



T.C.  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**KOYUNLARDAN İZOLE EDİLEN SHİGA TOKSİN ÜRETEN  
*ESCHERICHIA COLI* SUŞLARININ VİRÜLENS  
FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**NURAY ŞAHİN**

**MİKROBİYOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Murat YILDIRIM**

**KIRIKKALE- 2023**





T.C.  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**KOYUNLARDAN İZOLE EDİLEN SHİGA TOKSİN ÜRETEN  
*ESCHERICHIA COLI* SUŞLARININ VİRÜLENS  
FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**NURAY ŞAHİN**

**MİKROBİYOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Murat YILDIRIM**

**KIRIKKALE- 2023**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Nuray ŞAHİN tarafından hazırlanan “KOYUNLARDAN İZOLE EDİLEN SHİGA TOKSİN ÜRETEN *ESCHERİCHİA COLİ* SUŞLARININ VİRÜLENS FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OYBİRLİĞİ /OY ÇOKLUĞU ile Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Murat YILDIRIM İmza: .....  
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi  
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Başkan: Prof. Dr. Murat YILDIRIM İmza: .....  
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi  
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Üye: Prof. Dr. Aylin KASIMOĞLU İmza: .....  
Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi  
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Üye: Doç. Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK İmza: .....  
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi  
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Üye: Doç. Dr. İnci Başak MÜŞTAK İmza: .....  
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi  
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Sibel KIZIL İmza: .....  
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi  
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Tez Savunma Tarihi: 07/08/2023

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....  
Prof.Dr. Zeynep TEZEL  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nuray ŞAHİN

07/08/2023

## ÖZET

### KOYUNLARDAN İZOLE EDİLEN SHİGA TOKSİN ÜRETEEN *ESCHERİCHİA COLİ* SUŞLARININ VİRÜLENS FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kırıkkale Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Murat YILDIRIM

Agustos 2023, 58 sayfa

Tüm dünyada, Shiga toksin (*Stx*) üreten *Escherichia coli* (STEC), önemli zoonotik patojen olarak kabul edilmektedir. Başta sığırlar olmak üzere geniş getiren hayvanlar, hastalığın ana rezervuarlarıdır, ancak küçükbaş hayvanlardan bulaşan hastalıkların, insanlarda meydana gelen enfeksiyonların epidemiyolojisindeki rolü pek çok ülkede kapsamlı bir şekilde değerlendirilmemiştir. Bu çalışmada koyunlarda *E. coli* suşları içerisinde *Stx* üreten izolatlarda *Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *ehxA* genlerinin ve *Stx* alt tiplerinin belirlenmesi ayrıca bunlara ırk ve cinsiyet gibi değişkenlerin etkisini belirlemek amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, Ankara ili ve çevresindeki 12 farklı koyun sürüsünden alından 272 rektal sıvaptan izole edilen 215 *E. coli* izolatlarında STEC suşlarının virulens genleri ile *Stx* alt tipleri tanımlandı. İzolatlardan 19 (%8,84)'unda *Stx1*, 3 (%1,4)'ünde *Stx2*, 5 (%2,33)'inde *eae* ve 9 (%4,19)'unda *ehxA* geni tek başına tespit edildi. İzolatların 13 (%6,05)'ünde *Stx1-Stx2-ehxA*, 5(%2,33)'inde *Stx1-eae-ehxA*, 3 (%1,4)'ünde *Stx2-eae-ehxA* genleri birlikte tespit edildi. Aynı şekilde 1(%0,47) *Stx1-eae*, 30 (%13,95) adet *Stx1-ehxA*, 1(%0,47) *Stx2-eae*, 15 (%6,98) *Stx2-ehxA* ve 10 (%4,65) adet *eae-ehxA* birlikte tespit edildi. İzolatların 101(%46,98)'inde *Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *ehxA* genlerinden her hangi biri tespit edilmedi. *Stx1* geni tespit edilen 68 izolattan 56 (%82,35)'sında sadece *stx1c* ve 3 (%4,41)'ünde *Stx1a-Stx1c* birlikte, 2 (%2,94)'sında *Stx1c-Stx1e* birlikte ve 1(%1,47)'inde *Stx1a-Stx1c-Stx1e* birlikte tespit edilmiş olup, 6 izolatta ise hiçbir gen tespit edilemedi. *Stx2* geni tespit edilen 35 izolattan 21 (%60) *Stx2f*, 19 (%54,29) *Stx2c*, 16 (%45,71) *Stx2b*, 8 (%22,86) *Stx2d*, 7 (%20) *Stx2h*, 3 (%8,57) *Stx2l*, 2 (%5,71) *Stx2a*, 2 (%5,71) *Stx2e*, 2 (5,71) *Stx2j* tespit edilmiş olup, *Stx2* tespit edilen 8 izolatta ise hiçbir gen tespit edilemedi. Bu veriler koyunlarda STEC varlığını ortaya koyarak insanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olma potansiyeli bulunduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Alt tip, Koyun, Shiga Toksin Üreten *Escherichia coli* (STEC), *Stx1*, *Stx2*

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF VIRULENCE FACTORS OF SHIGA TOXIN-PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED FROM SHEEP

Kırıkkale University

Graduate School of Health Sciences

Department of Veterinary Microbiology, Master Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Murat YILDIRIM

August 2023, 58 page

All over the world, *Escherichia coli* (STEC), which produces Shiga toxin, is recognized as an important zoonotic pathogen. Ruminants, particularly cattle, are the main reservoirs of the disease, but the role of ovine-borne diseases in the epidemiology of human infections has not been extensively evaluated in many countries. In this study, it was aimed to determine the *Stx1*, *Stx2*, *eae* and *ehxA* genes and Stx subtypes in isolates producing Stx within *E. coli* strains in sheep and to determine the effects of variables such as race and gender.

In this study, virulence genes of STEC strains and shiga toxin subtypes were identified in 215 *E. coli* isolates isolated from 272 rectal swab from 12 different sheep herds in and around Ankara. Of the 215 isolates, only 19 (8.84%) *Stx1*, 3 (1.4%) *Stx2*, 5 (2.33%) *eae* and 9 (4.19%) *ehxA* genes were detected. Of the isolates, 13 (6.05%) *Stx1-Stx2-ehxA*, 5 (2.33%) *Stx1-eae-ehxA*, 3 (1.4%) *Stx2-eae-ehxA* were detected together. 1 (0.47%) *Stx1-eae*, 30 (13.95%) *Stx1-ehxA*, 1 (0.47%) *Stx2-eae*, 15 (6.98%) *Stx2-ehxA* and 10 (4.65%) *eae-ehxA* were detected together. Of 68 isolates with the *Stx1* gene detected, 56 (percentage 82, 35) only *stx1c* and 3 (4.41%) *Stx1a-Stx1c* together, 2 (2.94%) *Stx1c* together with *Stx1e* and 1 (1.47%) were detected together with *Stx1a-Stx1c-Stx1e*, and none of the genes could be detected in 6 isolates. Of 35 isolates with the *Stx2* gene detected, 22 (62.86%) *Stx2f*, 19 (54.29%) *Stx2c*, 16 (45.71%) *Stx2b*, 8 (22.86%) *Stx2d*, 8 (22.86%) *Stx2h*, 3 (8.57%) *Stx2I*, 2 (5.71%) *Stx2a*, 2 (5.71%) *Stx2e*, 2 (5.71) *Stx2j* were detected, and none of the genes were detected in 8 isolates. These data suggest the presence of STEC in sheep, indicating the potential to cause serious infections in humans.

**Keywords:** Sheep, Shiga Toxin Producing *E. coli*, Subtype, *Stx1*, *Stx2*.

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi ve tez çalıőmamın yürütölmesi sürecinde bilgi ve önerileriyle desteğini esirgemeyen danışman hocam, Prof. Dr. Murat YILDİRİM'a ve tez çalıőmam boyunca bilgi ve tecrübeleri ile desteğini her zaman hissettiğim Dr.Öğr. Üyesi Sibel KIZIL'a saygı ve őükranlarımı sunarım.

Çalıőmamın saha ve laboratuvar çalışma sürecinde destek olan Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim dalı tüm doktora ve yüksek lisans öğrencilerine, aileme ve çalışma arkadaşlarıma teőekkürlerimi sunarım.

Nuray şAHİN



# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	III
<b>ABSTRACT</b> .....	IV
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	V
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	VI
<b>ÇİZELGELER</b> .....	IX
<b>RESİMLER</b> .....	X
<b>KISALTMALAR VE SİMGELER</b> .....	XI
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1. 1. Tarihçe ve Tanım.....	3
1. 2. Taksonomi .....	3
1. 3. Escherichia coli Türünün Genel Özellikleri ve Patotipleri.....	5
1. 3. 1. İntestinal E. coli Patotipleri .....	6
1. 3. 1. 1. Enterotoksijenik E. coli (ETEC).....	6
1. 3. 1. 2. Enteropatojenik E. coli (EPEC).....	6
1. 3. 1. 3. Enteroagregatif E. coli (EAEC).....	7
1. 3. 1. 4. Enteroinvaziv E. coli (EIEC).....	7
1. 3. 1. 5. Diffüz aderan E. coli (DAEC) .....	7
1. 3. 1. 6. Vero- veya Shiga toksin üreten E. coli (VTEC/STEC).....	7
1. 3. 2. Ekstraintestinal E. coli Patotipleri .....	8
1. 3. 2. 1. Septisemik Patojenik E. coli (SEPEC) .....	8
1. 3. 2. 2. Neonatal Meningitis E. coli (NMEC).....	9
1. 3. 2. 3. Üropatojenik E. coli (UPEC).....	9
1. 3. 2. 4. Avian Patojenik E. coli (APEC) .....	9
1. 3. 2. 5 Diğer Potansiyel E. coli Patotipleri .....	9
1. 4. Virülans Faktörleri.....	10
1. 4. 1. Adezinler .....	10
1. 4. 2. Aerobaktin sideroforları .....	11
1. 4. 3. Serum Direnci.....	11

1. 4. 4. Kolisin Aktivitesi.....	11
1. 4. 5. Toksinler .....	11
1. 4. 5. 1. Termolabil Enterotoksin .....	11
1. 4. 5. 2. Termostabil Enterotoksin .....	12
1. 4. 5. 3. Endotoksin .....	12
1. 4. 5. 4. Nörotoksin .....	12
1. 4. 5. 5. Sitotoksik Nekrotizan Faktör .....	13
1. 4. 5. 6. Hemolizin .....	13
1. 4. 5. 7. Shiga / Vero Toksin (Stx / VT) .....	13
1. 5. STEC GENEL ÖZELLİKLERİ.....	14
1. 6. STEC'in Virülans Faktörleri .....	14
1. 6. 1. Shiga Toksin (Stx) .....	14
1. 6. 1. 1. Shiga Toksin (Stx) Yapısı.....	15
1. 6. 1. 2. Shiga Toksin (Stx) Reseptörleri .....	16
1. 6. 1. 3. Shiga Toksin (Stx) Patogenezi .....	16
1. 6. 1. 4. İnsanlardaki STEC Enfeksiyonlarında Hastalık Tablosu .....	18
1. 6. 1. 5. STEC Epidemiyolojisi .....	18
1. 6. 1. 6. Ruminantlarda STEC.....	19
1. 6. 1. 7. Stx1 ve Stx2' nin alt tipleri.....	19
1.6. 2. İntimin (eae) .....	20
1.6. 3. Enterohemolizin (ehxA, e-hlyA) .....	20
1. 6. 4. STEC Agglutine Edici Adezyon Proteini (Saa) .....	20
1. 6. 5. Cytolethal Distending Toksin-V (CDT- V).....	21
1. 6. 6. Katalaz Peroksidaz (KatP).....	21
1. 6. 7. Uzun Polar Fimbria (Lpf).....	21
1. 6. 8. Ekstraselüler Serin Proteaz (EspP).....	21
1. 6. 9. Subtilaz Toksin (SubAB).....	22
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>23</b>
2. 1. MATERYAL .....	23
2. 1. 1. Örnekler .....	23
2. 1. 2. Kullanılan Cihazlar .....	23
2. 1. 3. İzolasyon ve İdenfikasyonda Kullanılan Kimyasallar .....	23
2. 1. 3. 1. Mac Conkey Agar.....	23
2. 1. 3. 2. Nutrient Broth.....	23
2. 1. 3. 3. Nutrient Agar .....	24

2. 1. 3. 4. Triple Sugar Iron Agar .....	24
2. 1. 3. 5. Urea Agar .....	24
2. 1. 3. 6. Oksidaz Ayıracı .....	24
2. 1. 3. 7. Kovaks İndol Ayıracı.....	24
2. 1. 3. 8. BBL Crystal Hızlı İdentifikasyon Kiti.....	24
2. 1. 3. 9. Agarose jel.....	25
2. 1. 3. 10. Ethidium Bromide Solüsyonu .....	25
2. 1. 3. 11. Tris Acetate EDTA Buffer .....	25
2. 1. 3. 12. Nuclease-Free Water .....	25
2. 1. 3. 13. Marker .....	25
2. 1. 3. 14. Master Mix .....	25
2. 1. 3. 15. Primerler .....	25
2. 2. YÖNTEM .....	27
2. 2. 1. İzolasyon ve İdentifikasyon.....	27
2. 2. 1. 1. İzolasyon.....	27
2. 2. 1. 2. İdentifikasyon .....	27
2. 2. 2. DNA İzolasyonu .....	28
2. 2. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	28
2. 2. 3. 1. Virülans Genleri ( <i>Stx1</i> , <i>Stx2</i> , <i>eae</i> ve <i>ehxA</i> ) Profilleme.....	28
2. 2. 3. 1. <i>Stx</i> Alt Tiplendirmesi İçin PCR.....	29
2. 2. 3. 1. <i>Stx1</i> Alt Tiplendirmesi için PCR.....	29
2. 2. 3. 2. <i>Stx2</i> Alt Tiplendirilmesi İçin PCR .....	30
2. 5. Elektroforez .....	31
2. 6. İstatistik Analizi.....	32
<b>3. BULGULAR</b> .....	33
3. 1. Bakteri İzolasyon ve İdentifikasyon Test Sonuçları.....	33
3. 2. PCR Sonuçları .....	33
3. 2. 1. PCR ile Virülans Genleri ( <i>Stx1</i> , <i>Stx2</i> , <i>eae</i> ve <i>ehxA</i> ) Profillenmesi33	
3. 2. 2. <i>Stx1</i> Alt Tiplendirilmesi Sonuçları .....	34
3. 2. 3. <i>Stx2</i> Alt Tiplendirilmesi Sonuçları .....	35
3. 3. İstatistik .....	38
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	41
<b>KAYNAKLAR</b> .....	45

## ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 1. 1. <i>Escherichia coli</i> 'nin taksonomisi .....	4
Çizelge 2.1. Kullanılan Primerler .....	26
Çizelge 2. 2. İdentifikasyonda kullanılan konvansiyonel test kılavuzu.....	27
Çizelge 2. 3. Virülans genleri ( <i>Stx1</i> , <i>Stx2</i> , <i>eae</i> ve <i>ehxA</i> ) profillemde kullanılan PCR koşulları.....	29
Çizelge 2. 4. <i>Stx1</i> alt tiplendirilmesi için PCR koşulları .....	30
Çizelge 2. 5. <i>Stx2a</i> , <i>Stx2b</i> , <i>Stx2c</i> , <i>Stx2d</i> , <i>Stx2e</i> , <i>Stx2g</i> alt tipleri için PCR Karışımı ve PCR koşulları .....	30
Çizelge 2. 6. <i>Stx2f</i> , <i>Stx2h</i> , <i>Stx2j</i> alt tipleri için PCR koşulları.....	31
Çizelge 2. 7. <i>Stx2k</i> , <i>Stx2l</i> , <i>Stx2i</i> alt tipleri için PCR koşulları .....	31
Çizelge 3. 1. <i>E. coli</i> izolasyon oranı .....	33
Çizelge 3. 2. <i>Stx2</i> alt tiplendirmesi sonuçları .....	36
Çizelge 3. 3. Birlikte saptanan <i>Stx1-Stx2-exhA</i> genlerinin dağılımı .....	37
Çizelge 3. 4. Virülans genlerinin cinsiyete göre dağılımı.....	38
Çizelge 3. 5. Virülans genlerinin türlere göre dağılımı .....	39

