

BROİLER PİLİÇLERİNDEN *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 SEROTİPİNİN İDENTİFİKASYONU VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ(*)

Sinem Gökçe DURSUN (SEKMEN) Osman KAYA

Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Işıklı Köyü-Aydın

Geliş Tarihi : 03.03.2009

Özet: Bu çalışmada, İzmir, Aydın, Manisa, Denizli ve Uşak illerinde bulunan fason broiler kümeslerindeki piliçlerden *E. coli* O157:H7 identifikasyonu amacıyla 500 kloakal sıvap örneği alınmıştır. Beş yüz kloakal sıvap örneğinin 32 (% 6.40)'sinden *Escherichia coli* O157:H7 serotipi identifiye edilmiştir. Ayrıca örneklerin 128 (% 25.60)' inden diğer *E. coli* türleri, 75 (% 15)' inden *Klebsiella sp.*, 193 (% 38.60)' ünden *Proteus sp.*, 38 (% 7.60)' inden *Pseudomonas sp.* identifiye edilmiş, 34 (% 6.80)' ünde ise bakteriyel üreme şekillenmemiştir. Araştırmada, örneklerden izole edilen *E. coli* O157:H7 suşlarının illere göre toplam örnek sayısına oranları Aydın 108/13 (% 12.04), İzmir 140/9 (% 6.43), Uşak 36/2 (% 5.55), Manisa 180/7 (% 3.88) ve Denizli 36/1 (% 2.77) olarak belirlenmiştir. *E. coli* O157:H7 izolatlarıyla yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda izolatların Polimiksin B' ye % 100.00, Sefotaksime % 75.00, Norfloksasine % 59.38 oranlarında duyarlı; Kanamisine % 37.50 oranında orta derecede duyarlı; Ampisiline % 100.00, Sefalotine % 100.00, Kloramfenikole % 87.50, Sulfametoksazol-Trimetoprim % 81.25, Eritromisine % 81.25 ve Amoksisilin-Klavulonik aside % 62.50 oranlarında dirençli oldukları bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: *E. coli* O157:H7, broiler, izolasyon, identifikasyon, antibiyotik.

The identification and antibiotic sensibility of *E. coli* O157:H7 in broiler chickens

Summary: In this study, 500 cloacal swabs have been taken from broiler chickens at subconstructor houses in İzmir, Aydın, Manisa, Denizli and Usak for identification of *E. coli* O157:H7. *Escherichia coli* O157:H7 serotype was identified from 32 (6.40%) of the 500 cloacal swabs. In addition, 128 (25.60%) other *E. coli* strains, 75 (15.00%) *Klebsiella sp.*, 193 (38.60%) *Proteus sp.*, 38 (7.60%) *Pseudomonas sp.* were identified, but in 34 (6.80%) of the samples no bacterial growth was observed. Percentage positivities of *E. coli* O157:H7 by provinces were as follows: Aydın 108/13 (12.04%), Izmir 140/9 (6.43%), Usak 36/2 (5.55%), Manisa 180/7 (3.88%) and Denizli 36/1 (2.77%). In antimicrobial sensitivity test, *E. coli* O157:H7 isolates were susceptible 100.00% to Polymyxin B, 75.00% to Cefotaxime, 59.38% to Norfloxacin; intermediate-susceptible 37.50% to Kanamycin; resistant 100.00% to Ampicillin, 100.00% to Cephalothin, 87.50% to Chloramphenicol, 81.25% to Sulphamethoxazole-Trimethoprim, 81.25% to Erythromycine and 62.50% to Amoxycillin-Clavulanic acid.

Key words: *E. coli* O157:H7, broiler, isolation, identification, antibiotics.

GİRİŞ

E. coli O157:H7 serotipi zoonotik ve gıda kaynaklı patojenlerin en önemlilerinden biridir. Etken özellikle insan sağlığı açısından, hastalığa neden olduğunun belirlendiği 1983 yılından beri büyük önem taşımaktadır (60). *E. coli* O157:H7 insan-

larda hemolitik üremik sendrom (HUS) ve hemorajik kolitis olarak bilinen ve ölümlü sonuçlanabilen gıda ve su kaynaklı salgınlara neden olmaktadır.

(*) Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri fonunca desteklenmiştir (Proje No: VTF-07021).

E. coli O157:H7 asıl konak sığırlar olmak üzere koyun, geyik, köpek ve kuşlarda hastalığa neden olmaktadır. Çeşitli araştırma sonuçları bu bakterinin başta süt inekleri olmak üzere sıcak kanlı hayvanlar olarak tanımlanan memeli ve kanatlı hayvanların dışkıları ile ete, süte, toprağa, suya ve dolayısı ile tüm çevreye yayıldığını göstermiştir (31). *E. coli* O157:H7'nin prevalansı; coğrafi bölge, mevsim, hayvanın türü, yaşı ve cinsiyeti, beslenme şekli gibi birçok faktör tarafından etkilenebilir. Dünya çapında yapılan araştırmaların bazılarında kanatlı etlerinden ve dışkı örneklerinden *E. coli* O157:H7 izole ve identifiye edildiği belirtilmiştir (62,65,71). Kanatlılardan izole edilen patojenik *E. coli* (APEC) suşları çoğunlukla O serogruplarına dahildir. Tavuklardan en çok izole edilen suşlar O1, O2, O35 ve O78' dir (20). *E. coli* O157:H7 serotipinin tavuklarda doğal infeksiyona yol açtığına dair çok az veri olmasına karşın, inokulasyon yoluyla oluşturulan infeksiyonların varlığı bildirilmiştir (6,30,72).

E. coli O157:H7 serotipinin patojenitesi esas olarak sentezlediği toksinlerden kaynaklanır. Bu toksin *Shigella dysenteriae* tip 1 tarafından oluşturulan toksine % 99 oranında benzediği için başlarda shiga benzeri toksin (SLT) olarak adlandırılırken, günümüzde kullanılan terminolojide shiga toksin (Stx) olarak anılmaktadır. Toksinin iki tipi vardır ve bunlar Stx1 ve Stx2 adlarıyla anılırlar. Stx1 ve Stx2 arasında % 55-60 oranında homoloji vardır. Her iki toksin de HeLa ve Vero doku kültürü hücrelerinde sitotoksik etki göstermektedirler ve bu yüzden verotoksin 1 ve 2 olarak isimlendirilmişlerdir (42).

Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) suşları verotoksin veya shigatoksin (Stx) üretmesine göre tiplendirilir. Bunlardan *E. coli* O157:H7 bütün dünyada genellikle hastalığa neden olan en önemli EHEC suşudur (12,29,37). *E. coli* O157:H7 için infeksiyöz doz 10 -100 hücre olarak tahmin edilmektedir. *E. coli* O157:H7 serotipi düşük pH' lı ortamda asit tolerans yanıtı geliştirir ve hafif asidik yiyeceklerde bu şekilde hayatta kalma şansını artırır (58). Ayrıca *E. coli* O157:H7 serotipinin oldukça dayanıklı olduğu, dışkıda 50 gün, toprakta 130 gün canlı kaldığı ve bu süre içinde infektivitesini koruduğu rapor edilmektedir (57).

