENAS-HARNANDEZ MMP (2008) Contribution of Ler- and H-NS-regulated long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 during binding to tissue-cultured cells. *Infection and Immunity*, 76, 5062-5071.

TORRES AG, BLANCO M, VALENZUELA P, SLATER TM, PATEL SD, DAHBI G, LOPEZ C, BARRIGA XF, BLANCO JE, GOMES TAT, VIDAL R, BLANCO J, (2009) Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 2442-2451.

TREE JJ, WOLFSON EB, WANG D, ROE AJ, GALLY DL (2009) Controlling injection: regulation of type-III secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, 17, 361-370.

TURUTOGLU H, OZTURK D, GULER L, PEHLIVANOGLU F (2007) Presence and characteristics of sorbitol-negative *Escherichia coli* O157 in healthy sheep faeces. *Veterinarni Medicina*, 52, 301-307.

TZIPORI S, GUNZER F, DONNENBERG MS, DE MONTIGNY L, KAPER JB, DONOHUE-ROLFE A (1995) The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infection and Immunity*, 63, 3621-3627.

ULRICH GA (2009) KatP contributes to OxyR-regulated hydrogen peroxidase resistance in *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Microbiology*, 155, 3589-3598.

UNKMEIR A, SCHMIDT H (2000) Structural analysis of phage-borne *stx* genes and their flanking sequences in shiga toxin producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type I strains. *Infection and Immunity*, 68, 4856-4864.

VAREILLE M, DE SABLET T, HINDRE T, MARIN C, GOBERT AP (2007) Nitric oxide inhibits shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 10199-10204.

WADE WG, THOM BT, EVENS M (1979) Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet*, 2, 1235-1236.

WAGNER PL, ACHESON DWK, WALDOR MK (2001a) Human neutrophils and their products induce shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 69, 1934-1937.

WAGNER PL, NEELY MN, ZHANG X, ACHESON DWK, WALDOR MK, FRIEDMAN DI (2001b) Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *Journal of Bacteriology*, 183, 2081-2085.

WAGNER PL, LIVNEY J, NEELY MN, ACHESON DWK, FRIEDMAN DI, WALDOR MK (2002). Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 44, 957-970.

WAINWRIGHT LA, KAPER JB (1998) EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 27, 1247-1260.

WALLE KV, YEKTA MA, VERDONCK F, DE ZUTTER L, COX E (2011) Rectal inoculation of sheep with *Escherichia coli* O157:H7 results in persistent infection in the absence of protective response. *Veterinary Microbiology*, 147, 376-382.

WANG G, CLARK CG, RODGERS FG (2002) Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3613-3619.

WEAVER RF (2005) Infection of *E. coli* by Phage λ. In: Molecular Biology, 3rd Ed., McGraw-Hill Companies Inc., New York, p: 220-241.

WELLS JG, DAVIS BR, WACHSMUTH IK, RILEY LW, REMIS RS, SOKOLOW R, MORRIS GK (1983) Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 18, 512-520.

WELLS TJ, SHERLOCK O, RIVAS L, MAHAJAN A, BEATSON SA, TORPDAHL M, WEBB RI, ALLSOPP LP, GOBIUS KS, GALLY DL, SCHEMBRI MA (2008) EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli O157:H7* that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 10, 589-604.

WELLS TJ, MCNEILLY TN, TOTSIKA M, MAHAJAN A, GALLY DL, SCHEMBRI MA (2009) The *Escherichia coli* O157:H7 EhaB autotransporter protein binds to laminin and collagen I and induces a serum IgA response in O157:H7 challenged cattle. *Environmental Microbiology*, 11, 1803-1814.

WILLIAMS AP, AVERY LM, KILLHAM K, JONES DL (2005) Persistence of *Escherichia coli* O157 on farm surfaces under different environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1075-1083.

WONG CS, JELACIC S, HABEEB RL, WATKINS SL, TARR PI (2000) The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *The New England Journal of Medicine*, 342, 1930-1936.

WONG ARC, PEARSON JS, BRIGHT MD, MUNERA D, ROBINSON KS, LEE SF, FRANKEL G, HARTLAND EL (2011) Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Molecular Microbiology*, 80, 1420-1438.

XICOHTENCATL-CORTES J, MONTEIRO-NETO V, LEDESMA MA, JORDAN DM, FRANCETIC O, KAPER JB, PUENTE JL, GIRON JA (2007) Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 3519-3529.

XICOHTENCATL-CORTES J, MONTEIRO-NETO V, SALDANA Z, LEDESMA MA, PUENTE JL, GIRON JA (2009) Type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. *Journal of Bacteriology*, 191, 411-421.