# RESİMLER

Sayfa

<b>Resim 1. 1.</b> Stx Yapısı .....	16
<b>Resim 1.2.</b> Shiga Toksini Üreten <i>Escherichia coli</i> Enfeksiyonunun Bulaşmasının Şematik Gösterimi.....	19
<b>Resim 3. 1.</b> <i>Stx1, Stx2, Eae, EhxA</i> Genlerinin Jel Görüntüsü.....	34
<b>Resim 3 2.</b> Stx1 Alt tiplendirmesinin Jel Görüntüsü.....	34
<b>Resim 3. 3.</b> Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2g Alt Tiplendirmesi İçin Jel Görüntüsü.....	35
<b>Resim 3. 4.</b> Stx2k, Stx2l, Stx2i Alt Tipleri İçin Jel Görüntüsü.....	35

## KISALTMALAR VE SİMGELER

%	Yüzde
-	Eksi
°C	Santigrad derece birimi
µL	Mikrolitre
AFA	Afimbrial adezinler
AIEC	Adherent-invazif <i>E. coli</i>
APEC	Avian Patojenik <i>E. coli</i>
Bfp	Bundle-Forming Pilus
bp	Base pair
CDT- V	Cytolethal Distending Toksin-V
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
clyA	silotizin A
CNF	Sitotoksik Nekrotizan Faktör
DAEC	Diffuz Aderent <i>E. coli</i>
dk	Dakika
<i>eae</i>	İntimin geni
EAEC	Enteroagregatif <i>E. coli</i>
<i>ehly</i>	Enterohemolizin geni
<i>ehxA</i>	Enterohemolizin geni
EIEC	Enteroinvaziv <i>E. coli</i>
EnPEC	Endometriyal patojenik <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropatojenik <i>E. coli</i>

EspP	Ekstraselüler Serin Proteaz
ETEC	Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
ExPEC	Ekstraintestinal patojenik <i>E. coli</i>
Fe	Demir
Gb3	Globotriosil seramid
Gb	Globotetraosil seramide
gr	Gram
HK	Hemorajik Kolit
hlyA	$\alpha$ -hemolizin
HUS	Hemolitik Üremik Sendrom
KatP	Katalaz Peroksidaz
LEE	Locus of enterocyte effacement
Lpf	Uzun Polar Fimbria
LPS	Lipopolisakkarit
LT	Labil Toksin
MPEC	Meme patojenik <i>E. coli</i>
Omp	Outer Membrane Protein A (Dış membran proteini)
PCR	Polymerase Chain Reaction
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
RTX	Repeats-in-toxin
Saa	STEC agglutine edici adezyon proteini
SEPEC	Septisemik Patojenik <i>E. coli</i>
SLT	Shiga benzeri (Shiga like) toksin
Sn	Saniye
ST	Stabil Toksin
STEC/VTEC	Shiga toksijenik <i>E. coli</i> / Verotoksijenik <i>E. coli</i>

Stx	Shiga toksin
SubAB	Subtilaz Toksin
TAE	Tris Acetate EDTA Buffer
TraT	Complement Resistance Protein
TSI	Triple Sugar Iron Agar
UPEC	Üropatojenik <i>E. coli</i>





# 1. GİRİŞ

Japon mikrobiyolog Dr. Kiyoshi Shiga tarafından 19. yüzyılda *Shigella dysenteriae*'nin virülans faktörü olarak karakterize edilmiş olan Shiga toksinin (*Stx*); *Escherichia coli* (*E. coli*) izolatları tarafından da üretildiği tespit edilmiştir. (Trofa, Ueno-Olsen, Oiwa ve Yoshikawa, 1999). Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) olarak adlandırılan, hemorajik kolit (HK) ve hemolitik üremik sendroma (HÜS) neden olan *E. coli*'ler 1980'lerden beri küresel bir halk sağlığı sorunudur. Shiga toksin üreten *E. coli* suşları dünya çapında gıda kaynaklı önemli bir halk sağlığı tehdidi olarak tanımlanmıştır (Jajarmi, Imani Fooladi, Badouei ve Ahmadi, 2017). Shiga toksin üreten *E. coli* enfeksiyonları, tüm dünyada çocuklarda ve yaşlılarda şiddetli diyare salgınlarına neden olmaktadır. Toksin üretimi ve salımı; kanlı ishal ve HK'den HÜS'a, böbrek yetmezliği ve nörolojik sorunlarla seyreden ciddi komplikasyonlara neden olmaktadır. (Mühlen ve Dersch, 2020). Shiga toksin üreten *E. coli* özellikle sanayileşmiş ülkelerde ciddi gastrointestinal hastalıklara neden olmaktadır (Kaper ve O'Brien, 2014). Bakteriler genellikle az pişmiş et, özellikle sığır eti ürünleri, çapraz kontamine çiğ sebzeler, filizler ve tohumlar gibi kontamine yiyeceklerin tüketilmesi yoluyla bulaşmaktadır (Caprioli, Scavia ve Morabito, 2014).

Yüzyıllardır insanların birçok ihtiyacını karşılayan koyunlar, tüm dünyada yaygın olarak yetiştirildiği gibi ülkemizin de hemen hemen her bölgesinde yetiştirilmektedir. Koyun yetiştiriciliği Türkiye ekonomisinde önemli bir yere sahip olmasına karşın halen istenilen düzeye getirilememiştir. İklim değişikliği ve artan nüfus dikkate alındığında insanların kırmızı et ihtiyaçlarının karşılanmasında; verimsiz meraları, tarıma elverişli olmayan alanları değerlendirebilen koyunların yetiştiriciliğinin artacağı düşünülmektedir. TÜİK verilerine göre Türkiye'de 2019 yılında 45,1 milyon küçükbaş hayvanın %75'i koyun, %25'i keçiden oluşmaktadır. Türkiye'deki küçükbaş hayvan varlığının %22'sini bulandıran ve küçükbaş hayvan sayısı en fazla olan 5 il sırasıyla Van, Konya, Şanlıurfa, Diyarbakır ve Ankara'dır. Türkiye'de kırmızı et üretimi yüksek maliyetli olmasından dolayı, kişi başına kırmızı et tüketimi gelişmiş ülkelere kıyasla daha düşük seviyelerdedir. Türkiye'de kişi başına

düşen 14,8 kg'ın 13,3 kg'ı büyükbaş, 1,5 kg'ı küçükbaş eti oluşturmaktadır. Dünyada küçükbaş et tüketimi ortalama 1,7 kg olup ülkemiz ortalamasının üzerindedir. Ayrıca güney yarım küredeki bazı ülkelerde tüketim miktarları daha fazladır. Avustralya'da 8,5 kg ve Uruguay'da ise 6,6 kg ortalamalarındadır (TEPGE, 2021). Bu çalışmada, genetik yöntemler ile yapılan koyun yetiştiriciliğinin 'Tek Tıp Tek Sağlık' kavramı ile ilişkisini belirlemek ve moleküler metotların etkin olarak uygulanması amaçlanmıştır.

Shiga toksin üreten *E. coli* birçok hayvanın bağırsak florasında oportünist olarak bulunur ve bu hayvanların dışkıları ile etrafa saçılmaktadır. Sığırlar STEC ve EPEC suşları için temel rezervuarı kabul edilse de (Ferhat, Chahed, Hamrouche, Korichi-Ouar ve Hamdi, 2019) koyunlarda dışkı kaynaklı enfeksiyonların prevalansı %40'lara varmaktadır. (Blanco vd. 2003b; Chapman, Siddons, Gerdan, Malo ve Harkin, 1997; Kudva, Hatfield ve Hovde, 1996; Kudva, Hatfield ve Hovde, 1997; Ogden, MacRae ve Strachan, 2005). Bazı çalışmalarda ise sığır dışkısı ile karşılaştırıldığında koyun dışkısında daha yüksek prevalansta STEC tespit edilmiştir (Mora, Herrerra, López, Dahbi ve Mamani, 2011; Amézquita-López vd., 2012; Momtaz, Safarpour Dehkordi, Rahimi, Ezadi ve Arab, 2013). Türkiye'de koyunlarda *E. coli* prevalansını araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır (Türütöğlü, Öztürk, Güler ve Pehlivanoğlu, 2007; Gülhan, İlhan, Aksakal, Solmaz ve Ekin, 2009; Goncuoglu, Bilir Ormanci, Ayaz ve Erol, 2010; Gökçe, Ünver ve Erdoğan 2010). Koyunlarda STEC izolatlarının başlıca virülans özelliklerinin analiz edilmesi, insanlarda gıda kaynaklı STEC enfeksiyonlarının epidemiyolojisini ve patojenitesini aydınlatılabilir.

Sığırlar, STEC'in ana rezervuarları olmakla birlikte koyunların da rezervuar olarak insanlarda kanlı ishal, HK ve HÜS gibi enfeksiyonlara neden olduğunu bildiren epidemiyolojik çalışmalar bulunmaktadır (Belanger vd., 2011; Brandal vd., 2012; Ferhat vd., 2019). Sürü sağlığı ve yönetimi kapsamında, mastitis, ayak hastalıkları ve neonatal sepsisimler dikkate alınması gereken hastalıklar olmakla birlikte, bu hastalıklara yönelik koruma ve mücadele uygulamalarının hayata geçirilmesinden önce hastalıkların etiolojisinde rol oynayan patojenlerin virülans faktörlerinin belirlenmesi ilk adımdır. Bu tez çalışmasında koyunlarda sürü sağlığını olumsuz etkileyebilecek ve dolaylı olarak ekonomik kayba neden olabilecek *E. coli* suşları içerisinde *Stx* üreten izolatlarının virülans faktörlerinin saptanması amaçlanmıştır.

## 1. 1. Tarihçe ve Tanım

*E. coli*, ilk kez 1885 yılında, Alman mikrobiyolog ve pediatrist Theodor Escherich tarafından bebek dışkılarından izole edilmiş ve *Bacterium coli commune* olarak adlandırılmıştır (Blount, 2015). Theodor Escherich'in 1911'de ölümünden sonra adına atfen Castellani ve Chalmers tarafından 1919 yılında *B. coli commune* ismi "*Escherichia coli*" olarak değiştirilmiştir (Scheutz ve Strockbine 2015; Méric, Hitchings, Pascoe ve Sheppard, 2016). *E. coli* uzun süre tüm sıcakkanlı hayvanların normal bağırsak florasının bir parçası kabul edilse de (Nataro ve Kaper 1998; Wasteson, 2002; Fairbrother ve Nadeau, 2006; Walker, 2008) 1920'li yıllarda üriner sistem enfeksiyonlarına ve 1940'lı yıllarda da çocuklarda gastroenteritise neden olduğu anlaşılmıştır (Fratamico ve Smith, 2005). Zamanla *E. coli*'nin yara enfeksiyonları, mastitis, enteritis, ürogenital enfeksiyonlar, septisemi ve meningitis gibi hastalıklara neden olabileceği anlaşılmıştır (Wasteson, 2002).

Escherichia cinsi bakteriler, *Proteobacteria filumuna*, *Gammoproteobacteria* sınıfına, *Enterobacteriales* takımına, *Enterobacteriaceae* ailesine aittir. *E. coli*, 1,1-1,5x2,0-6,0 µm boyutunda, sporsuz Gram negatif, uçları yuvarlak çomak şeklinde, çoğunlukla hareketli, asidorezistans özelliği olmayan, sporsuz, laktozu fermente eden, katalaz pozitif, oksidaz negatif, optimum gelişme sıcaklığı 37°C, optimum gelişme pH'sı 7,2 olan bir bakteridir (Bergey, Sneath ve Holt, 1986). *E. coli*, insan ve bazı memelilerin bağırsak florasında bulunması nedeniyle zararsız olarak kabul edilse de bazı tipleri insanlarda ve hayvanlarda hastalıklara sebep olabilmektedir (Kaper, Nataro ve Mobley, 2004).

## 1. 2. Taksonomi

Escherichia cinsi, Bergey's "Manual of Systematic Bacteriology"nin ikinci baskısında, 2. ciltte, "Proteobakteriler" bölümünde, "Gammaproteobakteriler" sınıfında yer almıştır (Garrity, Bell ve Lilburn, 2004). Proteobakteriler, en geniş kapsamlı bakteri grubu olup, 1000'den fazla tür içerir ve 16S ribozomal nükleik asit (rRNA) gen dizilerinin karşılaştırılması sonucunda; Alfa, Beta, Gamma, Delta, Epsilon, Zetaproteobacteria, Oligoflexia, Acidithiobacillia ve Hydrogenophilalia olmak üzere 9 farklı sınıfa ayrılmıştır (Williams ve Kelly, 2013; Nakai vd., 2014; Boden, Hutt ve Rae, 2017). Gammaproteobakteriler, çeşitli fizyolojik tipleri ile

proteobakterilerin en büyük alt grubunu teşkil ederler ve *Enterobacteriaceae* familyası bu sınıf içerisinde yer alır (Prescott, Harley ve Klein, 2002; Garrity, Bell ve Lilburn, 2004).

*Enterobacteriaceae* familyası içerisinde, günümüzde 37 genus (*Biostraticola*, *Buttiauxella*, *Calymmatobacterium*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Franconibacter*, *Gibbsiella*, *Intestinirhabdus*, *Izhakiella*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Kosakonia*, *Koserella*, *Leclercia*, *Lelliottia*, *Levinea*, *Limnobaculum*, *Mangrovibacter*, *Metakosakonia*, *Phytobacter*, *Pluralibacter*, *Pseudoescherichia*, *Pseudocitrobacter*, *Raoultella*, *Rosenbergiella*, *Saccharobacter*, *Salmonella*, *Scandinavium*, *Shigella*, *Shimwellia*, *Siccibacter*, *Trabulsiella* ve *Yokenella*) yer almaktadır (Castellani ve Chalmers, 1919). *Escherichia* generusu günümüzde toplam beş türden oluşmaktadır. *E. coli*, 1980 yılına kadar *Escherichia* generusu içindeki tek tür olmakla birlikte, 1980’ de *Escherichia adecarboxylata* ve *Escherichia blattae*, 1983’te *Escherichia hermannii* ve *Escherichia vulneris*, 1985’de *Escherichia fergusonii*, 2003’de *Escherichia albertii*, 2015’de ise *Escherichia marmotae* türleri bu genera dahil edilmiştir. *E. adecarboxylata* 1987’de *Leclercia adecarboxylata*, *E. blattae* 2010’da *Shimwellia blattae* ve *E. vulneris* 2017’de *Pseudoescherichia vulneris* olarak yeniden klasifiye edilmiş ve *Escherichia* generusundan çıkartılmışlardır (Castellani ve Chalmers, 1919). *E. coli*’nin taksonomisi Tablo 2.1’de verilmiştir.