E. coli O157:H7 serotipinin hastalık oluşturma

masında etkili olan birçok virülens faktörü vardır. Bunların başında bağlanma-yıkımlama (attaching-effacing, A/E) mekanizması, virülens plasmidleri, patojenite adaları, sitotoksinler ve virülens genleri gelmektedir (59). *E. coli* O157:H7 'de 35 kb olan enterosit yıkım lokusu (LEE) olan bir patojenite adası bulunmuştur. *E. coli* O157:H7' nin EPEC benzeri bir atadan önce LEE 'yi elde etmesi, sonra transdüksiyon ile SLT 2 'yi alması, sonra hemolizini kodlayan EHEC plasmidini kazanması, daha sonra SLT 1 'i kazanması ve en son olarak sorbitol fermantasyonu ve b-glukuronidaz aktivitesini yitirmesi ile evrimini tamamladığı kabul edilmektedir (42,58). *E. coli* O157:H7 serotipinin sahip olduğu 60 mDa plasmidinin (pO157) bağırsak epiteline bağlanmayla olan ilişkisi ilk olarak Karch ve arkadaşları (36) tarafından açıklanmıştır. Bu araştırmacılar pO157' nin varlığının fimbria ile Henle 407 hücrelerine bağlanmayla ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. *E. coli* O157:H7' nin barsak enterositlerinde bağlanma-yıkımlama (A/E) lezyonlarına neden olduğu bildirilmiştir (27,68). A/E lezyonları bakterinin hücre yüzeyine bağlanmasını ve enterositlerle mikrovilluslarda yıkım ve kaybı anlatmaktadır. Bakterinin bağlanmasının sonucunda oluşan sitoskeletal yığılmalar sağlam kaidelere dönüşür ve bu kaideler elektron mikroskopta gözlenmiştir (45). A/E lezyonlarının şekillenmesini sağlayan genlerin tümü LEE patojenite adasında lokalize olmuştur. LEE patojenite adasında bunların dışında intimin denilen enterosite bağlanmada görevli dış membran proteinini (OMP) kodlayan *eaeA* geni de bulunur (21,68). Kenny ve arkadaşları (38) intimin reseptörünün de (Tir) LEE tarafından kodlandığını bulmuşlardır. İntiminden farklı 8 kDa' luk başka bir OMP tipinin daha bağlanmayla ilişkili olduğu bulunmuştur (22). Beutin ve arkadaşları (8) yaptıkları çalışmada test ettikleri *E. coli* O157:H7 suşlarının % 89' unda alfa hemolizinden farklı bir enterohemolizin tipi bulmuşlardır. Bu enterohemolizini (EHEC-Hly) üreten suşlar bir gecelik inkubasyon sonrasında standart kanlı agar da hemoliz oluşturmazken, yıkanmış koyun eritrositli agar da küçük, bulanık hemoliz alanları şekillendirmişlerdir. Kromozomal olarak kodlanan alfa hemolizinden farklı olarak EHEC-Hly' nin O157:H7 suşu EDL933' e ait 60 mDa' luk virülens plasmidi olan pO157 tarafından kodlandığı bulunmuştur (64). EHEC-Hly' nin etkenin patogeneziindeki etkisi tam olarak açıklanamamakla beraber ente-

rohemolizin aktivitesi sonucu açığa çıkan hemoglobin bakterinin barsakta üremesinde kullanıldığı düşünülmektedir (46).

E. coli O157:H7 'nin izolasyon ve identifikasyonu için başlıca iki yol izlenebilir. Bunlardan birincisi rutin laboratuvar koşullarında gerçekleştirilebilen, ucuz olmasına karşın biraz zaman ve emek harcanmasını gerektiren klasik yoldur (10). Buna göre materyalde *E. coli* O157:H7 'nin varlığının gösterilmesi sırasıyla selektif bir sıvı besiyerinde zenginleştirme, selektif ve ayırt edici bir katı besiyerine ekim, şüpheli kolonilerin biyokimyasal ve/veya lateks agglutinasyon testleri ile *E. coli* O157 olarak belirlenmesi ve en son olarak izolatın H7 antijeni içerip içermediğinin belirlenmesidir (18,55,76). *E. coli* O157:H7 'nin izolasyonunda kullanılan kültürel yöntemlerin dışında daha az zaman alan ve daha duyarlı olan immunolojik belirleme yöntemleri kullanılabilir. Bunlar ELISA, koloni immunoblot analizi, direkt immunofloresan filtre tekniği, immunomagnetik seperasyon ve çeşitli immün yakalama teknikleridir (10). Bu analiz yöntemlerinde O ve H antijenleri için spesifik olan poliklonal ve monoklonal antikörlerin her ikisi de kullanılabilir. Ayrıca serolojik analiz metodlarından immunoassay, radyo immunoassay (RIA), enzim immunoassay (EIA), PCR ve immün peroksidaz testleri kullanılmaktadır.

E. coli O157:H7 izolasyonunda numune alındıktan sonra yapılacak ilk işlem selektif bir sıvı besiyerinde zenginleştirmedir. Bu amaçla kullanılacak sıvı besiyerlerine *E. coli* besiyeri (EC) (7) modifiye *E. coli* besiyeri (51,56) (mEC), triptik soya besiyeri (25,75) (TSB), modifiye triptik soya besiyeri (35,43) (mTSB) ve lauril sülfat besiyeri (51) (LST) örnek olarak verilebilir. mTSB ve mEC besiyerleri *E. coli* O157:H7 dışındaki türlerin üremesini inhibe etmek amacıyla novobiosin içermektedir (52).

E. coli O157:H7 serotipinin izolasyonunda günümüzde sorbitol MacConkey (SMAC) (39,44) agar, hemorajik kolitis (HC) (74) agar, enterohemorajik *E. coli* (EHEC) (33) agar, CHROMagar O157 (54), modifiye edilmiş EMB (mEMB) (16) agar ve Fluorocult *E. coli* O157 (63) agar gibi pek çok farklı selektif katı besiyeri kullanılmaktadır. Selektif katı besiyeri olarak bugün en yay-

gın kullanılan SMAC agar ve bu besiyerinin çeşitli modifikasyonlarıdır. Bu besiyerinin standart MacConkey agardan farkı, bileşiminde laktoz yerine sorbitol bulunmasıdır. *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol negatif olduğu için bu besiyerinde renksiz koloniler oluşturmaktadır. Buna karşın sorbitolu kullanan bakterilerin oluşturduğu asitlik bir pH indikatörü yardımı ile kolonilerin kırmızı görülmesine neden olduğundan *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol pozitif bakterilerden ayırt edilmektedir (32).