XICOHTENCATL-CORTES J, SALDANA Z, DENG W, CASTANEDA E, FREER E, TARR PI, FINLAY BB, PUENTE JL, GIRON JA (2010) Bacterial macroscopic rope-like fibers with cytopathic and adhesive properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 32336-32342.

YENİİZ E, ÖNCÜL O, ÇAVUŞLU Ş (2009) İshalli hastaların dışkılarında *Escherichia coli* O157:H7 varlığının araştırılması. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 29, 1398-1405.

YU M, HASLAM DB (2005) Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperon HEDJ/ERdj3. *Infection and Immunity*, 73, 25-24-2532.

ZHANG W, BIELASZEWSKA M, KUCZIUS T, KARCH H (2002a) Identification, characterization, and distribution of a shiga toxin 1 gene variant (stx_{1c}) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1441-1446.

ZHANG WL, KÖHLER B, OSWALD E, BEUTIN L, KARCH H, MORABITO S, CAPRIOLI A, SUERBAUM S, SCHMIDT H (2002b) Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4486-4492.

ZHANG Q, DONOHUE-ROLFE A, KRAUTZ-PETERSON G, SEVO M, PARRY N, ABEIJON C, TZIPORI S (2009) Gnotobiotic piglet model for evaluating the safe use of antibiotics against *Escherichia coli* infection. *Journal of Infectious Diseases*, 199, 486-493.

ZHENG J, CUI S, TEEL LD, ZHAO S, SINGH R, O'BRIEN AD, MENG J (2008) Identification and characterization of shiga toxin type 2 variants in *Escherichia coli* isolates from animals, food and humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 5645-5652.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı:	: Yılmaz Emre
Soyadı	: GENÇAY
Doğum Yeri ve Tarihi	: Ankara, 08.06.1983
Uyruğu	: T.C.
Medeni Durumu	: Bekar
İletişim Adresi	: Konutkent 1 E6 blok, no:2, Yenimahalle-ANKARA
Tel	: 0 533 278 55 62

II- Eğtitim Durumu

Doktora	: 2010 - ... Kırıkkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji (Veteriner) ABD
Lise	: 1997–2000 Orta Doğu Teknik Üniversitesi Koleji
İlkokul	: 1989–1997 Orta Doğu Teknik Üniversitesi Koleji
Yabancı Dili	: İngilizce, İtalyanca

III- Ünvanları

: 2006 Veteriner Hekim

: 2006 Araştırma Görevlisi (Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi ABD)

IV- Mesleki Deneyimi

2013	: Zürih, İsviçre, Federal Teknolojis Enstitüsü (ETH - Eidgenössische Technische Hochschule Zürich), Gıda Mikrobiyolojisi Bölümü (Prof. Martin J. Loessner), Ziyaretçi Araştırmacı.
2012	: Kopenhag, Danimarka, Kopenhag Üniversitesi, Sağlık ve Medikal Bilimler Fakültesi, Veteriner Hastalık Biyolojisi Departmanı (Prof. Lone Brøndsted), Ziyaretçi Araştırmacı.

2011 : Kopenhag, Danimarka, Kopenhag Üniversitesi, Sağlık ve Medikal Bilimler Fakültesi, Veteriner Hastalık Biyolojisi Departmanı (Prof. Lone Brøndsted), Ziyaretçi Araştırmacı.

2006 : Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi ABD, Araştırma Görevlisi.

2005 : Utrecht, Hollanda, Hollanda Üniversitesi Veteriner Fakültesi, IVSA (Uluslararası Veteriner Öğrencileri Topluluğu) Grup Değişim Programı.

2004 : Bologna, İtalya, Bologna Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Avrupa Birliği, Socrates–Erasmus Öğrenci Eğitim Programı, Pilot Öğrenci.

2003 : Zürih, İsviçre, Zürich Üniversitesi Veteriner Fakültesi, IVSA (Uluslararası Veteriner Öğrencileri Topluluğu) Grup Değişim Programı.

IV- Bilimsel İlgi Alanları

Aldığı Burslar:

1. 2013, Yüksek Öğrenim Kurumu, Doktora Araştırma Bursu (3 ay)
2. 2012, EMBO Kongre Yolculuk Desteği
3. 2012, Erasmus Staj Hareketliliği Bursu (3 ay)
4. 2004, Erasmus Öğrenim Hareketliliği Bursu (9 ay)

Ödüller:

1. 2013, 5. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, En iyi Sözlü Sunum Ödülü
2. 2013, 2010, TÜBİTAK, UBYT Yayın Teşvik Ödülleri

Seminerleri:

1. Gıda patojenlerinin biyokontrolünde bakteriyofaj kullanımı (2011)
2. *Escherichia coli* O157:H7 ve virülens özellikleri (2012)

Projeleri:

1. AYAZ ND, GENÇAY YE (2013). Çiğ Köftede *Escherichia coli* O157:H7'nin Bakteriyofaj ile Biyokontrolü. KÜ BAP 2013/75.

2. YILDIZ K, GENÇAY YE, GÖKPINAR S (2013). *Toxoplasma gondii* İzolatlarının Multilocus PCR-RFLP Belirteçleri Kullanılarak Genotiplendirilmesi. KÜ BAP 2013/73.