**Çizelge 1. 1.** *Escherichia coli*’nin taksonomisi

Alem	<i>Bacteria</i>
Bölüm	<i>Proteobacteria</i>
Sınıf	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Takım	<i>Enterobacteriales</i>
Aile	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	<i>Escherichia</i>
Tür	<i>Escherichia coli</i>

### 1. 3. *Escherichia coli* Türünün Genel Özellikleri ve Patotipleri

*E. coli*, silindirik basil yapılı, 1,1-1,5x2,0-6,0 µm boyutunda, Gram negatif, çoğunlukla hareketli, sporsuz, laktozu fermente eden, katalaz pozitif, oksidaz negatif bir bakteridir (Sneat, Mair, Sharpe ve Holt, 1986).

*E. coli*, insan ve bazı memelilerin bağırsak florasında bulunması nedeniyle zararsız olarak kabul edilse de bazı tipleri insanlarda ve hayvanlarda hastalıklara sebep olabilmektedir (Kaper vd., 2004). Bununla birlikte, belirli serotipler veya klonlar hem bağırsak hem de bağırsak dışı hastalıklarda önemli rol oynamaktadır. Bu bakterinin sağlıklı bireylerdeki patogenezi, büyük ölçüde çeşitli spesifik virülans faktörlerine sahip olmasına bağlıdır. İmmun sistemi zayıf olan konaklarda, *E. coli* fırsatçı patojen olabilmektedir. (Kaper vd., 2004; Scheutz ve Strockbine, 2015). Patojen *E. coli* suşları, meydana getirdikleri hastalık türüne ve sahip oldukları virülans faktörlerine göre sınıflandırılmaktadır. *E. coli*'ler intestinal ve ekstraintestinal enfeksiyon sebepleri olarak ikiye ayrılmaktadır (Omerovic, Müştak ve Kaya, 2017). İntestinal patojenik *E. coli* şiddetli kolitis, dizanteri ve diyareye neden olabilirken, ekstraintestinal patojenik *E. coli* ise septisemilere, üriner sistem enfeksiyonlarına neden olmaktadır. İntestinal hastalıklardan izole edilen *E. coli* suşları, epidemiyolojik ve fenotipik özelliklerine, klinik semptomlarına, spesifik virülans faktörlerine göre Shiga toksin üreten *E. coli* (VTEC veya STEC), Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Vero- veya Enteroagregatif *E. coli* (EAEC), Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), Diffuz Aderent *E. coli* (DAEC), Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) şeklinde 6 farklı sınıfa ayrılmıştır (Scheutz ve Strockbine, 2015). Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC), sağlıklı hayvanların bağırsak florasında kommensal olarak bulunur ve fakültatif patojen özelliğindedir. ExPEC grubunda yer alan patotipler: Septisemik Patojenik *E. coli* (SEPEC), Neonatal Meningitis *E. coli* (NMEC), Uropatojenik *E. coli* (UPEC), Avian Patojenik *E. coli* (APEC) ve diğer potansiyel *E. coli* patotipleri şeklinde 5 farklı sınıfa ayrılmaktadır (Kaper vd.,2004; Omerovic vd., 2017).

### **1. 3. 1. İntestinal *E. coli* Patotipleri**

#### **1. 3. 1. 1. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)**

Enterotoksijenik *E. coli* suşları hem insanlarda hem de evcil hayvanlarda diyarenin önemli nedenlerindedir (Scheutz ve Strockbine, 2015). Enterotoksijenik *E. coli* hafif, kendini sınırlayan diyareden, şiddetli diyareye kadar değişebilen klinik semptomlarla seyreden diyare etkenidir. Bu mikroorganizma gelişmekte olan ülkelerde çocuk ishallerinin ve bu ülkelere seyahat giden turist diyaresinin ana sebebidir (Nataro ve Kaper, 1998). Enterotoksijenik *E. coli*, insan veya hayvan dışkıları ile kontamine olmuş süt, su ve gıdalarla bulaşmaktadır. Sulu diyare, dehidrasyon ve bağırsak emiliminde azalmaya neden olmaktadır (Nagy ve Fekete, 1999; Scheutz ve Strockbine, 2015; Lupindu, 2017). Enterotoksijenik *E. coli* suşları, bağırsak epitel hücrelerine zarar vermez, ancak kolera toksini ile yakından ilişkili olan termolabil enterotoksin (LT) ya da termostabil enterotoksin (ST) üretir (Nataro vd., 1987a). Enterotoksijenik *E. coli* enfeksiyonlarının patogenezinde rol oynayan diğer virülans faktörü de konak bağırsak epiteline kolonizasyonu sağlayan fimbrial ve afimbrial adezinlerdir. Hayvanlarda en yaygın görülen fimbrial adezinler; K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F17, F41, F42, CS31A, F141 ve F165'tir (Scheutz ve Strockbine, 2015; Omerovic vd., 2017).

#### **1. 3. 1. 2. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)**

Enteropatojenik *E. coli*, Neter tarafından 1955 yılında *E. coli*'nin ilk tanımlanan patotipidir. Enteropatojenik *E. coli* suşları, hayvanlarda ve insanlarda diyareye neden olmaktadır (Kaper vd., 2004). Gelişmekte olan ülkelerde bebeklerde, sulu ve kanlı diyareye neden olan en önemli etkenlerden biridir (Fard, Dallal, Moradi ve Rajabi, 2019). Enteropatojenik *E. coli* suşları hücre içi sinyalizasyonu bozarak diyare oluşturmaktadır (Milon, Oswald ve De Rycke, 1999). Enteropatojenik *E. coli* suşları, bağırsak epitel hücrelerindeki mikrovilluslara kolonize olarak membran mikrovilluslarında çeşitli lezyonlara ve bozukluklara yol açarak bağırsak enterositlerini etkilemektedir. Buzağı, kuzu ve domuz yavrularında neonatal diyare ve ileitis; bebeklerde de diyareye neden olmaktadır (Padhye ve Doyle, 1992; Milon vd., 1999).

### **1. 3. 1. 3. Enteroagregatif *E. coli* (EAEC)**

Enteroagregatif *E. coli* tüm dünyada çocuk ve yetişkinlerde persistan diyarenin nedeni olarak giderek daha fazla tanınmakta ve dünya genelinde çeşitli salgınların nedeni olarak bilinmektedir. Enteroagregatif *E. coli*, stabil ve labil toksin salgılamaması ve HEP-2 hücrelerine otoagreatif olarak bağlanıp, 'tuğla yığını' benzeri adezyon paterni göstermesi ile bilinmektedir. (Nataro vd.,1987b). Enteroagregatif *E. coli* enfeksiyonlarında temel strateji intestinal mukozanya kolonizasyon, enterotoksin ve sitotoksinlerin salınımıdır. Enteroagregatif *E. coli*'nin virülansı sahip olduğu çeşitli toksinler ve agregasyonu sağlayan fimbria tarafından sağlanmaktadır (Nataro vd., 1987b). Enteroagregatif *E. coli* suşlarının salgıladıkları toksinler yardımıyla, insanlarda akut veya kronik diyareye, abdominal sancıya yol açtıkları belirtilmektedir (Scheutz ve Strockbine, 2015).

### **1. 3. 1. 4. Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC)**

Enteroinvaziv *E. coli* suşları, *Shigella* türleri ile yakın ilişkilidirler (Omerovic vd., 2017). Bu patojen suşlar, *Shigella* türleri gibi, insanlarda distal kalın bağırsağın epitel hücrelerine kolonize olup çoğalabilmektedir (Scheutz ve Strockbine, 2015). Kolon epitel hücrelerini yıkımlayarak, nekroza ve sulu, kanlı, mukoz karakterde ishalleri neden olmaktadır (Nataro ve Kaper, 1998).

### **1. 3. 1. 5. Diffüz aderan *E. coli* (DAEC)**

Diffüz aderan *E. coli* suşları Hep-2 hücre tabakalarına diffüz adezyon özelliğinin saptanması ile tanımlanmaktadır. Bu suşlar, Hep-2 hücrelerinin yüzeyinden uzanan parmak şeklindeki uzantılara kolonize olabilmektedir. Suşların birçoğu, F1845 olarak adlandırılan bir fimbrial adezin salgılamaktadır. Diffüz aderan *E. coli* suşları, çocuklarda süreklilik gösteren ishale neden olmaktadır (Kaper vd., 2004; Omerovicvd., 2017).

### **1. 3. 1. 6. Vero- veya Shiga toksin üreten *E. coli* (VTEC/STEC)**

Shiga toksin üreten *E. coli*, ilk olarak 1977'de tanımlanmıştır. Shiga toksin üreten *E. coli* suşlarının bu isimle tanımlanmasının nedeni, üretmiş oldukları sitotoksinin *Shigella dysenteriae* toksini ile genetik ve protein yapısı olarak benzer olmasından ileri gelmektedir (Omerovic vd., 2017). *E. coli* sitotoksinleri, canlılarda semptomların ve ölümün meydana gelmesinde rol oynayan temel faktörlerdendir.

(Clermont, Christenson, Denamur ve Gordon, 2013). Shiga toksin üreten *E. coli* suşlarının bağırsak hücrelerine kolonizasyonunu sağlayan virülans faktörü ise intimindir. Bağırsak mukozasına yapışma ve bunun sonucunda mukozada meydana gelen dejenerasyona bağlı olarak çeşitli lezyonlar görülmektedir (Kariyawasam, Johnson ve Nolan, 2006). Shiga toksin üreten *E. coli*'in patogeneğinde rol oynayan diğer bir virülans faktörü ise, plazmit ile kodlanan Enterohemolizin (Ehly)'dir (Omerovic vd., 2017). Enterohemorajik *E. coli* suşları, enterohemolizin ve sitotoksin (Stx/VT) oluştururlar. Bir *E. coli* suşunda sitotoksin üretiminin yanısıra, bağırsak epitellerine yapışma ve bozukluklara yol açma mekanizmasını sağlayan locus enterocyte effacement (LEE) patojenite adası mevcut ise, bu suşlara EHEC (örneğin, O157: H7) adı verilir. Enterohemorajik *E. coli* suşları, insanlarda hemorajik kolitis, ishal ve HÜS'e neden olur. Enterohemorajik *E. coli* suşlarının ana rezervuarı ruminantlar olup, insanlarda görülen ilk vakalar, az pişmiş hamburger tüketimiyle ilişkilendirilmiştir. Daha sonra, sosis, pastörize edilmemiş süt, elma suyu, marul, kavun, turp ve brüksel lahanası gibi çeşitli gıda maddeleri enfeksiyon kaynağı olarak bildirilmiştir (Kaper vd., 2004). Tüm dünyada, gıda kaynaklı enfeksiyonlara yol açan en önemli EHEC serotipleri, O157:H7 ve O157: NM olarak bilinmektedir (Padhye ve Doyle, 1991).

### **1. 3. 2. Ekstraintestinal *E. coli* Patotipleri**

#### **1. 3. 2. 1. Septisemik Patojenik *E. coli* (SEPEC)**

Septisemik Patojenik *E. coli* suşları, kolonize oldukları konaklarda septisemiye neden olmaktadır. Bu suşlar tarafından meydana gelen enfeksiyon sürecinin her adımında çeşitli virülans faktörlerinin olduğu ve invaziv suşların bu virülans faktörlerinin kombinasyonlarını kullandıkları bilinmektedir. İnvazyon sürecindeki ilk basamak adezinler aracılığı ile bağırsak yüzeyine tutunmadır. Septisemik Patojenik *E. coli* suşlarında, Colicin V'yi kodlayan bir Col V plazmiti bulunmaktadır. Bu Col V plazmiti, ayrıca invazyon ve tutunmayı sağlayan tip IV pilusunu kodlamaktadır. Bu plazmit *E. coli* suşlarının canlılığını sürdürmesine yardımcı olan serum direnci ve aerobaktin demir alım sistemlerini de regüle etmektedir (Conceição, Ludovico, Andrade ve Yano 2012).



### **1. 3. 2. 2. Neonatal Meningitis *E. coli* (NMEC)**

*E. coli*'nin bu patotipi, %15-40 ölüm oranı ve ciddi nörolojik bozukluklara yol açan, Gram negatif neonatal menenjitisinin en yaygın nedenidir (Kaper vd., 2004). Neonatal Meningitis *E. coli* suşları, genellikle, *Neisseria meningitidis* tip B kapsülü ile özdeş K1 antijenine sahip olan O7, O18ac, O1 ve O6 gruplarıyla ilişkilidir. En yaygın olarak izole edilen tiplerden biri ise, O18ac: K1:H7 serotipinin S fimbriyalı klonudur (Scheutz ve Strockbine, 2015).

### **1. 3. 2. 3. Üropatojenik *E. coli* (UPEC)**

Üropatojenik *E. coli* suşları, bazı hayvanlar (kedi, köpek vb.) ve insanlarda üriner sistem enfeksiyonlarına sebep olurlar. Enfeksiyon köpeklerde daha yaygın olmakla birlikte çoğunlukla sistit, uretrit, piyelonefrit ve prostatit olarak görülmektedir (Vanessa ve Carlyn, 2015). Üropatojenik *E. coli* suşları, PAI-I (70 kb) ve PAI-II (190 kb) olmak üzere iki patojenite adası içermektedirler (Omerovic vd., 2017). Üropatojenik *E. coli* suşlarında, enfeksiyon patogeneğinde rol oynayan çeşitli adezinler (fimbrialar), hemolizin, aerobaktin ve sitotoksik nekrotizan faktör 1 (CNF-1) gibi bir dizi virülans faktörü bulunmaktadır (Scheutz ve Strockbine, 2015).

### **1. 3. 2. 4. Avian Patojenik *E. coli* (APEC)**

Avian Patojenik *E. coli* suşları kanatlılarda çeşitli ekstraintestinal enfeksiyonlara (koli septisemi, kolibasillozis, poliserozit, ovaritis, yumurta kesesi yangısı, artrit, sinovitis vb.) neden olmaktadır. Broyler ırkı tavuklarda görülen selülit ile ilişkili lezyonlar karkas kalitesinde bozulmaya neden olarak ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Avian Patojenik *E. coli* suşları, sağlıklı kanatlıların bağırsak florasında bulunmaktadır. APEC suşlarında tanımlanan virülans faktörleri; adezinler (F1, P ve kıvrık fimbrialar), aerobaktin demir kazanım sistemi, K1 kapsülü, sıcaklığa duyarlı hemaglutinin, serum direnci ve çeşitli toksinlerdir (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999; Omerovic vd., 2017).

### **1. 3. 2. 5. Diğer Potansiyel *E. coli* Patotipleri**

Potansiyel patojenler arasında yer alan ilk patotip, adherent-invazif *E. coli* (AIEC) olarak bilinen ve Crohn Hastalığı ile ilişkili olan *E. coli* suşlarıdır. Ancak, AIEC suşları için henüz tek bir genetik sekans tanımlanmamıştır (Kaper vd., 2004). Son yıllarda, ExPEC iki yeni hayvansal orijinli patotip daha eklenmiştir. Bunlar;

hayvanlarda uterus enfeksiyona neden olan endometriyal patojenik *E. coli* ve mastitis nedeni olan meme patojenik *E. coli*' dir (Omerovic vd., 2017).