SMAC agar besiyeri çeşitli selektif katkı ile desteklenmekte ve böylece besiyerinde diğer bakterilerin üremesini daha yüksek düzeyde baskılamasını sağlayacak selektivite kazandırılmaya çalışılmaktadır. Bu katkı arasında antiserum (43), 5-bromo-4-chloro-3-indoxyle-b-D-glucuronic acid cyclohexyl ammonium salt (32,53) (BCIG), sefiksim ve tellürit (2,15), ramnoz ve sefiksim (16) ve MUG (1) çeşitli araştırmalarda denenmiştir. Bunlar arasında yeni bir sefalosporin olan sefiksim sorbitol negatif olan *Proteus spp.* 'nin inhibisyonu için önemlidir. Tellürit ile desteklendiğinde *E. coli* O157:H7 dışında kalan ve başta yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı olmak üzere diğer yöntemler ile baskılanamayan diğer *E. coli* 'leri de önemli ölçüde etkilemektedir (58,79).

E. coli O157:H7 serotipi ile diğer *E. coli* serotipleri arasında sorbitol fermentasyonunun negatif olması dışındaki ikinci önemli fark *E. coli* O157:H7'nin β -glukuronidaz (β -GUR) enzimine sahip olmamasıdır. *E. coli* O157:H7 serotipi β -GUR negatif olduğundan diğer serotiplerin hidrolize edebildiği 4-metilyumbelliferone glukuronid (MUG) ile reaksiyon verip 366 nm uzun dalgalı UV ışığı altında floresans oluşturamaz (67). Bu fark temel alınarak Fluorocult *E. coli* O157 agar ve Fluorocult HC agar gibi bazı katı besiyerleri geliştirilmiştir (3). Sorbitol negatif ve MUG reaksiyonu vermeyen kolonilerin O157 olup olmadığının belirlenmesi için lateks aglutinasyon testleri yapılmaktadır (69). *E. coli* O157 antikörleri kullanılarak yapılan lateks aglutinasyon testlerinde *Citrobacter freundii* (7), *E. hermannii* ve *Yersinia enterocolitica* O:9 suşunun çapraz reaksiyon verdikleri belirtilmiştir.

O157 lateks aglutinasyon testi ile *E. coli* O157 serotipine ait olduğu belirlenen kolonilerin *E. coli*

O157:H7 olup olmadıklarını belirlemek için ise H7 antiserumuyla tüp aglutinasyon testi yapılmaktadır. Bu test *E. coli* O157:H7 'nin sahip olduğu H7 flagellar antijeninin D-sorbitolu 24 saat inkubasyon sonunda fermente edebilme yeteneğine dayanılarak geliştirilmiştir. İçerdiği H7 antiserumu antijeni immobilize ederek ortamdaki D-sorbitolün fermentasyonuna engel olur. Ancak diğer serotipleri H7 ' den farklı bir flagella antijenine sahip oldukları için sorbitolu fermente edebilirler (24).

Son 20 yılda *E. coli* O157:H7 popülasyonunda antibiyotiklere karşı dirençte artış görülmüştür (28,41,66). Kim ve arkadaşları (28), 1989-1991 yılları arasında elde edilen izolatların % 7.4' ünün streptomisin, sulfioksazol ve tetrasikline dirençli olduklarını belirlemişlerdir. Schroeder ve arkadaşları (66) da benzer sonuçlar alarak 1985-2002 yılları arasında insanlardan izole edilen *E. coli* O157:H7 izolatlarının % 5 'inin ampisiline, sığır izolatlarının ise % 11' nin tetrasikline dirençli olduklarını bulmuşlardır. Buna karşın Galland ve arkadaşları (41), sığırlardan elde edilen *E. coli* O157:H7 izolatlarının % 38.5 'inin tetrasikline ve % 7.7 'sinin de ampisiline direnç gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Bu araştırmada insanlar için önemli bir gıda kaynaklı patojen olan *E. coli* O157:H7'nin Ege Bölgesi 'nde broiler piliçlerinde varlığının ortaya çıkarılması ve identifiye edilen suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi hedeflenmektedir.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Araştırma için İzmir, Manisa, Aydın, Denizli ve Uşak illerindeki broiler kümeslerinden alınan 500 adet kloakal svap kullanıldı.

Numune besiyerleri ve antiserum testleri: Bakterinin zenginleştirilmesinde mTSB besiyeri (Merck 1.09205); izolasyon ve identifikasyon amacıyla CT SMAC Agar Katkısı (Merck 1.09202) içeren SMAC agar (Difco 279100) besiyeri kullanıldı. CT-SMAC negatif olan koloniler Fluorocult *E. Coli* O157:H7 Agar (Merck 1.04036) besiyerine ekildi. Sonraki aşamalarda ise *E. coli* O157 lam aglutinasyon testi (DENKA SEIKEN-

295347), *E. coli* O157 lateks aglutinasyon testi (Oxoid DR-620M) ve H7 antiserum tüp aglutinasyon testi (DENKA SEIKEN-295354) uygulandı.

Numune antibiyotik diskleri: Antibiyogram testlerinde Oxoid firmasına ait aşağıda sıralanan tanı diskleri kullanıldı: Ampisilin (AMP- 25 µg), Amoksisilin +Klavulonik asit (AMC- 30 µg), Sefotaksim (CTX- 5 µg), Sefalatin (KF- 30 µg), Kloramfenikol (C- 30 µg), Eritromisin (E- 15 µg), Gentamisin (CN- 10 µg), Kanamisin (K- 30 µg), Norfloksasin (NOR- 10 µg), Polimiksin B (PB- 300 IU) ve Trimetoprim + Sulfametoksazol (SXT- 25 µg).

Metot

Numunelerin alınması ve kültürü: Araştırma için Haziran ayı boyunca, İzmir, Aydın, Manisa, Denizli ve Uşak illerinde bulunan 10.000 – 20.000 hayvan kapasiteli broiler kümeslerindeki 42 günlük piliçlerden 500 adet kloakal svap alındı. Kloakal svaplar mTSB' de zenginleştirilerek 42 °C'de 24 saat çalkalanarak inkube edildi (32). Gram negatif basillerin tespit edildiği kolonilere indol testi uygulandı. İndol pozitif sonuç veren koloniler *E. coli* şüpheli olarak belirlendi.

İzole edilen suşların identifikasyonu: İzole edilen suşların koloni morfolojileri, indol testi sonuçları ve identifikasyon besiyerleri ile test sonuçları değerlendirilerek *E. coli* O157:H7 identifikasyonuna gidildi.

mTSB besiyerinde üreyen Gram negatif ve İndol pozitif *E. coli* şüpheli kolonilerden CT-SMAC agarlara öze ile ekim yapıldıktan sonra petriyeler 37 °C' de 24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda renksiz olan koloniler sorbitol negatif, pembe-kırmızı koloniler ise sorbitol pozitif olarak değerlendirildi (3,22).

CT-SMAC agarda üreyip sorbitol negatif sonuç veren kolonilerden Fluorocult *E. coli* O157:H7 agara öze ile ekim yapıldıktan sonra petriyeler 37 °C' de 24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda sorbitolu kullanamayan bakteriler renksiz, sorbitol pozitif koloniler ise sarı renkte koloniler oluşturdu. Sorbitol negatif olan koloniler UV ışını (366 nm) altında incelenerek ışımaya verme-

yen koloniler *E. coli* O157:H7 şüpheli olarak belirlendiler.