3. AYAZ ND, EROL İ, GENÇAY YE (2011). Kasaplık sığırlarda ve mezbaha atık sularında *Escherichia coli* O157:H7 prevalansının belirlenmesi, izolatların moleküler karakterizasyonu, antibiyotik dirençlilik ve bakteriyofaj duyarlılık profillerinin tespiti. TOVAG Proje No: 110R013.

4. KASIMOĞLU A, AKGÜN S, AYAZ ND, GENÇAY YE (2008). Peynirde Mikotoksin Miktarı ve Migrasyonunun Belirlenmesi ile Esansiyel Yağların Kaşar Peynirinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması. KÜ BAP 2008/47.

Katıldığı Kongre ve Sempozyumlar:

1. 3rd Asia-Pacific Congress on Food Safety, 29 Ekim-1 Kasım 2013, Taypei, Tayvan

2. 5. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 03-06 Nisan 2013, Antalya, Türkiye

3. Viruses of Microbes II, 16-19 Temmuz 2013, Brüksel, Belçika

4. 22nd ICMSF FoodMicro 2010, 30 Ağustos-3 Eylül 2010, Kopenhag, Danimarka

5. Viruses of Microbes I, 21-25 Haziran 2010, Paris, Fransa

6. Pamukkale Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, 21-23 Mayıs 2009, Denizli, Türkiye

7. 12th World Public Health Congress, 27 Nisan-1 Mayıs 2009, İstanbul, Türkiye

8. Yüz Yıllık Bilgi Işığında Toksoplazmozis Sempozyumu, 09-10 Nisan 2009, Kırıkkale, Türkiye

V- Yayınları

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. GENCAY YE, AYAZ ND, KASIMOGLU DOGRU A (2010) Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* and other staphylococcal isolates from various foods and food ingredients. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 7, 75-80.

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. AYAZ ND, GENCAY YE, EROL I (2014) Prevalence and molecular characterization of sorbitol fermenting and non-fermenting *Escherichia coli* O157:H7^{+}/H7^{-} isolated from cattle at slaughterhouse and slaughterhouse wastewater. *International Journal of Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.002.

2. GENCAY, YE, YILDIZ, K, GOKPINAR, S, LEBLEBICIER, A (2013) A potential infection source for humans: Frozen buffalo meat can harbour tissue cysts of *Toxoplasma gondii*. *Food Control*, 30, 86-89.

3. BUYUYORUK, S, AYAZ, ND, GENCAY, YE, BEYAZ, D, KOCAK, P (2013) Species distribution, molecular characteristics and vancomycin resistance gene profiles of *Enterococcus* sp. isolates from farmhouse cheeses in western Turkey. *International Journal of Dairy Technology*, doi: 10.1111/1471-0307.12090.

4. KASIMOGLU-DOGRU A, AYAZ ND, GENCAY YE (2010) Serotype identification and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* spp. isolated from chicken carcasses. *Tropical Animal Health and Production*, 42, 893-897.

5. KASIMOGLU-DOGRU A, GENCAY YE, AYAZ ND (2010). Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level; absence of *vanA* and *vanB* genes in *E. faecalis* and *E. faecium*. *Research in Veterinary Science*, 89, 153-158.

6. KASIMOGLU-DOGRU A, GENCAY YE, AYAZ ND (2010). Comparison of virulence gene profiles of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* chicken neck skin and faeces isolates. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16, 129-133.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. KASIMOGLU DOGRU A, GENCAY YE, AYAZ ND, ÇELİK Ç (2009) Identification of enterotoxin genes of coagulase positive staphylococci isolated from different foods using multiplex PCR. 3. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 14-16 Mayıs 2009, Bursa. s. 420-424.

2. AYAZ ND, KASIMOGLU DOGRU A, GENCAY YE, CAKAR LP (2009) Kırıkkale'de satışa sunulan çiğ sütlerin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. Pamukkale Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, 21-23 May 2009, Denizli. s: 136.

3. GENÇAY, YE, SØRENSEN, MCH, BRØNSTED, L (2013) *Campylobacter jejuni* biyokontrolünde bakteriyofaj etkinliğinin araştırılması. 5. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 03-06 Nisan 2013, Antalya. s.35-36.