#### **1. 4. Virülans Faktörleri**

*E. coli*'nin patojenitesi, suşların patotipine göre değişkenlik gösteren ve çeşitli virülans faktörlerini içeren geniş bir mekanizmaya sahiptir. Patojen *E. coli* suşlarının, canlılarda yol açtıkları enfeksiyon tipi ve konak türü spesifik olup, enfeksiyonların patogenezinde bu suşların virülans faktörleri önemli yer tutmaktadır (China ve Goffaux, 1999; Omerovic vd., 2017). *E. coli* virülans faktörleri, bakteri genomu ya da plazmitlerde yer alan çeşitli genler tarafından kodlanmaktadır. Patojen *E. coli* suşlarının kommensal suşlardan ayırt edilmesi çeşitli virülans faktörlerinin saptanmasıyla olmaktadır. Virülans faktörler, patojen *E. coli* suşlarının konağı enfekte etmesinde, kolonizasyonunda ve konağın immun sistemi ile mücadele etmesinde önemli rol oynamaktadır (Kaper vd., 2004). Özellikle ekstraintestinal enfeksiyonların oluşmasında, mukozaya tutunma, bağırsak duvarını geçme, komplementlere direnç gösterip fagositozdan kaçabilme ve canlı kalarak çoğalma yeteneğini sürdürmede virülans faktörleri önemli yer tutmaktadır. Bununla birlikte, virülans faktörlerinin sentezlenmesi sürekli değildir ve bakteriler, sadece çevreden veya konaktan çeşitli sinyalleri aldıkları zaman virülans faktörü sentezlerler (Harel ve Martin, 1999; Lupindu, 2017). *E. coli* suşlarının sahip oldukları virülans faktörleri; toksinler, adezinler, konak hücre odaklı proteinler, aerobaktin sideroforları, komplement direnci ve polisakkarit kapsül şeklinde sınıflandırılmaktadır (Omerovic vd., 2017).

##### **1. 4. 1. Adezinler**

Fimbrialar, bakteri hücrelerinin yüzeyinde bulunan ve konak hücreye tutunmayı sağlayan yapılardır. Fimbrianın distalinde bulunan ve adezin olarak isimlendirilen protein yapı, konak hücrenin reseptörlerine tutunarak adezyon işlemini gerçekleştirmektedir. Adezinler, fimbria üzerinde lokalize olabildiği gibi, direkt mikroorganizma üzerine lokalize olan afimbrial adezinler de tanımlanmıştır (Moxley, 2013). *E. coli* suşlarında bulunan önemli fimbriaları; Tip I (F1) Fimbria, Tip II Fimbria, Bundle-Forming Pilus (bfp), Afimbrial adezinler (AFA), İntimin, şeklinde sıralayabiliriz (Scheutz ve Strockbine, 2015).

#### **1. 4. 2. Aerobaktin sideroforları**

*E. coli*'nin konak hücrelerde üremesi için gerekli olan önemli esansiyel faktörler arasında demir yer almaktadır (Erdem, 1999). Sideroforlar, bir demir ayırma ve transport sistemidir. Konak doku ve mukozalarında serbest demir (Fe) miktarı az olduğu için, *E. coli*, kendi yapısında mevcut olan sideroforlar aracılığıyla, transferrin veya laktoferrin gibi moleküllerden serbest demiri elde etmektedir (İzgür, 2006). Aerobaktin sideroforları, plasmid tarafından kodlanır ve EIEC, APEC patotiplerinde bulunurlar (Omerovic vd., 2017).

#### **1. 4. 3. Serum Direnci**

Serumun bakterisidal etkisine karşı, *E. coli*'lerin gösterdikleri dirençtir. Serum direncinden bakteri yüzeyinde bulunan K1 kapsülü veya dış membran proteinleri (OmpA, TraT ve iss proteinleri) sorumludur. Komplement komponentleri ve membran atak kompleksine karşı savunmada önemli rol oynayarak, bakterisidal etkiyi önlemektedir (Kaper vd., 2004; Moxley, 2013).

#### **1. 4. 4. Kolisin Aktivitesi**

*E. coli* suşları, kolisin olarak adlandırılan çeşitli bakteriyosinleri üretmektedir. A'dan V'ye kadar sıralanan yirmiden fazla kolisin tipi bulunmaktadır. Kolisinler, plazmitte (Col plazmiti) bulunan çeşitli genler tarafından kodlanır ve kolisin üretmeyen *E. coli* suşları ile diğer bazı bakteri türleri üzerinde bakterisidal etkiye sahiptir (Omerovic vd., 2017). Kolisinler bakteriyel hücre lezyon oluşumunu sağlayan ve bakteriyi kendi kolisinlerine karşı koruyan iki alt birimden oluşmaktadır. Kolisinlerin etki mekanizması; DNA/RNA hasarı, glikojen sentezinin inhibisyonu ve aktif transportun engellenmesi şeklinde sıralanabilir (Cascales vd.,2007).

#### **1. 4. 5. Toksinler**

##### **1. 4. 5. 1. Termolabil Enterotoksin**

Labil Toksin (LT), yaklaşık olarak 86000 dalton molekül ağırlığında, 60°C'de, 30 dakikada inaktive olmaktadır. Bu toksin, yapı, fonksiyon ve antijenik karakter bakımından kolera toksinine benzerlik göstermektedir (Moxley, 2013; Omerovic vd., 2017). Labil toksin, LT-I ve LT-II olarak sınıflandırılan ve aralarında immünolojik çapraz reaksiyon olmayan 2 ana gruba ayrılmaktadır. LT-1 plazmit, LT-2 ise

kromozom tarafından kodlanmaktadır. LT-I hem insan hem de hayvan enfeksiyonları ile ilişkilendirilmesine rağmen, LT-II'nin enfeksiyonlarla çok özel bir ilişkisi yoktur ve LT-II özellikle hayvansal orijinli *E. coli* suşları tarafından salgılanmaktadır (Scheutz ve Strockbine, 2015).

#### **1. 4. 5. 2. Termostabil Enterotoksin**

Stabil Toksin (ST), düşük molekül ağırlığına sahip ve immünolojik özellik göstermeyen bir toksin olup, 100°C'de, 15 dakikada inaktive olmaktadır. Bu toksin, bağırsak epitelindeki guanil siklazı aktive edip, siklik guanozin monofosfat (cGMP) birikimine yol açarak intestinal sekresyon ile ishal meydana getirmektedir (Erdem, 1999; Moxley, 2013). Stabil toksin, ST-I ve ST-II olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. ST-I toksini, ETEC suşları ve diğer Gram negatif bakteriler (*Yersinia enterocolitica*, *non-O1 Vibrio cholerae* gibi) tarafından salgılanmaktadır. ST-I grubu da iki alt gruba ayrılmaktadır. Bu alt gruplar; domuzdan izole edilen ST-Ia (STp) ve insanlardan izole edilen STIb (STh)'dir. ST-II toksini, çoğunlukla domuz orijinli ETEC suşları tarafından üretilir ve bağırsak epitelinde histolojik hasara neden olmaktadır (Omerovic vd., 2017).

#### **1. 4. 5. 3. Endotoksin**

Endotoksin veya lipopolisakkarit, tüm *E. coli* suşlarında bulunmakta patojenitede de önemli rol oynamaktadır (Mainil, 2013). Lipid A toksijeniteden sorumlu ve polisakkarit ünite antijeniteden sorumludur (Burvenich, Van Merris, Mehrzad, Diez-Fraile ve Duchateau, 2003). Endotoksinler, konakta çeşitli hasarlara neden olan önemli virülans faktörlerindedir. Bu toksinler, bakteri hücrelerinin bütünlüğü bozulduğunda açığa çıkmakta ve inflamatuvar yanıtı neden olmaktadır. Konak immun sistemini ve pıhtılaşma sistemini etkileyerek, canlılarda şiddetli toksik reaksiyonlara yol açmaktadır. Vücutta ateş, septik şok, lökopeni, kan pıhtılaşması ve hemorajiye neden olmaktadır (İzgür, 2006; Moxley, 2013).

#### **1. 4. 5. 4. Nörotoksin**

Nörotoksinler lipoprotein yapısında ve ısıya duyarlı toksinlerdir. Bu toksinler; genellikle çeşitli *E. coli* serotipleri (O139:K82 gibi) ve hemolitik *E. coli* suşları tarafından üretilmektedir. Ayrıca, domuzlarda enterotoksemiye ve farelerde merkezi sinir sistemi bozukluklarına yol açmaktadır (İzgür, 2006).

#### 1. 4. 5. 5. Sitotoksik Nekrotizan Faktör

Bazı patojenik *E. coli* suşları, hücrelerde nekroza yol açan, sitotoksik nekrotizan faktör üretmektedir. Sitotoksik Nekrotizan Faktör (CNF), 110-115 kDa molekül ağırlıklı bir monomerik proteindir. CNF1 üreten *E. coli* suşları, genellikle ekstraintestinal enfeksiyonlardan (insanlarda meningitis ve sepsis; boğalarda sepsis, kedi ve köpeklerde üriner sistem enfeksiyonları) izole edilmiştir. Bu toksin, UPEC patotiplerinin en önemli virülans faktörlerinden biridir. CNF1 toksin üretimi, üriner sistem enfeksiyonunu tetiklemekle birlikte, konak hücre yapısında bozukluklara ve hücre lizisine yol açmaktadır. CNF2 üreten *E. coli* suşları ise, kuzu ve buzağılarda sepsis ve enteritlere neden olmaktadır (Moxley, 2013; Omerovic vd., 2017).

#### 1. 4. 5. 6. Hemolizin

Hemolitik *E. coli* suşları tarafından salgılanan sitolitik protein yapıları toksin,  $\alpha$ -hemolizin (hlyA), enterohemolizin (Ehly) ve silotizin A (clyA) olmak üzere üç toksin üretmektedir. hlyA, tip I sekresyon sistemi tarafından salgılanan, protein yapıları bir ekzotoksin olup, kromozom tarafından kodlanmaktadır (Kaper vd., 2004; Moxley, 2013). HlyA, genellikle ekstraintestinal *E. coli* suşları tarafından üretilerek eritrositlerin ve lenfositlerin lizisine neden olmaktadır. Lizis sonucunda ortaya çıkan demir, bakterilerde siderofor sisteminde kullanılmaktadır (Scheutz ve Strockbine, 2015). Enterohemolizin, Repeats-in-toxin toksindir ve birçok STEC patotipi tarafından üretilmektedir. (Moxley, 2013; Omerovic vd., 2017). Sitolizin A, 34 kDa molekül ağırlığında hemolitik özellik gösteren proteindir. Sitolizin A, tüm *E. coli* suşlarında bulunmaktadır. Bu protein, memeli hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterir ve makrofaj apoptozuna neden olmaktadır (Ludwig, von Rhein, Bauer, Hüttinger ve Goebel, 2004).

#### 1. 4. 5. 7. Shiga / Vero Toksin (*Stx* / *VT*)

Shiga toksin üreten *E. coli* ilk kez 1977'de keşfedilmiştir. Sitotoksik etki gösteren toksin insan ve hayvanlarda hastalık oluşturur. Bu toksinler, *Shigella spp.*'lerin ürettiği Shigatoksine çok benzer ve Shiga benzeri (Shiga like) toksin olarak adlandırılmaktadır. Verotoksin ya da verositotoksin olarak da bilinen toksinler ishal, HK ve HÜS'a neden olmaktadır (Erdem, 1999; Melton-Celsa, 2014).

## 1. 5. STEC GENEL ÖZELLİKLERİ

Shiga toksin üreten *E. coli*, sanayileşmiş ülkelerde ciddi gastrointestinal hastalıkların başlıca nedenidir (Kaper ve O'Brien, 2014). Bakteriler genellikle az pişmiş et, özellikle sığır eti ürünleri, çapraz kontamine çiğ sebzeler, filizler ve tohumlar gibi kontamine yiyeceklerin yenmesi yoluyla bulaşır (Caprioli vd., 2014).

Shiga toksin üreten *E. coli*'n en önemli virülans faktörü, risin (bitkisel bir toksin) ile benzer etkinlikteki toksindir. *Stx1* ve *Stx2* olmak üzere benzer özellikleri olan fakat farklı antijenik yapıda alt tipi tanımlanmıştır (Strockbine, Jackson, Sung, Holmes ve O'Brien 1988). Bu toksinler konak hücrelerinde protein sentezinin inhibisyonundan sorumludur (Balière, Rincé, Delannoy, Fach ve Gourmelon, 2016). *Stx1*; *Stx1a*, *Stx1c*, *Stx1d* olmak üzere 4 alt tipe, *Stx2* ise *Stx2a*, *Stx2b*, *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e*, *Stx2f*, *Stx2g*, *Stx2h*, *Stx2i*, *Stx2j*, *Stx2k* ve *Stx2l* 'yi içeren 12 *Stx* alt tipine ayrılmıştır (Koutsoumanis vd., 2020). Özellikle *Stx1a* olmak üzere *Stx1c* ve *Stx1d* alt tipleriyle HÜS arasında önemli bir ilişki tanımlanmaktadır (Skinner, Patfield, Stanker, Fratamico ve He, 2014). Shiga toksin üreten *E. coli* suşlarından *Stx2a*, *Stx2c* ve *Stx2d* tipleri daha sık HK ve HÜS ile ilişkilendirilmektedir (Melton-Celsa, 2014).

## 1. 6. STEC'in Virülans Faktörleri

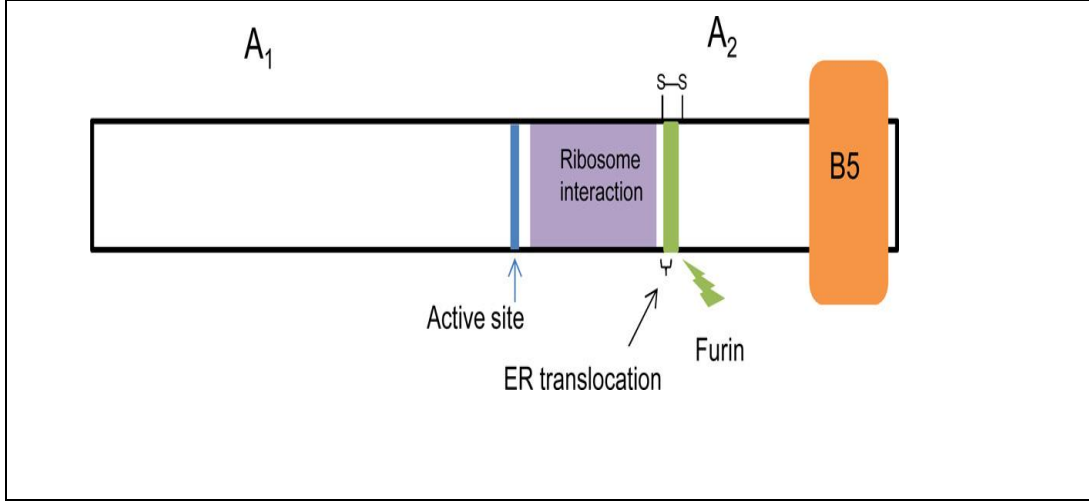
### 1. 6. 1. Shiga Toksin (*Stx*)