E. coli O157:H7 şüpheli olarak belirlenen kolonilere O157 antijeninin varlığının araştırılması amacıyla O157 lam aglutinasyon testi yapıldı (61). *E. coli* O157:H7 şüpheli kolonilerden üç öze dolusu alınarak 3 ml fizyolojik tuzlu su içinde süspanse edildi. Süspanسیون 121 °C 'de 15 dk ve 100 °C 'de 1 saat bekletildikten sonra 900 devirde 20 dk santrifüje edildi. Tüplerdeki süpernatant uzaklaştırılıp çökelti 0.5 ml fizyolojik tuzlu su ile süspanse edilerek antijen olarak kullanıldı. Sonraki aşamada her polivalan antiserumdan bir damla ve 30 µl fizyolojik tuzlu su, asetat kalemi ile bölümlere ayrılmış temiz lamalar üzerine damlatıldı. Lam üzerindeki her antiserum-fizyolojik tuzlu su karışımının üzerine antijen süspanسیونundan 5-10 µl damlatıldı. Lamlar sağa sola 1 dk boyunca eğilerek süspanسیونların karışması sağlandıktan sonra O157 pozitif olan karışımlarda aglutinasyon deseni şekillendi. Polivalan serum ile pozitif sonuç veren örnekler polivalan serumun içerdiği monovalan antikolar belirlenerek yukarıdaki işlemler monovalan serum kullanılarak tekrarlandı ve aglutinasyon pozitif O antijenleri belirlendi.

E. coli O157 lam aglutinasyon testi ile O157 antijenine sahip olduğu belirlenen kolonileri desteklemek amacıyla *E. coli* O157 lateks aglutinasyon testi yapıldı (47). Lateks süspanسیونları oda sıcaklığına getirilerek iyice çalkalanıp karıştırıldı. Reaksiyon kartının üzerindeki dairelerden birine 1 damla test lateksi, 1 öze dolusu fizyolojik tuzlu su ve test edilecek koloniden 1 öze dolusu alınıp karıştırılarak dairenin içine özeyle yayıldı. Reaksiyon kartı 1 dk kadar dairesel hareketlerle sallanarak aglutinasyon deseni veren numunelerin O157 serotipine ait olduğu doğrulandı.

E. coli O157 olarak belirlenen kolonilerle *E. coli* O157:H7 varlığının incelenmesi amacıyla H7 antiserumuyla tüp aglutinasyon testi yapıldı (61). Koloniler Craigy's tüpü içinde bulunan yarı sıvı medyumdan 3-5 defa geçirildi. Daha sonra BHI sıvı medyumuyla bakteri kültürü hazırlandı ve 37 °C 'de bir gece inkübe edilip eşit miktarda %1 w/v formalin içeren fizyolojik tuzlu su ile karıştırıldı. Test tüplerine üçer damla H antiserumlarından damlattıktan sonra her bir tüpe 0.5 ml bakteri süspanسیونundan damlatıldı. H antiserumu içer-

meyen bir tüp ise kontrol olarak kullanıldı. Tüplerdeki antiserum ve hücre süspanسیونları iyice karıştırıldıktan sonra 50 °C 'lik su banyosunda 1 saat bekletildi. 1 saat sonunda H7 antiserumuyla aglutinasyon deseni şekillenen tüplerdeki koloniler *E. coli* O157:H7 pozitif olarak değerlendirildi.

Antibiyotik duyarlılık testi: Antibiyotik duyarlılık testlerinde Müeller-Hinton Agar (Difco) kullanılarak Kirby-Bauer Disk Diffüzyon yöntemi uygulandı (5). Antibiyogram testlerinde kullanılan antibiyotik diskleri Oxoid firmasına ait olup diskler ve disk içerikleri şunlardır: Ampisilin (AMP- 25 µg), Amoksisilin + Klavulonik asit (AMC- 30 µg), Sefotaksim (CTX- 5 µg), Sefalatin (KF- 30 µg), Kloramfenikol (C- 30 µg), Eritromisin (E- 15 µg), Gentamisin (CN- 10 µg), Kanamisin (K- 30 µg), Norfloksasin (NOR- 10 µg), Polimiksin B (PB- 300 IU) ve Trimetoprim + Sulfametoksazol (SXT- 25 µg)' dur. Yönteme uygun hazırlanan besiyerleri 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra disk çevresindeki inhibisyon zon sınırları ölçülerek Clinical and Laboratory Standards Institute (17) standartlarına göre yorumlandı.

BULGULAR

Bu araştırmada, 500 adet kloakal svap örneğinin 32 (% 6.40)'sinden *Escherichia coli* O157:H7 serotipi identifiye edilmiştir. Ayrıca örneklerin 128 (% 25.60)' inden diğer *E. coli* türleri, 75 (% 15)' inden *Klebsiella sp.*, 193 (% 38.60)' ünden *Proteus sp.*, 38 (% 7.60)' inden *Pseudomonas sp.* identifiye edilmiş, 34 (% 6.80)' ünde ise bakteriyel üreme görülmemiştir.

Tablo 1. Broiler piliçlerinden alınan kloakal svaplardan izole ve identifiye edilen mikroorganizmalar.

İzole ve İdentifiye Edilen Mikroorganizmalar	İzolat Sayısı	Yüzde oranı (%)
<i>E. coli sp.</i>	128	25.60
<i>E. coli</i> O157:H7	32	6.40
<i>Klebsiella sp.</i>	75	15.00
<i>Proteus sp.</i>	193	38.60
<i>Pseudomonas sp.</i>	38	7.60
Bakteriyel Üreme Olmayan	34	6.80
TOPLAM	500	100.00

Araştırmada identifikasyon besiyerlerinde üremeden sonra yapılan O157 lateks aglutinasyon ve lam aglutinasyon testleri sonucunda 32 (% 6.40) adet izolatan *E. coli* O157 serotipine ait oldukları görülmüştür. Bu izolatlar ile yapılan H7 antiserum tüp aglutinasyon testi sonucunda ise O157 serotiplerinin tümünün H7 flagellar antijenine sahip oldukları belirlenmiş ve bu izolatlar *E. coli* O157:H7 serotipi olarak tanımlanmıştır.

Araştırmada kullanılan kloakal svap örnekleri Manisa'da bulunan broiler kümeslerinden 180 adet, İzmir'den 140, Aydın'dan 108, Denizli'den 36 ve Uşak'tan 36 adet olacak şekilde toplanmıştır. Örneklerden izole edilen *E. coli* O157:H7 suşlarının illere göre sayıları oranlandığında en yüksek yüzdenin 13/108 (% 12.04) ile Aydın ilinde olduğu belirlenmiştir. Bu oranı 9/140 (% 6.43) ile İzmir, 2/36 (% 5.55) ile Uşak, 7/180 (% 3.88) ile Manisa ve 1/36 (% 2.77) oranı ile Denizli takip etmektedir.