4. BÜYÜKYÖRÜK, S, AYAZ, ND, GENCAY, YE, BEYAZ, D, KOCAK, P (2013) Species distribution, molecular characteristics and vancomycin resistance gene profiles of *Enterococcus* sp. isolates from home-made western cheeses in Turkey. 5. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 03-06 Nisan 2013, Antalya. s.13-14.

5. DOĞRU KASIMOĞLU, A, GENÇAY, YE, AYAZ, ND (2013) Comparison of virulence gene profiles of *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* chicken neck skin and feces isolates. 5. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 03-06 Nisan 2013, Antalya. s.119-120.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. GENCAY YE, AYAZ ND**,** AYAZ Y, KASIMOGLU DOGRU A (2009) Serotype identification and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* spp. isolated from broiler carcasses. 12th World Public Health Congress, 27 Nisan-1 Mayıs 2009, İstanbul, Türkiye, s. 150-05.

2. GENCAY YE, AYAZ ND, KASIMOGLU DOGRU A (2010) Virulence gene profiles of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* chicken isolates originated from various sources. 22nd ICMSF FoodMicro 2010, 30 Ağustos-3 Eylül 2010, Kopenhag, Danimarka, s. 133.

3. GENCAY YE, BRØNSTED L (2012) Phage resistance in *Campylobacter jejuni*. 2nd Viruses of Microbes, 16-20 Temmuz 2012, Brüksel, Belçika. s. 117.

4. KASIMOĞLU DOĞRU A, AYAZ ND, GENCAY YE (2013) Mezbahada tavuklarda *Enterococcus* türlerinin belirlenerek, izolatların antibiyotik direnç profillerinin tespiti; *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında *vanA* ve *vanB* genlerinin varlığının araştırılması. 2. Uluslararası Beyaz Et Kongresi, 24-28 Nisan 2013, Antalya, Türkiye.

5. AYAZ ND, GENCAY YE, EROL I (2013) Prevalence of *E. coli* O157:H7 in cattle and slaughterhouse wastewater. 5th International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2013), 2-4 Ekim, Madrid, İspanya. s. 258.

6. AYAZ ND, GENCAY YE, EROL I (2013) Molecular characteristics of sorbitol fermenting and non-fermenting *E. coli* O157:$H7^+$/$H7^-$ in cattle and slaughterhouse wastewater. 5th International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2013), 2-4 Ekim, Madrid, İspanya. s. 241.

7. GENCAY YE, SØRENSEN MCH, BIRK T, BALDVINSSON SB, CHRISTENSEN BB, BRØNDSTED L (2013) Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* bacteriophages from free-range poultry farms using different Penner serotypes expressing a variety of surface structures. International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms, CHRO 2013, 15-19 Eylül 2013, Aberdeen, İngiltere. s. 97.

8. GENCAY YE, SØRENSEN MCH, RICHARDS M, SZYMANSKI CM, BRØNDSTED L (2013) Development of spontaneous phage resistance in *Campylobacter jejuni* NCTC12662. International Workshop on

Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms, CHRO 2013, 15-19 Eylül 2013, Aberdeen, İngiltere. s. 117.

9. YILDIZ K, KUL O, GOKPINAR S, ATMACA HT, GENCAY YE, GAZYAGCI AN, BABUR C, GURCAN IS (2013) The relationship between seropositivity and tissue cysts in sheep naturally infected with *Toxoplasma gondii*. 2nd International Meeting on Apicomplexan Parasites in Farm Animals, 31 Ekim-2 Kasım 2013, Kuşadası, Türkiye. s. 63.

10. GENCAY YE, AYAZ ND, EROL I (2013) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophages from slaughterhouse wastewater; detection of host range and efficiency of plating characteristics of the isolates. 3rd Asia-Pacific Congress on Food Safety, 29 Ekim-1 Kasım 2013, Taypei, Tayvan. s. 184.

11. AYAZ ND, GENCAY YE, EROL I (2013) Antibiotic resistance profiles of *E. coli* O157:H7/H7^{-} cattle and slaughterhouse wastewater isolates. 3rd Asia-Pacific Congress on Food Safety, 29 Ekim-1 Kasım 2013, Taypei, Tayvan. s.204.

VI- Diğer Bilgiler

1. Kırıkkale Üniversitesi Yerel Etik Kurul Başkanlığı Deney Hayvanları Kullanma Sertifikası, Kırıkkale, 05.07.2007

2. Kanatlı eti kesim ve parçalama tesislerinde HACCP ve Veteriner Hekim kursu, Ankara Veteriner Hekimleri Odası, 2006.

3. Kırmızı et kesim ve parçalama tesislerinde HACCP ve Veteriner Hekim kursu, Ankara Veteriner Hekimleri Odası, 2006.