Shiga toksin; 19. yüzyılda *S. dysenteriae*'nin neden olduğu dizanteriyi ilk tespit eden Kiyoshi Shiga'nın ismiyle adlandırılmıştır. Fakat 80 yıl sonra shiga toksini *E. coli* suşları tarafından da sentezlendiği tespit edilmiştir. Shiga toksin ise benzer etkiye sahip fakat antijenik açıdan farklı olan *Stx1* ve *Stx2* ayrıldığı bulunmuştur. Ökaryotik hücrelerde protein sentezini inhibe edebilen ve yaklaşık 70 kDa ağırlığında proteinlerdir. 60S ribozomun 28S rRNA biriminden adenini çıkartarak protein sentezini inhibe etmektedir. *Stx* bir AB5 protein toksinidir. A alt ünitesi enzimatik aktif kısmı olup, B alt ünitesi reseptöre tutunmaktadır. Toksinin N-glikozidaz aktivitesi A alt ünitesi tarafından gerçekleştirilirken, B alt ünitesi ise toksinin globotriaosylceramide (Gb3) reseptörlerine bağlanmasında görev almaktadır (Melton-Celsa, 2014). Gb3 reseptörü yoğun olarak böbrek glomerüllerinde, proximal tübülde, beyin, karaciğer ve pankreasta bulunmaktadır. Toksin primer olarak böbreği etkilemektedir. Ayrıca, yapılan son çalışmalarda bağırsak epitelinde *Stx*'lerin

bağlanmasını sağlayan Gb4 ve daha az sayıda Gb3 reseptörü bulunduğu bildirmiştir. (Zumbrun vd., 2010; Etcheverría ve Padola, 2013; Pakbin, Akhondzadeh Basti, Khanjari, Azimi ve Karimi, 2020). *Stx1* ve *Stx2* kromozoma yerleşmiş lambdoid fajlardır. Fajlar; faj gen promotorlarının aktivitesini, gen kopya sayılarının amplifikasyonu ile *Stx* üretimini ve *Stx* salınımını düzenlemektedir. Bu genler doğrudan kalıtımla aktarılabildiği gibi, faj yoluyla horizontal olarak da aktarılabilmektedir (Smith ve Huggins, 1983) *Stx1*, *S. dysenteriae* toksiniyle tek bir amino asitle farklılığı ile ayrılmaktadır (Strockbine vd., 1988). Shiga toksin üreten *E. coli* suşları *Stx1* ve/veya *Stx2* genlerine sahip olabilir ve bu genler kendi içerisinde çeşitli alt tiplere ayrılmaktadır. *Stx1*'in alt tipleri *Stx1a*, *Stx1c*, *Stx1d* ve *Stx1e* iken, *Stx2*'nin alt tipleri *Stx2a*, *Stx2b*, *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e*, *Stx2f*, *Stx2g*, *Stx2h*, *Stx2i*, *Stx2j*, *Stx2k* ve *Stx2l*'dir. (Koutsoumanis vd., 2020). *Stx2*'nin *Stx1*'e göre daha ağır klinik semptomlara neden olduğu bilinmektedir. *Stx2a*, *Stx2c* ve *Stx2d* HÜS gibi ağır klinik durumlarla ilişkili iken, *Stx1* varyantları, *Stx2b* ve *Stx2e* ishal ve benzeri hafif klinik durumlar veya fekal taşıyıcılıkla ilişkilidir (Fuller, Pellino, Flagler, Strasser ve Weiss, 2011).

### **1. 6. 1. 1. Shiga Toksin (*Stx*) Yapısı**

Bilinen en güçlü bakteriyel toksinlerden bir olan *Stx*, temel olarak alt birim A ve 5 özdeş B alt birimi olmak üzere 2 ana alt birimden oluşmaktadır. Shiga toksinin A alt birimi ökaryotik hücre ribozomuna zarar verip hedef hücrenin protein sentezini durdurmaktadır. B pentamerik alt birimi, endotelial hücrelerde bulunan hücresel reseptör Gb3 bağlanmaktadır (Melton-Celsa, 2014). Resim 1.1'de görüldüğü gibi A alt birim ünitesi birbirine disülfid bağı ile bağlı A1 alt ünitesi ve A2 alt ünitesinden oluşur. A1 toksinin enzimatik aktivitesinden sorumlu iken A2 alt ünitesi, A1 alt ünitesini B alt birimine bağlamaktadır (Fraser vd., 2004). B alt birimi toksinin Gb3 yüzeyinden eksprese eden hedef hücreleri bağlanmasını sağlamaktadır (Stein, Boodhoo, Tyrrell, Brunton ve Read, 1992).



**Resim 1. 1.** Stx yapısı: Glutamik asit (mavi), ribozom etkileşim bölgesi (mor), proteaza (furin) duyarlı bölge (yeşil) ve B pentameri (turuncu) bir blok olarak gösterilmektedir. A1 alt birimini ve A2 alt birimini bağlayan disülfid köprüsü, proteaza duyarlı bölgenin üzerinde gösterilmektedir. ER'den sitozole translokasyon için önemli olan bir bölge, bir parantez ile gösterilmektedir (Melton-Celsa, 2014).

### 1. 6. 1. 2. Shiga Toksin (*Stx*) Reseptörleri

Dokulardaki *Stx* reseptörlerinin varlığı hücre çeşidine göre farklılık göstermektedir. Bir dokuda *Stx* reseptörlerinin fazla olması *Stx*'in aktivitesini artırmaktadır. Shiga toksin reseptörlerinin hücrelerdeki farklı dağılımı hastalık patogenezinde ve seyrinde önemlidir (Lingwood, 1996). Shiga toksinin ilk hedefi endotelial hücrelerdir. (Paton ve Paton, 1998). Shiga toksin reseptörlerinin fazla miktarda bulunduğu intestinal ve renal epitelyum hücreleri toksin hasarından daha fazla etkilenmektedir (Weinstein, Jackson, Perera, Holmes ve O'Brien, 1989; Obrig, 2010). Shiga toksin tanımlayan reseptörler olarak Gb3, Gb4 ve P1 membran glikolipid tespit edilmiştir (Jacewicz, Clausen, Nudelman, Donohue-Rolfe ve Keusch, 1986; Lindberg vd., 1987; Lingwood vd., 1987; Bitzan vd., 1994). Gb3, birçok memelideki *Stx*'lerin fonksiyonel reseptörü olarak kabul edilmiş ve intestinal ve renal epitelyal hücrelerinde yüksek düzeyde bulunmaktadır (Boyd ve Lingwood, 1989).

### 1. 6. 1. 3. Shiga Toksin (*Stx*) Patogenezi

Shiga toksin üreten *E. coli* etkenleri ruminantlar ile direkt temasla ya da enfekte hayvanların dışkılarıyla kontamine gıdalarla alınmaktadır (Doyle, Archer, Kaspar ve Weiss, 2006). Shiga toksin üreten *E. coli* enfeksiyonlarında doz oldukça düşük olup ortalama 100 bakteri yeterli olmaktadır (Gyles, 2007). Midenin düşük pH'sına dayanıklı olan STEC'ler kolona ulaşıp mikrovillüslara bağlanarak mikrokoloniler



oluştururlar (Elliott vd., 2000). Shiga toksin üreten *E. coli*'lerin patojenitesinin temelinde LEE-1'den LEE-5'e kadar 5 kümeye bölünmüş LEE isimli patojenite adası bulunmaktadır. LEE 1, 2 ve 3 bölgelerinde bakteriyel proteinlerin enterosit içine girişini sağlayan Tip 3 sekresyon sistemini kodlanırken, LEE-4 bölgesinde EspADB gibi tutunma ile ilgili, LEE-5 bölgesinde ise *eae* gibi yapışma/bağlanma ile ilgili gen bölgeleri kodlanmaktadır. Toksinin enterositlere bağlanması ile enterositlerin yüzeyindeki mikrovillusler histopatolojik değişiklikler meydana gelir (Elliott vd., 2000). Enterositlerde Tip 3 sekresyon sisteminin devreye girmesiyle bakteri ve konak hücre arasında bir köprü oluşur ve birçok sitotoksik protein enterosite geçer. İntimin ve translocated intimin receptor arasındaki kalıcı bağlanma hücre iskeletinde değişikliklere neden olmaktadır (Cornick, Booher ve Moon, 2002). LEE açısından negatif olan STEC suşları ise bağlanmada *saa* geni ile kodlanan adezyon proteinini kullanmaktadır (Paton, Srimanote, Woodrow ve Paton, 2001). Shiga toksin üreten *E. coli*'lerin enterositlere bağlanmasıyla birlikte *Stx1* ve/veya *Stx2* salınımı başlar. Toksinin B ünitesi Gb3 reseptörlerine bağlanırken, A ünitesi protein sentezini inhibe eder (Karmali, Gannon ve Sargeant, 2010; Castro, Carvalho, Conte-Junior ve Figueiredo, 2017). Kanda serbest halde bulunmayan *Stx* nötrofillere bağlı olarak böbrek, merkezi sinir sistemi gibi organlara ulaşmaktadır. Shiga toksinin enterositlerden kana geçişinde birkaç olası yol tespit edilmiştir. Bunlar; enfeksiyonun indüklediği Gb3 bağımsız transitoz, nötrofil transmigrasyonu sırasında paraselüler transport, enfeksiyonun Gb3 reseptör oluşumunu indüklemesiyle retrograd transport, hücre ölümü ile *Stx* salınımı, Paneth hücrelerinden Gb3 bağımlı translokasyon ve M hücreleriyle transitozdur (Schüller, 2011).

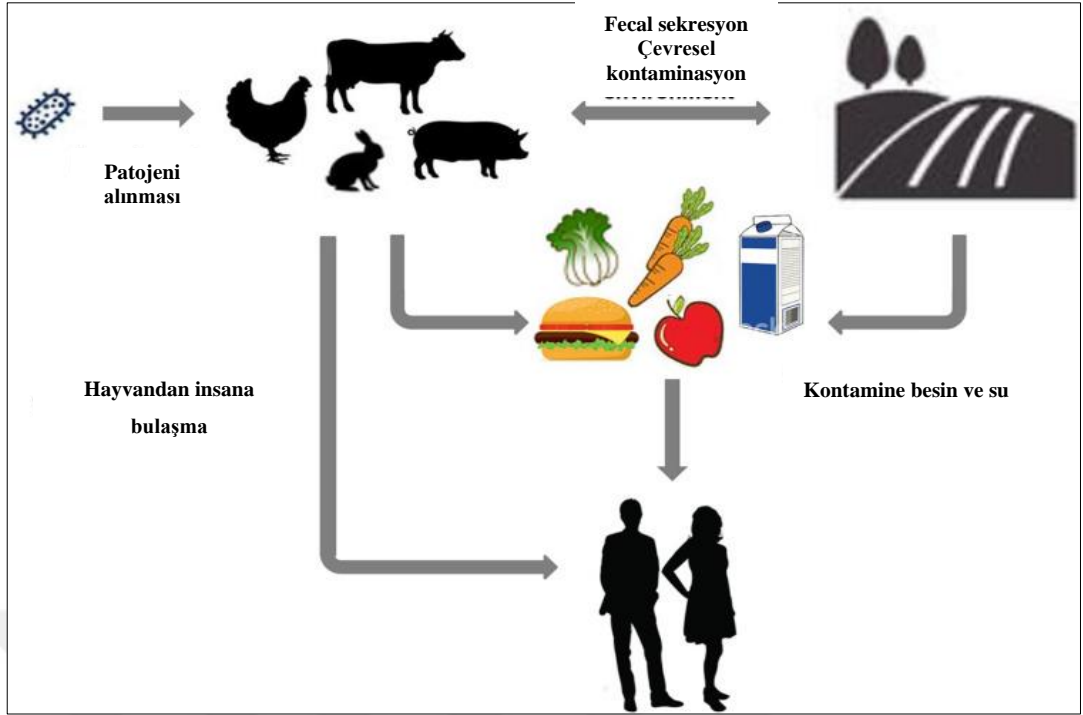
Toksinin oluşturduğu endotel hasarı hücrede şişmeye ve trombüs oluşumuna, bazal membran hasarına ve kapiller kan akımında azalmaya neden olmaktadır. Gb3 reseptörü bulunan böbrek glomerülleri ve merkezi sinir sistemi bu durumdan etkilenmektedir (Schüller, 2011). Shiga toksin ile endotel hasarı sonucu birçok sitokin salınmasıyla, koagülasyon ve trombositopeni görülür ve bunun sonucunda kapillerlerde tromboz ve sistemik bulgular oluşmaktadır. Kapillerden geçen eritrositlerin parçalanmasıyla hemolitik anemi tablosu oluşmaktadır. Böbrek hasarı ile proteinüri oluşmaktadır. Hem glomerüllerde hem tubüllerdeki hücre hasarı sonucu böbrek yetmezliği oluşmaktadır. Sonuç olarak anemi, trombositopeni ve böbrek yetmezliği ile karakterize HÜS meydana gelir (Obrig ve Karpman, 2012)

#### **1. 6. 1. 4. İnsanlardaki STEC Enfeksiyonlarında Hastalık Tablosu**

Shiga toksin üreten *E. coli* suşları dünya çapında gıda kaynaklı önemli bir halk sağlığı tehdidi olarak tanımlanmıştır (Newell vd., 2018). Shiga toksin üreten *E. coli* enfeksiyonlarının temel bulaşma yolu az pişmiş etlerin tüketilmesidir. Shiga toksin üreten *E. coli* taşıyan hayvanların direkt dışkısıyla kontamine olan gıdaların ya da çapraz kontamine gıdaların tüketilmesi insanlarda enfeksiyona neden olmaktadır. Enfeksiyonlar çoğunlukla sporadik vakalar halinde görülse de Stx'e bağlı salgınlarda görülmektedir. Enfeksiyonun inkübasyon süresi, genel olarak 3-4 gün arasında olmakla birlikte bazı durumlarda 1-8 gün arasında değişmektedir (Erol, 2007). Hemorajik kolit, ilk belirtilerin abdominal ağrı ve diyare olduğu devamında yüksek ateşin olmadığı bağırsak kanamasını andıran hemorajinin de katıldığı bir hastalık tablosudur (Karmali, 1989). Shiga toksin üreten *E. coli* enfeksiyonu sonucu gelişen HÜS; trombositopeni, akut böbrek hasarı ve mikroanjyopatik hemolitik anemi ile karakterizedir. Beş yaşından küçük çocuklar hastalığa duyaralı olmakla birlikte çocuklarda HÜS vakalarının %85-90'ı STEC ilişkilidir (Mody vd., 2015).

#### **1. 6. 1. 5. STEC Epidemiyolojisi**

Shiga toksin üreten *E. coli* 1980'lerde gıda kaynaklı küresel bir halk sağlığı sorunu olarak ortaya çıkmıştır (Castro vd., 2017). Shiga toksin üreten *E. coli* enfeksiyonları basit ishalden HK, HÜS ve hastalığın ilerleyen dönemlerinde böbrek yetmezliği ve ölüme kadar varabilen ciddi hastalık tablosu oluşturması sebebiyle gıda kaynaklı enfeksiyonlar arasında önem taşımaktadır (Gould vd., 2009). Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre STEC enfeksiyonlarının yıllık insidansı 2,8 milyondur. (Majowicz vd., 2014). Shiga toksin üreten *E. coli* enfeksiyonu her yaş grubunda görülebilmektedir. Enfeksiyonların üçte biri 20-59 yaş arası yetişkinlerde görülürken, büyük kısmı 5 yaşından küçük çocuklar ve 60 yaş üzerindeki bireylerde görülmektedir (Tarr, Oltean, Phipps, Rabinowitz ve Tarr, 2018). Ruminantlar STEC'in primer rezervuarıdır ve dışkı ile bakteriyi çevreye yayabilmektedir (Doyle ve Padhye, 1989; Gyles, 2007). Bakteriler genellikle az pişmiş et ve çapraz kontamine yiyeceklerin yenmesi yoluyla bulaşır (Caprioli vd., 2014). Resim 1.2'de de görüldüğü gibi STEC direkt ya da indirekt yollarla hayvanlardan insanlara bulaşmaktadır (Hwang, vd., 2021). Shiga toksin üreten *E. coli*, sanayileşmiş ülkelerde ciddi gastrointestinal hastalıkların başlıca nedenidir (Kaper ve O'Brien, 2014).