Tablo 2. İllere göre elde edilen *E. coli* O157:H7 serotipi miktarları ve yüzdeleri.

Şehirler	Örnek Sayısı	<i>E. coli</i> O157:H7 sayısı	Yüzde Oranı (%)
Manisa	180	7	3.88
İzmir	140	9	6.43
Aydın	108	13	12.04
Denizli	36	1	2.77
Uşak	36	2	5.55
TOPLAM	500	32	

E. coli O157:H7 izolatlarıyla yapılan antibiyogram testleri sonucunda izolatların Polimiksin B' ye % 100.00, Cefotaxime % 75.00, Norfloksasin % 59.38 oranlarında duyarlı; Kanamisin % 37.50 oranında orta derecede duyarlı; Ampisiline %100.00, Cephalotine % 100.00, Kloramfenikole % 87.50, Sulfametoksazol-Trimetoprim %81.25, Eritromisin %81.25 ve Amoksisilin-Klavulonik aside % 62.50 oranlarında dirençli oldukları bulunmuştur.

Tablo 3. Antibiyotik duyarlılıklarının *E. coli* O157:H7 izolatlarına göre dağılımı.

Antibiyotik Duyarlılığı	NOR (%)	AMP (%)	C (%)	KF (%)	PB (%)	K (%)	SXT (%)	AMC (%)	CTX (%)	CN (%)	E (%)
Duyarlı	59,4	0,0	12,5	0,0	100,0	25,0	18,8	37,5	75,0	62,5	18,8
Orta Duyarlı	9,4	0,0	0,0	0,0	0,0	37,5	0,0	0,0	3,1	3,1	0,0
Dirençli	31,3	100	87,5	100	0,0	37,5	81,3	62,5	21,9	34,4	81,3

AMC: Amoksisilin-klavulonik asit, NOR: Norfloksasin, C: Kloramfenikol, CN: Gentamisin, K: Kanamisin, AMP: Ampisilin, PB: Polimiksin B, E: Eritromisin, SXT: Sulfametoksazol-Trimetoprim, KF: Cephalotin, CTX: Cefotaxim.

TARTIŞMA

E. coli O157:H7 serotipi son yıllarda insanlarda görülen zoonoz ve gıda kaynaklı enfeksiyon ve salgınların en önemli nedenlerinden biridir. Etken diare, hemorajik kolitis (HC) ve hemolitik üremik sendroma (HUS) neden olur. Hastalık insanlarda karın ağrısı, sulu ya da kanlı ishal gibi gastrointestinal semptomlar ve daha az sıklıkta da sistemik komplikasyonlarla seyreder. *E. coli* O157:H7 serotipi köpek, kuş, koyun, geyik ve insanda görülmekle beraber, sığır temel kaynak olarak ele alınmaktadır. Bununla beraber, hayvan dışkı ile bulaşmış toprak ve suyun dolaylı olarak hastalığın taşınmasında ve yayılmasında önemli bir rol oynadığı da bilinmektedir (51).

E. coli O157:H7 epidemiyolojisinin en önemli özellikleri; sığır ya da başka bir hayvanın intestinal sisteminde bulunması, rezervuar hayvandan çok çeşitli gıdalara ve özellikle de sığır etine bulaşması, çok düşük bir enfeksiyöz dozla bulaşıp konak insanda yüksek oranlara ulaşması ve insandan insana bulaşarak salgınlara neden olmasıdır (51). Dünya çapında sığır etine yönelim yüksek fiyatlar ve zoonoz hastalıklar yüzünden azalmıştır. Tavuk eti ise düşük fiyatı ve sığır oranla sağlıklı beyaz eti sayesinde gün geçtikçe artan oranlarda tüketilmektedir. Bu sebeple son yıllarda kanatlı sektörden elde edilen son ürünün hijyen şartları sağlanarak tüketiciye ulaştırılması çok büyük bir önem kazanmıştır. Bu açıdan bakıldığında *E. coli* O157:H7 serotipinin tavuk etlerinde ve yumurtalarında bulunup bulunmadığı eğer var ise ne ölçüde bulaşma olduğunun bilinmesi gerekmektedir.

Doyle ve Schoeni' nin (22) yaptığı bir çalışmada, sığır, koyun, domuz ve tavuk etlerinden alınan örneklerden *E. coli* O157:H7 izole edilme-ye çalışılmıştır. Çalışma sonunda sığır örneklerinden % 3.7, koyun % 2, domuz % 1.5 ve tavuk % 1.5 olmak üzere *E. coli* O157:H7 tespit edilmiştir. Etken tavuk butu örneklerinde belirlenmiş ve yine başka bir araştırmada piliç nugget numunelerinde de *E. coli* O157:H7 serotipine rastlanmıştır (48). Abdul-Raouf ve arkadaşları (1), tavuk eti örneklerinin % 4 'ünden *E. coli* O157:H7 izole edebilmişlerdir. Fransa'da yapılan bir başka araştırmada (77) ise, tavuk, sosis ve sığır kıymasından oluşan 250 örnekte 4 tavuk, 1 sosis ve 1 kıyma örneğinde shiga toksin oluşturmeyen *E. coli* O157 tespit edildiği bildirilmiştir.

E. coli O157:H7 'nin tavuk etinden veya dışkı örneklerinden izole edilemediği çalışmalar ne yazık ki çoğunluktadır (9,13,14,39). *E. coli* suşlarında belirlenen O157:H7 serotipi oranları, hayvan türlerine göre değerlendirildiğinde çalışma bulgularının birbirinden farklı olması *E. coli* suşlarındaki serotipik yapının bölgesel ve ülkesel olarak değişebileceği (78) ve kullanılan metotların (18,49,70) farklı olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Japonya'da Kijima-Tanaka ve arkadaşlarının (40) yaptığı çalışmada, sağlıklı sığır, domuz ve tavuklardan toplanan dışkı örnekleri *E. coli* O157:H7 yönünden incelenmişlerdir. Ancak sonuçlara göre hiçbir tavuk dışkısından *E. coli* O157:H7 izole edilememesine rağmen sığır örneklerinin % 23, domuz örneklerinin ise % 14' ünde izolasyon başarıyla gerçekleştirilmiştir. Blanco ve arkadaşları (9), tavuklardan izole ettikleri 625 *E. coli* suşunun O157 negatif olduklarını bulmuşlardır. Chahed ve arkadaşları (13), 1999-2003 yılları arasında biftek, dana eti, domuz, tavuk ve balıklar üzerinde yaptıkları araştırmada tavuk eti ve deri örneklerinin *E. coli* O157:H7 yönünden negatif olduklarını belirlemişlerdir.

E. coli O157:H7 üzerinde tüm dünyada ve buna paralel olarak Türkiye 'de de çalışmalar sürdürülmektedir. Ancak bilindiği kadarıyla Türkiye' de tavuklardan *E. coli* O157:H7 serotipinin izole edildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla beraber Gülhan' ın yaptığı (30) çalışmada, sığırlardan izole edilen 6 (% 12), buzağılardan

9 (% 18), koyunlardan 13 (% 26), kedilerden 1 (% 2), köpeklerden 8 (% 16), tavuklardan 3 (% 6), güvercin ve martılardan da 2 (% 4) suş O157 serotipi olarak saptanmıştır. Baran ve Gülmez (4) ise, dana bifteklerinden % 6 oranında *E. coli* O157:H7 izole ederken, tavuk bagetlerinde yapılan incelemeler negatif sonuç vermiştir.

Daha önce yapılan araştırmalar göstermektedir ki *E. coli* O157:H7 serotipi tavuklardan alınan kloakal svap veya dışkı örneklerinden izole edilememiştir (15,39). Ancak yaptığımız çalışmada İzmir, Aydın, Manisa, Denizli ve Uşak illerindeki fason broiler kümeslerinden alınan 500 adet kloakal svabın 32' sinden (% 6.40) *E. coli* O157:H7 serotipi identifiye edilmiştir. Bu veri bir günlük broiler veya yumurtacı civcivlere deneysel olarak *E. coli* O157:H7 inokule edilen çalışmaların sonuçlarını doğrulamaktadır (6,30,65). Bu çalışmaların ortak sonucu etkenin sekumda kolonize olup uzun süreler boyunca dışkıyla saçıldığını göstermektedir. Diğer bir önemli nokta ise çalışmamızda alınan numunelerin tümünün sahadan toplanmış olması ve deneysel bir enfeksiyon ya da etken inokulasyonunun söz konusu olmamasıdır.

E. coli O157:H7 'nin tavuk eti ve tavuk eti ürünlerinden izole edildiği çalışmalar (1,11,48,77) ise kesim aşamasından tüketiciye kadar herhangi bir aşamada et veya şarküteri ürününün etkenle kontamine olduğunu göstermektedir. *E. coli* O157:H7 tavukların intestinal sisteminde sürekli olarak yerleşik olarak bulunmaktadır. İncelenen 101 yumurtanın 14' ünde (% 13.9) kabuk üzerinde etkene rastlanırken, yumurta sarısında veya akında *E. coli* O157:H7 yönünden yapılan testler negatif olarak sonuçlanmıştır (65).

E. coli O157:H7 serotipinin birçok antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu rapor edilmesine (73) karşın Kore 'de Kim ve arkadaşlarının (42) gerçekleştirdiği çalışmada kullanılan *E. coli* O157:H7 suşlarının % 45.5' inin iki veya daha fazla antibiyotiğe karşı direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. Suşların eritromisine karşı dirençlilikleri % 100 olarak bulunmuştur. Bu oranı % 27.2 ile ampicilin, % 18.2 ile sefalotin ve yine % 18.2 'lik oranla tetrasiklin izlemektedir. Hindistan 'da yapılan başka bir çalışmaya göre ise, antimikrobiyal direnç zonları en çok ampicilin (% 25.4), tetrasiklin (% 23.8) ve streptomisinle (% 14.3) şekillenirken; sefalotin

(% 11.1) ve nalidiksik aside (% 6.4) karşı geliştirilen direnç daha düşüktür (38). Bu bilgilerin ışığında *E. coli* O157:H7 serotipinin ampisilin ve eritromisine dirençli olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda *E. coli* O157:H7 izolatlarıyla yapılan antibiyogram testleri sonucunda izolatların Polimiksin B' ye % 100.00, Cefotaxime % 75.00, Norfloksasine % 59.38 oranlarında duyarlı, Kanamisine % 37.50 oranında orta derecede duyarlı; Ampisiline % 100.00, Cephalotine % 100.00, Kloramfenikole % 87.50, Sulfametoksazol-Trimetoprim % 81.25, Eritromisine % 81.25 ve Amoksisilin-Klavulonik aside % 62.50 oranlarında dirençli oldukları bulunmuştur. Araştırmamızda belirlenen Ampisilin ve Eritromisine karşı oluşan yüksek oranda dirençlilik diğer çalışmalarla (38,42) örtüşürken Kloramfenikol ve Trimetoprim-Sulfametoksazole karşı oluştuğunu belirlediğimiz dirençlilik hakkında geçmişte yapılan çalışmalarla pek uyuşmayan sonuçlar elde edilmiştir (26).

TEŞEKKÜR

Doktora tez konusunun seçimi ve çalışmaların yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA`ya ve çalışmalarımda desteklerini gördüğüm hocam Yrd. Doç. Dr. Şükrü KIRKAN, Araştırma Görevlisi Serten TEKBIYIK, tüm Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Araştırma Görevlilerine ayrıca tezimin her aşamasında manevi desteğini esirgemeyen eşim Gürhan DURSUN`a ve tüm aileme teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R., Ammar, M.S. (1993): Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants and temperature, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (8), 2364-2368.
2. Akkuş, F. (1996): Hazır sığır kıymalarında verotoksin oluşturan *Escherichia coli* O157:H7 izolasyonu, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.

3. Anon (1998): Singlepath *E. coli* O157:H7, Leaflet Merck Microbiology W120 133 081 198 E. Merck Company Darmstad.
4. Baran, F., Gülmez, M. (2002): The occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in the ground beef and chicken drumsticks, *J. Food Safety.* 2, 13-15.
5. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493-496.
6. Best, A., La Ragione, R.M., Cooley, W.A., O'Connor, C.D., Velge, P., Woodward, M.J. (2003): Interaction with avian cells and colonisation of specific pathogen free chicks by Shiga-toxin negative *Escherichia coli* O157:H7 (NCTC 12900), *Vet Microbiol.* 93, 207-222.
7. Bettelheim, K.A., Evangelidis, H., Pearce, J.L., Sowers, E., Strockbine, N.A. (1993): Isolation of a *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157 antigen, *J. Clin. Microbiol.* 31, 760-761.
8. Beutin, L., Montenegro, M.A., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S., Stephan, R. (1989): Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*, *J. Clin. Microbiol.* 2, 2559-2564.
9. Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., Blanco, J. (1997): Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: Relationship with in vivo pathogenicity, *J. Clin. Microbiol.* 35 (11), 2953-2957.
10. Boer, E.D., Heuvelink, A.E. (2000): Methods for the detection and isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Society for Applied Microbiology Symposium Series*, 29, 133-143.
11. Carter, A.O., Borczyk, A.A., Carlson, J.A., Harvey, B., Hockin, J.C., Karmali, M.A.,