**Resim 1.2.** Shiga toksini üreten *E. coli* enfeksiyonunun bulaşmasının şematik gösterimi (Hwang, vd., 2021).

#### 1. 6. 1. 6. Ruminantlarda STEC

Shiga toksin üreten *E. coli* suşları özellikle sığır ve koyun gibi ruminantların intestinal sistemin florasında doğal olarak bulunur (Beutin, Geier, Steinrück, Zimmermann ve Scheutz, 1993; Kudva vd., 1996; Beutin vd., 1997; Kudva vd., 1997). İnsan enfeksiyonlarının temel kaynağını ruminantların dışkıları ile kontamine gıdalar oluşturmaktadır (Doyle ve Padhye, 1989). Mezbahalarda dışkı ve bağırsak içerikleri ile kontamine olan etlerin iyi pişirilmeden tüketilmesiyle insanlarda hastalıklar oluşmaktadır (Brooks vd., 2001).

#### 1. 6. 1. 7. *Stx1* ve *Stx2*'nin alt tipleri

Shiga toksinin *Stx1* ve *Stx2* olmak üzere benzer özellikleri olan fakat farklı antijenik yapıda iki alt tipi tanımlanmaktadır (Strockbine vd., 1988). Bu toksinler konak hücrelerinde protein sentezinin inhibisyonundan sorumludur (Baliër vd., 2016). *Stx1*'in alt tipleri *Stx1a*, *Stx1c*, *Stx1d* ve *Stx1e* iken, *Stx2*'nin alt tipleri *Stx2a*, *Stx2b*, *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e*, *Stx2f*, *Stx2g*, *Stx2h*, *Stx2i*, *Stx2j*, *Stx2k* ve *Stx2l*'dir. (Capps vd., 2021).

### **1.6. 2. İntimin (*eae*)**

Shiga toksin üreten *E. coli* suşları LEE olarak adlandırılan patojenite adasına sahiptir (Garmendia, Frankel ve Crepin, 2005). Locus of enterocyte effacement, konak hücreye efektör molekülleri ileten ve konak hücrenin iskelet yapısını bozan Tip III salgılama sistemini kodlar ve bu sistemle bağırsak mukozasının hasarına neden olarak hastalık sürecine katkıda bulunur. Locus of enterocyte effacement ayrıca epitelyal hücrelere bağlanmayı sağlayan intimin (*eae*) proteinini kodlar. İntimin, LEE pozitif STEC suşlarında diagnostik bir marker olarak kullanılan önemli bir virülans faktörüdür ve bağırsak epiteline adezyonda görev almaktadır (Elliott vd., 1998). İntimin, tir reseptörleri aracılığı ile bakterinin konak epitelyumuna adezyonunu sağlar. Tir protein, konak hücre sitoplazmasında bulunan N- ve C-terminal alanlarını kullanarak konak hücre iskeleti ve sinyal bileşenleri ile etkileşime girebilir (Torres, Zhou ve Kaper, 2005). HÜS, HK gibi durumlar ile intimin varlığı ilişkilidir (Blanco vd., 2004).

### **1.6. 3. Enterohemolizin (*ehxA*, *e-hlyA*)**

Büyük bir virülans plazmiti üzerinde yer alan ve yaklaşık 3000 baz çiftine sahip enterohemolizin (*ehxA*) geninin, HÜS ve ciddi ishallerle ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Cookson, Bennett, Thomson-Carter ve Attwood, 2007). Enterohemolizin varlığı, STEC suşlarının hızlı karakterizasyonu için epidemiyolojik bir belirteç olarak önerilmektedir (Beutin, vd.,1989). Yapılan birçok çalışmada *e-hlyA*'nın direkt bir hemolizin salgılamayıp, bakteri hücrelerinin erimesine sebep olarak sessiz bir hemolizin salınımına neden olduğu bildirilmiştir. Cytolysin-A olarak bilinen bu sessiz hemolizin eritrositlerde por oluşturur (Oscarsson, Westermarck, Beutin ve Uhlin, 2002). Bu toksin *E. coli* O157:H7 ve EPEC suşlarında tespit edilmiştir (Karmali, Steele, Petric ve Lim, 1983).

### **1. 6. 4. STEC Agglutine Edici Adezyon Proteini (Saa)**

Bazı STEC suşların dış membranında bulunmakta olup otoagglutinasyon adezin özelliği taşımaktadırlar. LEE negatif STEC suşlarda Saa varlığı bilinmektedir (Paton vd., 2001). LEE negatif STEC suşların insanlarda enfeksiyona neden olmasında Saa adezini muhtemel belirleyici bir faktördür (Paton vd., 2001).

### **1. 6. 5. Cytolethal Distending Toksin-V (CDT- V)**

Cytolethal distending toxin; hücre bölünmesinin G2 fazını geri dönüşümsüz olarak bloke ederek ve *eae* geni olmayan suşlarda endotel hasarına neden olmaktadır (Pickett ve Whitehouse, 1999). Endotelde proliferasyonun inhibisyonuna ve hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir (Bielaszewska, Sinha, Kuczius ve Karch, 2005).

### **1. 6. 6. Katalaz Peroksidaz (KatP)**

Tüm STEC plazmitlerinde bulunmayan hem katalaz hem de peroksidaz aktivitesine sahip olan proteini, *KatP* gen bölgesi plazmit üzerinden kodlanmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar bakteriyi peroksidaz aracılı oksidatif hasardan koruyan *KatP* gen bölgesinin STEC O157:H7 suşlarının %66'sında ve non-O157 STEC suşlarının ise %38'inde *KatP* bulunduğunu göstermiştir (Brunner, Schmidt ve Karch, 1996).

### **1. 6. 7. Uzun Polar Fimbria (Lpf)**

Peyer plaklarına adezyonu sağlayan uzun polar fimbrialar ilk kez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium'da keşfedilmiştir (Bäumler ve Heffron, 1995). Shiga toksini üreten *E. coli* serotipleri, özellikle *E. coli* O157:H7, bağırsak kolonizasyonunda önemli katkıda bulunmaktadır (Lloyd, Ritchie ve Torres, 2012). Yapılan çalışmalarda Lpf proteininin bağırsak mukozasına adezyon ve kolonizasyonda rol aldığı bildirilmiştir (Ross, Rojas-Lopez, Cieza, McWilliams ve Torres, 2015).

### **1. 6. 8. Ekstraselüler Serin Proteaz (EspP)**

Plazmit üzerinden kodlanan EspP hem O157 hem de non-O157 STEC serotiplerinde bulunan tip-V sekresyonla insan koagülasyon faktörü V ve pepsin A'yı parçalayarak STEC'e bağlı kanlı ishale neden olduğu düşünülmektedir (Brunner, Schmidt ve Karch, 1997). Kanın pıhtılaşma reaksiyonlarının bozulmasına neden olan faktör V'nin parçalanması kanama süresinin uzamasına ve hemorajiye neden olmaktadır (Karch, Schmidt ve Brunner, 1998). EspP protein vero hücrelerine üzerinde sitotoksik etki göstermektedir (Djafari vd., 1997). Çocuk enfeksiyonlarında EspP toksinine karşı antikorların oluşması, in-vivo şartlarda protein ifadesini ve hastalığın patogenezdaki rolünü açıklamaktadır (Brunner vd., 1997).

### 1. 6. 9. Subtilaz Toksin (SubAB)

Subtilaz sitotoksin (SubAB), bazı STEC suşları tarafından salgılanır ve enzimatik olarak aktif alt birim SubA ve pentamerik bağlama alt birimi SubB'den oluşur (Sessler vd., 2021). Subtilaz toksin 35 kD ağırlığında ve plazmit üzerinde kodlanan bir AB5 toksindir. Shiga toksin üreten *E. coli* suşlarında nadir tespit edilen virulans faktörlerinden biridir. İnsanlardaki ciddi STEC enfeksiyonlarında izole edilmiş olup vasküler hasar, tromboz ve nekroz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Paton, Srimanote, Talbot, Wang ve Paton, 2004)



## **2. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **2. 1. MATERYAL**

#### **2. 1. 1. Örnekler**

Çalışmada Ankara ili ve çevresindeki işletmelerden 12 farklı koyun sürüsünden 272 adet koyundan alınan rektal sıvaplar materyal olarak kullanıldı. Rektal sıvap örnekleri; sıvap ile anüsten 3-5 cm içeri girilerek, dairesel hareketler ile rektal mukozaya sürülerek elde edildi. Sıvaplar Cary-Blair transport medium tüplerde soğuk ortamda kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı.

#### **2. 1. 2. Kullanılan Cihazlar**

- Isıtıcı blok
- Nano-Drop Spektrofotometre (Inovia, Türkiye)
- Thermal Cycler (BioRad T100 PCR)
- Elektroforez cihazı (BioRad, PowerPac, ABD)
- Quantum ST4 jel görüntüleme sistemi

#### **2. 1. 3. İzolasyon ve İdenfikasyonda Kullanılan Kimyasallar**

##### **2. 1. 3. 1. Mac Conkey Agar**

Selektif ve ayırıcı besiyeri olan MacConkey Agar (Conda/1052)'dan 50 gram tartılarak 1 litre distile suda kaynatılarak çözdürüldü. Otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 15 dakikada sterilize edildi. Çapı 90 mm olan petrilere dökülen agarın 37<sup>0</sup>C'de 24 saat sterilit kontrolü yapıldıktan sonra 4<sup>0</sup>C'de kullanılmak üzere saklandı.

##### **2. 1. 3. 2. Nutrient Broth**

İzole edilen bakterilerin pasaj ve -20<sup>0</sup>C'de saklanması amacıyla Nutrient Broth (Oxoid/CM0001) kullanıldı. Toz besiyerinden 13 gram tartılarak 1 litre distile suda çözdürülerek 121<sup>0</sup>C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Steril tüplerde 4<sup>0</sup>C'de kullanılmak üzere saklandı.

### **2. 1. 3. 3. Nutrient Agar**

Besiyerinden (MERCK/105450) 20 gram tartılarak 1 litre distile suda çözdürülerek 121<sup>0</sup>C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Petrilere dökülen besiyerlerinin 37<sup>0</sup>C'de 24 saat sterilite kontrolü yapılp besiyerleri 4<sup>0</sup>C'de kullanılmak üzere saklandı.

### **2. 1. 3. 4. Triple Sugar Iron Agar**

İdenfikasyon aşamasında kullanılmak üzere, 65 gram toz besiyeri (MERCK/1039150500) tartılarak 1 litre distile suda çözdürüldü. Hazırlanan çözelti vida kapaklı cam tüplere 4 er ml aktarılarak 121<sup>0</sup>C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Cam tüplere 45<sup>0</sup> eğim verilerek agarın katılaşması beklendi. Besiyerleri 4<sup>0</sup>C'de kullanılmak üzere saklandı.

### **2. 1. 3. 5. Urea Agar**

İdenfikasyon aşamasında kullanılmak üzere toz besiyerinden (Mast/DM228) 4,6 gram tartılarak 190 ml distile suda çözdürülerek 121<sup>0</sup> C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Sterilize agar 50<sup>0</sup>C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine 10 ml %40'lık üre solüsyonu eklendi. Kapaklı cam tüplere 4 er ml aktarıldı. Hazırlanan besiyerleri 4<sup>0</sup>C'de kullanılmak üzere saklandı.

### **2. 1. 3. 6. Oksidaz Ayıracı**

İdenfikasyonda bakterinin oksidaz aktivitelerinin belirlenebilmesi amacı ile kullanılan Oksidaz ayıracı (Sigma/G134-25G) %1'lik olacak şekilde hazırlandı.

### **2. 1. 3. 7. Kovaks İndol Ayıracı**

İdenfikasyonda bakterinin indol aktivitesini belirlemek amacıyla kullanıldı. Kullanıma hazır olarak temin edilen Kovaks İndol Ayıracı (MERCK/UN2920) buzdolabında saklandı.

### **2. 1. 3. 8. BBL Crystal Hızlı İdentifikasyon Kiti**

Konvansiyonel yöntemler ile identifikasyona tabi tutulan kolonilerden şüpheli olanları BBL Crystal (BD BBLCrystal) Hızlı İdentifikasyon kitinde 37<sup>0</sup>C'de 18-22 saat inkübasyona bırakılarak doğrulandı.



### **2. 1. 3. 9. Agaroz jel**

Elektroforez aşamasında kullanılmak üzere 2 gram toz agar (BioShop, AGA001, Canada) tartılarak üzerine 100 ml 1xTAE ilave edilerek %2'lik agaroz jel hazırlandı. Mikrodalga fırında homojenize edildi. Karışım jel kabına içerisinde kabarcık oluşturmayacak şekilde döküldü. Jel kalıbı içine yükleme kuyucuklarını oluşturan taraklar yerleştirilerek 15-20 dk oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel elektroforez tankında kullanıldı.

### **2. 1. 3. 10. Ethidium Bromide Solüsyonu**

Elektroforez işlemi bitmiş agaroz jellerin boyanmasında 100 ml 1xTAE içerisine 15 µl ethidium bromide solüsyonu (BioShop, ETB333, Canada) ilave edilerek kullanıldı.

### **2. 1. 3. 11. Tris Acetate EDTA Buffer**

Hazır 10x TAE Buffer (ThermoFisher, 15558042) 1x TAE olacak şekilde distile su ile sulandırılarak elektroforez ve agaroz jelin hazırlanmasında kullanıldı.

### **2. 1. 3. 12. Nuclease-Free Water**

Nuclease-Free Water (NEB, B1500S), primer sulandırılmasında ve PCR analizleri için kullanıldı.

### **2. 1. 3. 13. Marker**

Marker (Solis Bio Dyne 07-11-0000S / Ampliqon, A0610341) olarak 100 bp'lik DNA ladder kullanıldı.

### **2. 1. 3. 14. Master Mix**

Hazır Taq DNA 5x Master Mix (Solis Bio Dyne, 04-12-00S25) kullanıldı.

### **2. 1. 3. 15. Primerler**

Bu çalışmada kullanılan primerlerden *Stx1*, *Stx2*, *ae*, *ehxA* Paton'nın (2002) çalışması, *Stx1a*, *Stx1c*, *Stx1d* için Scheutz vd. (2012) çalışması ve *Stx1e* için ise Probert vd. (2014) çalışması referans alınmıştır. *Stx2a*, *Stx2b*, *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e*, *Stx2f*, *Stx2g* gen bölgeleri için Scheutz vd. (2012) çalışması, *Stx2h* için Bai vd. (2018) çalışması, *Stx2k* için ise Yang vd. (2020) çalışması referans alınmıştır (Çizelge 2.1.).

*Stx2i* için FN252457, *Stx2j* için MZ571121 ve *Stx2l* için ise AM904726 erişim numaraları kullanılarak NCBI PRIMER-BLAST programında primerler tasarlandı. Oligonucleotide Properties Calculator programı kullanılarak kendine eşleme oranları kontrol edildi. HPLC saflıkta sentezlenen hazır liyofilize primerler, temin edilen firmanın (Sentobiolab, Türkiye) sentez raporunda önerildiği şekilde 100 pmol/μl olacak şekilde Nuclease-Free Water ile sulandırıldıktan sonra dondurularak saklandı. PCR analizleri için primerler 10 pmol/μl'lik konsantrasyonlarda hazırlanarak kullanıldı.

**Çizelge 2.1.** Kullanılan Primerler

Gen	Sıra (5'-3')	Hedef gen (bp)	Referans	
<i>Stx1-F</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	<i>Stx1</i> (180)	Paton vd., 2002	
<i>Stx1-R</i>	AGAACGCCCACTGAGATCATC			
<i>Stx2-F</i>	GGCACTGTCTCTCTGAAACTGCTCC	<i>Stx2</i> (255)		
<i>Stx2-R</i>	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG			
<i>Eae-F</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC	<i>Eae</i> (384)		
<i>Eae-R</i>	CCACCTGCAGCAACAAGAGG			
<i>EhxA-F</i>	GCATCATCAAGCGTACGTTC	<i>EhxA</i> (534)		
<i>EhxA-R</i>	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT			
<i>Stx1a-F1</i>	CCTTTCCAGGTACAACAGCGTT	<i>Stx1a</i> (478)		Scheutz vd., 2012
<i>Stx1a-R2</i>	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG			
<i>Stx1c-F1</i>	CCTTTCCTGGTACAACAGCGTT	<i>Stx1c</i> (252)		
<i>Stx1c-R1</i>	CAAGTGTGTACGAAATCCCCTCTGA			
<i>Stx1d-F1</i>	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	<i>Stx1d</i> (203)		
<i>Stx1d-R2</i>	CTCTTCTCTGGTTCTAACCCATGATA			
<i>Stx1e-seq-F3</i>	TTTGTACGGTCCACAGCCGA	<i>Stx1e</i> (141)	Probert vd., 2014	
<i>Stx1e-seq-R3</i>	CTCAGCCTTCCCAGTTCAG			
<i>Stx2a-F2</i>	GCGATACTGRGBACTGTGCC	<i>Stx2a</i> (349)	Scheutz vd., 2012	
<i>Stx2a-R3</i>	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG			
<i>Stx2a-R2</i>	GCCACCTTCACTGTGAATGTG	(347)		
<i>Stx2b-F1</i>	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	<i>Stx2b</i> (251)		
<i>Stx2b-R1</i>	CAGCAAATCCTGAACCTGACG			
<i>Stx2c-F1</i>	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA	<i>Stx2c</i> (177)		
<i>Stx2c-R2</i>	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA			
<i>Stx2d-F1</i>	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	<i>Stx2d</i> (179)		Scheutz vd., 2012
<i>Stx2d-R1</i>	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG			
<i>Stx2d-O55-R</i>	TCAACCGAGCACTTGCAGTAG	(235)		
<i>Stx2d-R2</i>	GCCTGATGCACAGGTACTGGAC	(280)		
<i>Stx2e-F1</i>	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	<i>Stx2e</i> (411)	Scheutz vd., 2012	
<i>Stx2e-R2</i>	CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT			
<i>Stx2g-F1</i>	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	<i>Stx2g</i> (573)		
<i>Stx2g-R1</i>	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT			
<i>Stx2f-F1</i>	TGGGCGTCATTCACTGGTTG	<i>Stx2f</i> (424)		
<i>Stx2f-R1</i>	TAATGGCCGCCCTGTCTCC			
<i>Stx2h-F1</i>	AGATCTCATTCCTTTATATG	<i>Stx2h</i> (146)		Bai vd., 2018
<i>Stx2h-R1</i>	TCCCATTATATTTAGAG			
<i>Stx2j-F1</i>	GAGAGGATGGCGTCAGAGTG	<i>Stx2j</i> (97)		MZ571121
<i>Stx2j-R1</i>	GTCCCTGATGATGGCAGTT			
<i>Stx2k-F1</i>	GCGTTCTGTTCCGCGCT	<i>Stx2k</i> (387)	Yang vd., 2020	
<i>Stx2k-R1</i>	ACTGGACTTGATTGTGACT			
<i>Stx2l-F1</i>	TGGTGTCAAGTGGGGAGAA	<i>Stx2l</i> (92)	AM904726	
<i>Stx2l-R1</i>	GCGTCCCCTGATGATGACAA			
<i>Stx2i-F1</i>	TTTGTAAACCGTCACAGCCGA	<i>Stx2i</i> (187)	FN252457	
<i>Stx2i-R1</i>	TTCTCCCCTCTGACACCA			

## 2. 2. YÖNTEM

### 2. 2. 1. İzolasyon ve İdentifikasyon

#### 2. 2. 1. 1. İzolasyon

Cary-Blair transport mediumu içinde laboratuvara getirilen sıvıplar MacConkey agara ekildi ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. (Martins vd., 2015). Saf kültür elde etmek amacıyla inkübasyondan sonra büyük, kırmızı kolonilerden bir adet seçilerek Nutrient broth besiyerine pasajlandı. Nutrient Broth'ta 37°C'de 24 saat üreyen bakteriler Nutrient agara ekilip tekrar 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

#### 2. 2. 1. 2. İdentifikasyon

Nutrient agarda şekillenen kolonilerden Triple Sugar Iron agar (TSI) ve Urea agar' a ekimler yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. TSI agarda bakterilerin laktoz fermantasyonu, hareket ve gaz oluşturmaları kontrol edildi. Ürea agarda ise bakterilerin üreyi kullanıp kullanmadığı kontrol edildi.

##### ➤ Oksidaz Testi

Tetrametil-p-fenilendiamin'den bir miktar alınarak 1 ml serum fizyolojikte erittikten sonra küçük bir miktar filtre kâğıdın üzerine dökülüp emmesi sağlandıktan sonra plastik öze yardımı ile Nutrient agardan bir öze dolusu bakteri alınıp filtre kâğıdı üzerine konarak kırmızı-mavi renkte reaksiyon verenler oksidaz pozitif olarak değerlendirilirken renk oluşturmayanlar negatif olarak değerlendirildi.

##### ➤ İndol Testi

Nutrient broth besiyerinden Nutrient agara ekim yapıldıktan sonra bakterinin ürettiği brothların üzerine Kovaks ayracı damlatılarak indol pozitif olanlar belirlendi.

Yapılan testler bir test klavuzu oluşturularak değerlendirildi (Çizelge 2.2.).

**Çizelge 2. 2.** İdentifikasyonda kullanılan konvansiyonel test klavuzu

<i>E. coli</i>	OKSİDA Z	İNDOL	LAKTOZ	HAREKET	GAZ	ÜRE
+	-	+	+	+	+	-

### ➤ BBL Crystal Hızlı İdentifikasyon Sistemi

Saf olarak şekillenen şüpheli koloniler ise hızlı tanı kiti ile (BBL Crystal) identifikasyona tabi tutuldu. Şüpheli koloniler 37°C' de 18-22 saat inkübe edildi. Enterik-Non fermentatif bakterilere uygun kit ile identifikasyon yapıldı.

### 2. 2. 2. DNA İzolasyonu

Nutrient agarda şekillenen pozitif kolonilerden bir öze dolusu alınarak, içerisinde 100 µl steril distile su bulunan ependorf tüplerde süspansiyon edildi. Vorteksleme yapıp, 95°C termal blokta 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 10.000 rpm devirde 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar steril ependorflara otomatik pipet yardımıyla aktararak izole DNA olarak kullanıldı. PCR aşamasına geçmeden hemen önce nano-drop spektrofotometre ile DNA'ların miktarları ng/mL olarak ölçüldü (Dallenne vd., 2010). PCR'da kullanılan DNA'ların yoğunluğu 100 ng/ml olacak şekilde seyreltildi.

### 2. 2. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İdentifiye edilen ve muhafazaya alınan *E. coli* izolatlarının, virülans genlerinin varlığının araştırılması için PCR tekniği kullanıldı. Genlerin analizi için hazırlanan multipleks PCR karışımları ile kullanılacak PCR koşulları aşağıda tablolarda verilen sıralamayla uygulandı.

#### 2. 2. 3. 1. Virülans Genleri (*Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *ehxA*) Profilleme

Paton ve Paton (2002), yöntemine göre multipleks PCR ile *Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *ehxA* genlerini saptamak için kullanıldı. PCR reaksiyonlarında PCR amplifikasyonu 20 µl toplam hacimde olacak şekilde aşağıda verilen tablodaki protokol kullanıldı. PCR ürünlerine, %2 agaroz jel üzerinde elektroforez işlemi uygulandıktan sonra, etidyum bromür ile boyanmıştır.

**Çizelge 2. 3.** Virülans genleri (*Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *ehxA*) profillemde kullanılan PCR koşulları

KARIŞIM		PCR KOŞULLARI			
Mastermix	4 ul	Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
DNA Şablonu	2 ul	Başlangıç Denatürasyon	1	95 ° C	3 dk
Primer	1 ul	Denatürasyon		95 ° C	20 sn
Ultra Saf Su	6 ul	Bağlanma	25	64 ° C	30 sn
TOPLAM	20 ul	Uzama		72 ° C	45 sn
		Son Uzama	1	72 ° C	5 dk

Reaksiyon döngüleri Paton ve Paton (2002)'nin çalışmasından optimize edilerek belirlenmiştir. PCR, Çizelge 2.3.'de belirtilen koşullarda iCycler (BioRad, T100, ABD) marka thermal cyclers'da gerçekleştirilmiştir.

### 2. 2. 3. 1. *Stx* Alt Tiplendirmesi İçin PCR

*Stx1* ve *Stx2* genlerinin alt tiplemesi, Scheutz vd. (2012) ve Probert vd. (2014) çalışmalarında kullanılan primerlerle gerçekleştirildi. *Stx1* ve *Stx2* genlerinin her biri için ayrı ayrı yapıldı.

### 2. 2. 3. 1. *Stx1* Alt Tiplendirmesi için PCR

Scheutz vd. (2012) ve arkadaşlarının yöntemine göre multipleks-PCR ile *Stx1a*, *Stx1c*, *Stx1d* ve *Stx1e* genleri saptamak için kullanılmıştır. PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 20 µl toplam hacimde olacak şekilde Çizelge 2,4.'de bulunan protokol kullanıldı.

**Çizelge 2. 4.** *Stx1* alt tiplendirilmesi için PCR koşulları

KARIŞIM			PCR KOŞULLARI		
			Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Mastermix	4 ul	Basamak			
DNA Şablonu	2 ul	Başlangıç Denatürasyon	1	95 ° C	3 dk
Primer	1 ul	Denatürasyon		95 ° C	20 sn
Ultra Saf Su	6 ul	Bağlanma	25	64 ° C	30 sn
TOPLAM	20 ul	Uzama		72 ° C	45 sn
		Son Uzama	1	72 ° C	5 dk

### 2. 2. 3. 2. *Stx2* Alt Tiplendirilmesi İçin PCR

*Stx2* alt tiplendirmesinde primerlerin baz uzunluklarının birbirine yakın olması ve erime sıcaklıklarının çok farklı olması nedeniyle üç farklı PCR protokolü kuruldu.

➤ *Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2g* alt tipleri için PCR

**Çizelge 2. 5.** *Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2g* alt tipleri için PCR Karışımı ve PCR koşulları

KARIŞIM			PCR KOŞULLARI		
			Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Mastermix	4 ul	Basamak			
DNA Şablonu	2 ul	Başlangıç Denatürasyon	1	95 ° C	3 dk
Primer	0,5 ul	Denatürasyon		95 ° C	20 sn
Ultra Saf Su	6 ul	Bağlanma	25	60 ° C	30 sn
TOPLAM	20 ul	Uzama		72 ° C	45 sn
		Son Uzama	1	72° C	5 dk

➤ *Stx2f, Stx2h, Stx2j* alt tipleri için PCR

**Çizelge 2. 6.** *Stx2f, Stx2h, Stx2j* alt tipleri için PCR koşulları

KARIŞIM			PCR KOŞULLARI		
		Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Mastermix	4 ul				
DNA Şablonu	2 ul	Başlangıç Denatürasyon	1	95 ° C	3 dk
Primer	0,5 ul	Denatürasyon		95 ° C	20 sn
Ultra Saf Su	11 ul	Bağlanma	25	52 ° C	30 sn
TOPLAM	20 ul	Uzama		72 ° C	45 sn
		Son Uzama	1	72 ° C	5 dk

➤ *Stx2k, Stx2l, Stx2i* alt tipleri için PCR

**Çizelge 2. 7.** *Stx2k, Stx2l, Stx2i* alt tipleri için PCR koşulları

KARIŞIM			PCR KOŞULLARI		
		Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Mastermix	4 ul				
DNA Şablonu	2 ul	Başlangıç Denatürasyon	1	95 ° C	3 dk
Primer	0,5 ul	Denatürasyon		95 ° C	20 sn
Ultra Saf Su	11 ul	Bağlanma	25	55 ° C	30 sn
TOPLAM	20 ul	Uzama		72 ° C	45 sn
		Son Uzama	1	72 ° C	5 dk

## 2. 5. Elektroforez

Agaroz jel, kalıbından çıkarılarak elektroforez tankına aktarıldı. Elektroforez tankı jellerin üzerini geçecek şekilde 1XTAE ile doldurulup PCR ürünlerinden her kuyucuğa 5 µl otomatik pipetle yerleştirildi. Agaroz jel üzerindeki kuyucuklara belli aralıklarda 3 µl Marker yerleştirilip 100Volt'ta 90 dakika elektroforez (BioRad, PowerPac, ABD) işlemine tabi tutuldu. Agaroz jeller ethidium bromide ve 1XTAE ile hazırlanmış solüsyonda 15 dakika bekletildikten sonra UV ışık altında Quantum ST4 jel görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirildi.

## 2. 6. İstatistik Analizi

İstatistik analizinde Rstudio programı kullanılarak 'pearson ki kare' testi yapıldı. Gruplar arasındaki önem farkı 0,05 güven aralığında değerlendirildi.