- Krishnan, C., Korn, D.A., Lior, H. (1987): A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home, *N. Engl. J. Med.* 317, 1496–1500.
12. Centers For Disease Control and Prevention (1993): Update: Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United State, *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 42, 258-263.
 13. Chahed, A., Ghafir, Y., China, B., Dierick, K., De Zutter, L., Piepard, D., Daube, G. (2005): Survey of the contamination of foodstuffs of animal origin by shigatoxin producing *Escherichia coli* serotype O157:H7 in Belgium from 1999 to 2003, *Euro. Surveill.* 10(3), 33-36.
 14. Chapman, P.A., Siddons, C.A., Zadik, P.M., Jewes, L. (1991): An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157, *J. Med. Microbiol.* 35(7), 110.
 15. Chapman, P.A., Siddons, C.A., Cerdan Malo, A.T., Harkin, M.A. (2000): A one year study of *Escherichia coli* O157:H7 in raw beef and lamb products, *Epidemiol. Infect.* 124 (2), 207-213.
 16. Clavero, M.R.S., Beuchat, L.R. (1995): Suitability of selective plating media for recovering heat or freeze stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef, *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3268-3273.
 17. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2007): Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing, Seventeenth Informational Supplement M100-S17. CLSI, Pennsylvania, pp. 64-69.
 18. Cutter, C.N. (2000): Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* associated with beef, *J. Food Prot.* 63(5), 601-607.
 19. Dell'Omo, G., Morabito, S., Quondam, R., Agrimi, U., Ciuchini, F., Macri, A., Caprioli, A. (1998): Feral pigeons as a source of verocitotoxin-producing *Escherichia coli*, *Vet. Rec.* 142, 309-310.
 20. Dho, M., Fairbrother, J.M. (1999): Avian pathogenic *E. coli*, *Vet. Res.* 30, 299-316.
 21. Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., Finlay, B.B. (1997): Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells, *Trends Microbiol.* 5, 109–114.
 22. Doyle, M.P., Schoeni, J.L. (1987): Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry, *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2394-2396.
 23. Dytoc, M., Soni, R., Cockerill, III F., De-Azavedo, J., Louie, M., Brunton, J., Sherman, P. (1993): Multiple determinants of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 attachment-effacement, *Infect. Immun.* 61, 3382–3391.
 24. Faith, N.G., Shere, J.A., Brosch, R., Arnold, K.W., Ansay, S.E., Lee, M.S., Luchansky, J.B., Kapsar, C.W. (1996): Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin, *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1519–1525.
 25. Fach, P., Perelle, S., Grout, J., Dilasser, F. (2003): Comparison of different tests for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and development of an ELISA-assay for specific identification of the bacteria, *J. Microbiol. Meth.* 55, 383–392.
 26. Feng, P.C.S., Lum, R., Chang, G. (1991): Identification of *uidA* gene sequence in beta-D-glucuronidase negative *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 320-323.
 27. Francis, D.H., Collins, J.E., Duimstra, J.R. (1986): Infection of gnotobiotic pigs with an *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with an outbreak of hemorrhagic colitis, *Infect. Immun.* 51, 953–956.
 28. Galland, J.C., Hyatt, D.R., Crupper, S.S.,

- Acheson, D.W. (2001): Prevalence, antibiotic susceptibility, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from longitudinal study of beef cattle feedlots, *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1619-1627.
29. Garrity, G.M., Brunner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (2005): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Edition. The Proteobacteria Published Springer, New York, USA.
30. Gülhan, T. (2003): Sağlıklı görünen hayvanların dışkılarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarının biyokimyasal, enterotoksijenik ve verotoksijenik özelliklerinin belirlenmesi, *Yüzüncü Yıl Üni. Vet. Fak. Derg.* 14 (1), 102-109.
31. Halkman, A.K., Noveir, M.R., Doğan, H.B. (1998): Çeşitli hayvansal gıda ürünlerinde *E. coli* O157:H7 aranması, TÜBİTAK-VHAG-1192 Nolu Proje. Ankara .
32. Halkman, A.K., Noveir, M.R., Doğan, H.B. (2001); *Escherichia coli* O157:H7 serotipi, A. Ü. Ziraat Fak., Gıda Mühendisliği Bölümü Ankara. Sim Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara.
33. Hitchins, A.D., Feng, P., Watkins, W.D., Rippey, S.R., Chandler, L.A. (1998): *Escherichia coli* and the coliform bacteria, In, *Bacteriological Analytical Manual (BAM)* 6th Ed. US Food and Drug Administration. Published and Distributed by AOAC, Virginia. 31 Bölüm + 3 Ek, bölüm 4.
34. Itoh, Y., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Iwaki, M., Hara-Kuda, Y., Saito, N., Noguchi, Y., Konuma, H., Kumagai, S. (1998): Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts, *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1532-1535.
35. Johnson, J.L., Brooke, C.L., Fritschel, S.J. (1998): Comparison of the BAX for screening/*E. coli* O157:H7 method with conventional methods for detection of extremely low levels of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef, *Appl. Environ. Microbiol.* 64(11), 4390-4395.
36. Karch, H., Heesemann, J., Laufs, R., O'Brien, A.D., Tacket, C.O., Levine, M.M., (1987): A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells, *Infect. Immun.* 55, 455-461.
37. Karmali, M.A. (1989): Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 15-38.
38. Kenny, B., Deviney, R., Stein, M., Rheinscheid, D.J., Frey, E.A., Finlay, B.B. (1997): Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells, *Cell. Microbiol.* 91, 511-520.
39. Khan, A., Das, S.C., Ramamurthy, T., Sikdar, A., Khanam, Y., Yamasaki, S., Takeda, Y., Nair, G.B. (2002): Antibiotic resistance, virulence gene and molecular profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources in Calcutta, India, *J. Clin. Microbiol.* 40, 2009-2015.
40. Kijima-Tanaka, M., Ishihara, K., Kojima, A., Morioka, A., Nagata, R., Kawanishi, M., Nakazawa, M., Tamura, Y., Takahashi, T. (2005): A national surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food-producing animals in Japan, *J. Vet. Med.* 52, 230-237 .
41. Kim, H., Samadpour, M., Grimm, L., Clausen, J., Beser, T., Baylor, M., Kobayashi, J., Neill, M.L., Schoenknecht, F., Tarr, P. (1994): Characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State, 1984-1991, *J. Infect. Dis.* 170, 1606-1609.
42. Kim, J.Y., Kim, S.H., Kwon, N.H., Bae, W.K., Lim, J.Y., Koo, H.C., Kim, J.M., Noh, K.M., Jung, W.K., Park, K.T., Park, Y.H. (2005): Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex and RAPD, *J. Vet. Sci.* 6(1), 7-19.

- 43.** Kleanthous, H., Fry, N.K., Smith, H.R., Gross, R.J. (1988): The use of sorbitol MacConkey agar in conjunction with a specific antiserum for the detection of cytotoxin producing strains of *Escherichia coli* O157, *Epidemiol. Infect.* 101, 327-335.
- 44.** Kobayashi, H., Pojhanvirta, T., Pelkonen, S. (2002): Prevalence and characteristics of intimin- and shiga toxin-producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland, *J. Vet. Med. Sci.* 64(11), 1071-1073.
- 45.** Knutton, S., Baldwin, K., Williams, B.H., McNeisch, A.S. (1989): Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Infect. Immun.* 57, 1290-1298.
- 46.** Law, D., Kelly, J. (1995): Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* serogroups, *Infect. Immun.* 63, 700-702.
- 47.** March, S.B., Ratnam, S.J. (1986): Sorbitol MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis, *J. Clin. Microbiol.* 23, 869-872.
- 48.** Martin, M.L., Shipman, L.D., Potter, M.E., Wachsmuth, I.K., Wells, J.G., Hedberg, K., Tauxe, R.V., Davis, J.P., Arnoldi, J., Tilleli, J. (1986): Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome, *Lancet* ii:1043.
- 49.** Masalmeh, M.A., Youssef, U., Silber, R. (1990): Characterization of hemolytic *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic dogs and cats, *Wiener Tierärztl. Monatssch.* 77, 254-258.
- 50.** Nataro, J.P., Kaper, J.B. (1998): Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142-201.
- 51.** Noveir, M.R., Halkman, A.K. (2000): A study on selective broths and agar media for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 serotype, *Tur. J. Vet. Anim. Sci.* 24, 459-464.
- 52.** Okrend, A.J.G., Rose, B.E., Bennett, B.A. (1990): A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef, *J. Food Prot.* 53, 249-252.
- 53.** Okrend, A.J.G., Rose, B.E., Lattuda, C.P. (1990): Use of 5-bromo-4 chloro-3-indoxy- β -D-glucuronide in sorbitol MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef, *J. Food Prot.* 53(11), 941-943.
- 54.** Onoue, Y., Konuma, H., Nakagawa, H., Hara-Kudo, Y., Fujita, T., Kamagai, S. (1999): Collaborative evaluation of detection methods for *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprout and ground beef, *Int. J. Food Microbiol.* 46, 27-36.
- 55.** Özbaş, Y., Aytaç, A. (1995): *Escherichia coli* O157:H7 epidemiyolojisi, gıdalarla ilişkisi, patojenitesi ve izolasyon yöntemleri, *Türk Hıjy. Deney. Biyol. Derg.* 52(1), 47-53.
- 56.** Pao, S., Patel, D., Kalantari, A., Tritschler, J.P., Wildeus, S., Sayre, B.L. (2005): Detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 in feces of small ruminants and their isolation with various media, *Appl. Environ. Microbiol.* 71(4), 2158-2161.
- 57.** Parma, A.E., Sanz, M.E., Blanco, J.E., Blanco, J., Vinas, M.R., Blanco, M., Padola, N.L., Etcheverria, T.L. (2000): Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina, *Eur. J. Epidemiol.* 16, 757-762.
- 58.** Park, S., Worobo, R., Durst, R. (1999): *Escherichia coli* O157:H7 As an emerging foodborne pathogen : A literature review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39(6), 481-502.
- 59.** Paton, J.C., Paton, A.W. (1998): Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections, *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450-479.

- 60.** Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.B., Davis, B.R., Herbert, R.J., Olcott, G.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.L. (1983): Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype O157:H7, *N. Engl. J. Med.* 308, 681-685.
- 61.** Sakazaki, R. (1992): Serotyping of diarrheagenic *E. coli*, *Med. Circ.* 34, 117.
- 62.** Samadpour, M., Ongerth, J.E., Liston, J., Tran, N., Nguyen, D., Whittam, T.S., Wilson, R.A., Tarr, P.I. (1994): Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington, *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1038-1040.
- 63.** Sarımehtemetoğlu, B., Küplülü, Ö., Kaymaz, Ş. (1998): Hamburger ve inegöl köftelerinden *Escherichia coli* O157:H7 izolasyonu, *Ank. Üni. Vet. Fak. Derg.* 45, 221-227.
- 64.** 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 Microbiol. Lett.* 117, 189-196.
- 65.** Schoeni, J.L., Doyle, M.P. (1994): Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs, *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2958-2962.
- 66.** Schroeder, C., Zhao, C., Debroy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D., Wagner, D., McDermott, P., Walker, R., Meng, J. (2002): Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 576-581.
- 67.** Scott, T.M., Parveen, S., Portier, K.M., Rose, J.B., Tamplin, M.L., Farrah, S.F., Koo, A., Lukasik, J. (2003): Geographical variation in ribotype profiles of *Escherichia coli* isolates from humans, swine, poultry, beef, and dairy cattle in Florida, *Appl. Environ. Microbiol.* 60(2), 1089-1092.
- 68.** Sherman, P., Soni, R., Karmali, M. (1988): Attaching and effacing adherence of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* to rabbit intestinal epithelium in vivo, *Infect. Immun.* 56, 756-761.
- 69.** Smith, H.R., Scotland, S.M. (1993): Isolation and identification methods for *Escherichia coli* O157 and other Vero cytotoxin producing strains, *J. Clin. Pathol.* 46, 10-17.
- 70.** Solmaz, H., Aksakal, A., Kaya, A. (2000): Neonatal buzağılardan izole edilen *Escherichia coli*'lerin bazı özellikleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları, *Hayvan. Araş. Derg.* 10, 1-2, 47-50.
- 71.** Sowers, E.G., Wells, J.G., Strockbine, N.A. (1996): Evaluation of commercial latex reagents for identification of O157 and H7 antigens of *Escherichia coli*, *J. Clin. Microbiol.* 34, 1286-1289.
- 72.** Stavric, S., Buchanan, B., Gleeson, T.M. (1993): Intestinal colonization of young chicks with *Escherichia coli* O157:H7 and other verotoxin-producing serotypes, *J. Appl. Bacteriol.* 74, 557-563.
- 73.** Swerdlow, D.L., Woodruff, B.A., Brady, R.C., Griffin, P.M., Tippen, S., Donnell, H.D., Geldreich, E., Payne, B.J., Neyer, A., Wells, J.G., Grene, K.D., Bright, M., Bean, N., Blake, P.A. (1992): A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death, *Ann. Intern. Med.* 117, 812-819.
- 74.** Szabo, R.A., Todd, E.C.D., Jean, A. (1986): A method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food, *J. Food Prot.* 49, 768-772.
- 75.** Trochimchuk, T., Fotgheringhama, J., Topp, E., Schraft, H., Leung, K.T. (2003): A comparison of DNA extraction and purification methods to detect *Escherichia coli* O157:H7 in cattle manure, *J. Microbiol. Meth.* 54, 165-175.

- 76.** Tunail, N. (2000): Mikrobiyel infeksiyonlar ve intoksikasyonlar, Alınmıştır, “Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Böl. Yay., Sim Matbaacılık Ltd. Ankara, 522 s”. pp 81-184.
- 77.** Wadolkowski, E.A., Burris, J.A., O’Brien, A.D. (1990): Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Infect. Immun.* 58, 2438-2445.
- 78.** Wallace, J.S., Cheasty, T., Jones, K. (1997): Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds, *J. Appl. Microbiol.* 82, 399-404.
- 79.** Weagant, S.D., Bryant, J.L., Jinneman, K.G. (1995): An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods, *J. Food Prot.* 58, 7-12.