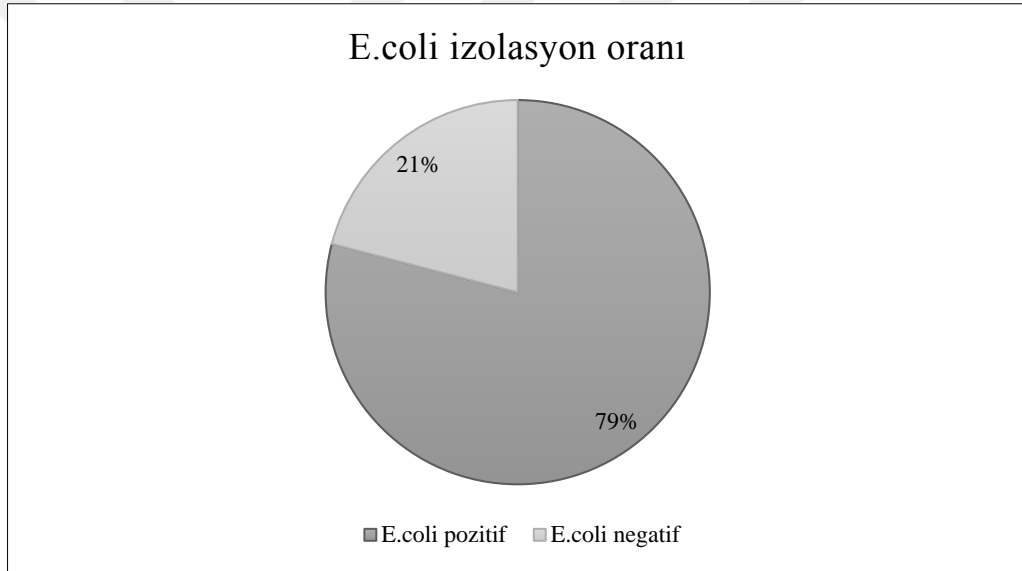


## 3. BULGULAR

### 3. 1. Bakteri İzolasyon ve İdentifikasyon Test Sonuçları

Bu çalışmada 272 koyundan elde edilen rektal sıvap örneklerinden 215 adet *E. coli* izole edilmiştir. Elde edilen *E. coli* izolasyon oranı Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

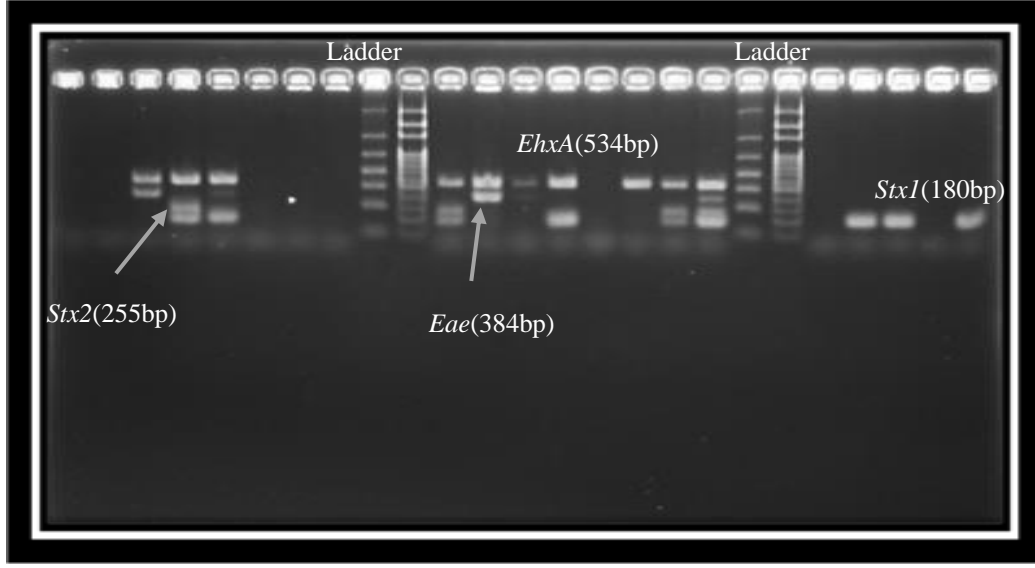
Çizelge 3. 1. *E. coli* izolasyon oranı



### 3. 2. PCR Sonuçları

#### 3. 2. 1. PCR ile Virülans Genleri (*Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *ehxA*) Profillenmesi

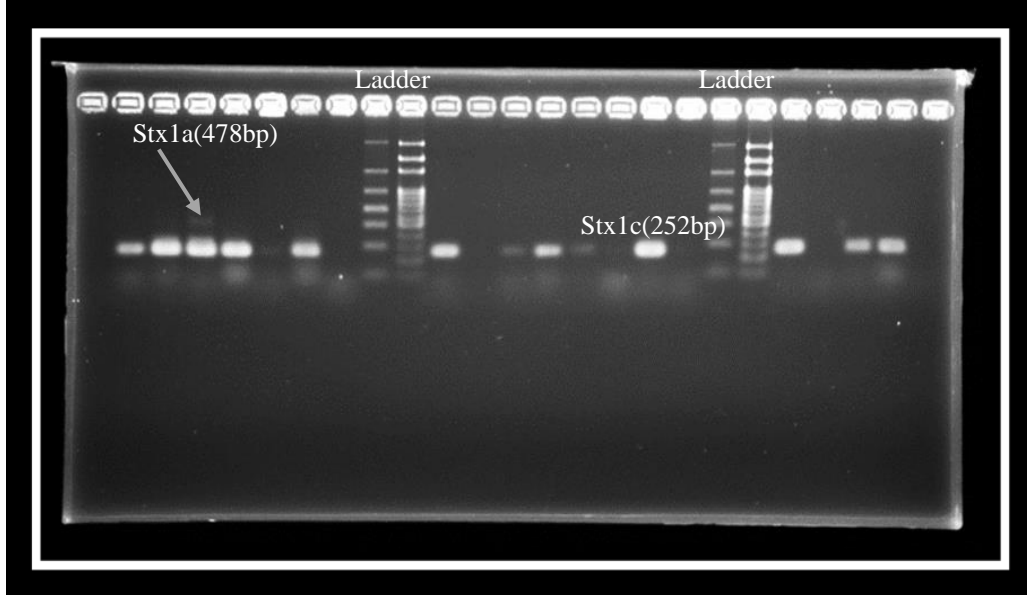
İzolatların 19 (%8,84)'unda *Stx1*, 3 (%1,4)'ünde *Stx2*, 5 (%2, 33)'inde *eae* ve 9 (%4, 19)'unda *ehxA* geni tek başına tespit edildi. İzolatlardan 13 (%6, 05) *Stx1-Stx2-ehxA*, 5(%2,33) *Stx1-eae -ehxA*, 3 (%1, 4) *Stx2-eae-ehxA* birlikte tespit edildi. Genlerden 1 (% 0,47) *Stx1- eae*, 30 (%13,95) *Stx1- ehxA*, 1 (%0,47) *Stx2- eae*, 15 (%6,98) *Stx2-ehxA* ve 10 (%4,65) *eae – ehxA* birlikte tespit edildi. İzolatların 101(%46, 98)'inde ise *Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *ehxA* genlerinden herhangi biri tespit edilemedi (Resim 3.1.).



**Resim 3. 1.** *Stx1*, *Stx2*, *Eae*, *EhxA* genlerinin jel görüntüsü

### 3. 2. 2. *Stx1* Alt Tiplendirilmesi Sonuçları

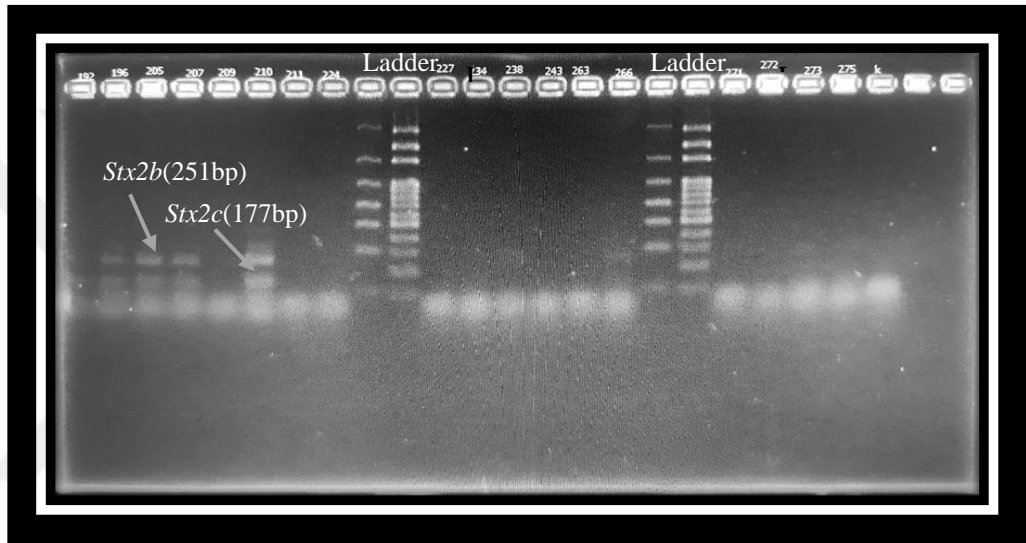
*Stx1* geni tespit edilen 68 izolattan 56 (%82, 35)'sında sadece *Stx1c* geni tespit edildi. 3 (%4, 41) *Stx1a-Stx1c*, 2 (%2, 94) *Stx1c-Stx1e* ve 1 (%1, 47) izolatta *Stx1a-Stx1c-Stx1e* genleri birlikte tespit edildi. İzolatların 6'sında ise *Stx1a*, *Stx1c*, *Stx1d*, *Stx1e* genlerinden hiçbiri tespit edilemedi (Resim3.2.).



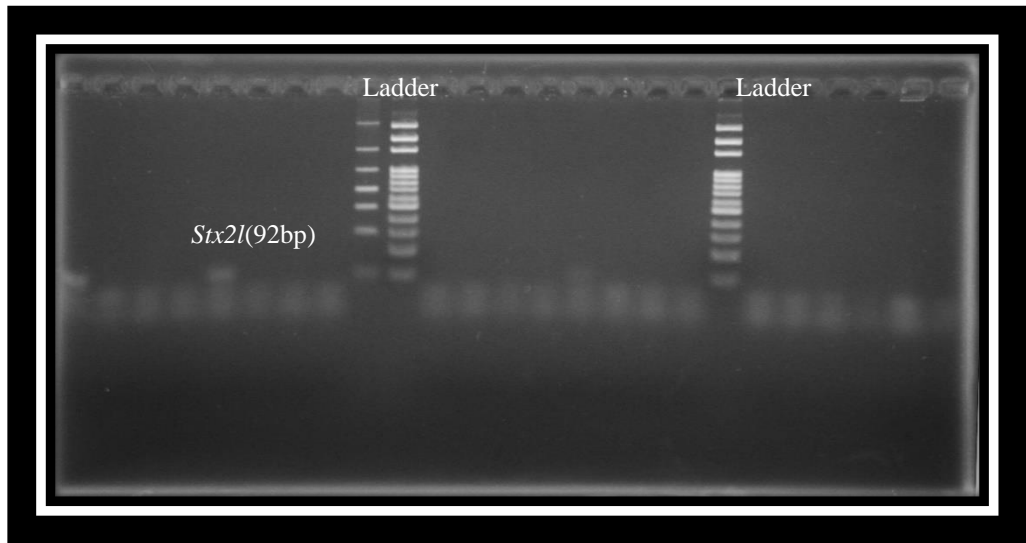
**Resim 3 2.** *Stx1* alt tiplendirmesinin jel görüntüsü

### 3. 2. 3. *Stx2* Alt Tiplendirilmesi Sonuçları

*Stx2* tespit edilen 35 izolatın 2 (%5,71) *Stx2a*, 16 (%45,71) *Stx2b*, 19 (%54,29) *Stx2c*, 8 (%22,86) *Stx2d*, 2 (%5,71) *Stx2e*, 22 (%62,86) *Stx2f*, 8 (%22,86) *Stx2h*, 2 (%5,71) *Stx2j*, 3 (%8,57) *Stx2l* tespit edildi (Çizelge3.2.). İzolatların 8'inde ise araştırılan alt tiplerden hiçbiri tespit edilemedi (Resim 3.3. ve Resim 3.4.). *Stx1-stx2-ehxA* genlerinin birlikte tespit edildiği izolatlarda yapılan alt tiplendirmede ise *stx1c-stx2b-stx2c-stx2f-stx2h-ehxA* genleri birlikte daha sıklıkla belirlendi (Çizelge3.3.).



**Resim 3. 3.** *Stx2a*, *Stx2b*, *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e*, *Stx2g* alt tiplendirmesi için jel görüntüsü.



**Resim 3. 4.** *Stx2k*, *Stx2l*, *Stx2i* alt tipleri için jel görüntüsü.

**Çizelge 3. 2. Stx2 alt tiplendirmesi sonuçları**

No	Örnek	Stx2a	Stx2b	Stx2c	Stx2d	Stx2e	Stx2f	Stx2g	Stx2h	Stx2i	Stx2j	Stx2k	Stx2l
1	21	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2	35	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
3	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	47	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
5	85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	101	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
7	116	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
8	122	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9	124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	137	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
11	138	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	141	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
13	154	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
14	156	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
15	158	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	160	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
17	161	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
18	168	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
19	172	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
20	180	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
21	187	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
22	188	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
23	192	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	196	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
25	201	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	205	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
27	207	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
28	209	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	210	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
30	234	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
31	250	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
32	251	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	253	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	266	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
35	275	-	-	-	--	-	+	-	-	-	-	-	-
	<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>19</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>21</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>3</b>

**Çizelge 3. 3.** Birlikte saptanan *Stx1-Stx2-exhA* genlerinin dağılımı

Örnek No	101	116	137	138	187	188	192	201	205	209	210	234	275
Stx1-Stx2-EhxA gen dağılımı	<i>Stx1c</i>	<i>Stx1c</i>	<i>Stx1c</i>	<i>Stx1c</i>	<i>Stx1c</i>	<i>Stx1a</i>	<i>Stx1c</i>	<i>Stx1c</i>	<i>Stx1c</i>	<i>Stx1c</i>	<i>Stx1c</i>	<i>Stx1c</i>	<i>Stx1c</i>
	<i>Stx2b</i>	<i>Stx2b</i>	<i>Stx2b</i>	<i>Stx2c</i>	<i>Stx2b</i>	<i>Stx1c</i>	<i>Stx2c</i>	<i>Stx2c</i>	<i>Stx2b</i>	<i>EhxA</i>	<i>Stx2a</i>	<i>Stx2f</i>	<i>Stx2f</i>
	<i>Stx2f</i>	<i>Stx2c</i>	<i>Stx2c</i>	<i>EhxA</i>	<i>Stx2c</i>	<i>Stx2b</i>	<i>EhxA</i>	<i>EhxA</i>	<i>Stx2c</i>		<i>Stx2b</i>	<i>EhxA</i>	<i>EhxA</i>
	<i>EhxA</i>	<i>Stx2f</i>	<i>Stx2d</i>		<i>Stx2d</i>	<i>Stx2c</i>			<i>Stx2f</i>		<i>Stx2c</i>		
		<i>EhxA</i>	<i>Stx2f</i>		<i>Stx2f</i>	<i>Stx2d</i>			<i>Stx2h</i>		<i>Stx2f</i>		
		<i>EhxA</i>		<i>Stx2h</i>	<i>Stx2f</i>			<i>EhxA</i>		<i>Stx2h</i>			
				<i>EhxA</i>	<i>Stx2h</i>	<i>Stx2f</i>					<i>EhxA</i>		
					<i>EhxA</i>	<i>Stx2h</i>					<i>EhxA</i>		
						<i>EhxA</i>							

### 3. 3. İstatistik

Bu çalışmada koyunlarda STEC prevalansına ırk ve cinsiyetin etkisini değerlendirmek amacıyla Rstudio programı kullanılarak ‘pearson ki kare’ testi yapıldı. İzole edilen STEC’lere iki ayrı hipotez kurularak ırk ve cinsiyet üzerine araştırma yapıldı.

Birinci hipotezimiz *Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *ehxA* genlerinin cinsiyet üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla oluşturuldu. Dişi koyunlardan alınan 135 rektal sıvaptan 107’sinden *E. coli* izole edildi. *E. coli* tespit edilen 107 izolattan 53’ünde *Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *ehxA* genleri pozitif tespit edildi. Pozitif izolatların ise 31 (%58.49)’inde *Stx1*, 17 (%32.08)’sinde *Stx2*, 9 (%16.98)’unda *eae*, 34 (%64.14)’de *ehxA* gen bölgesi tespit edildi. Erkek koyundan alınan 137 rektal sıvaptan ise 107 *E. coli* izole edildi. Bu izolatlardan dört gen bölgesi için pozitif olan örnek sayısı 61 olarak bulundu. Pozitif olan 61 izolattan ise 37 (%60.66)’sinde *Stx1*, 20 (%32.79)’sinde *Stx2*, 16 (%26.23)’sında *eae*, 50 (%81.97)’sinde ise *ehxA* tespit edildi. İzolatların 46’sında ise bu dört gen bölgesinden hiçbiri tespit edilmedi (Çizelge 3.4.). Bu çalışmada erkek hayvanlarda STEC taşıyıcılığı istatistiki olarak önemli olmamakla birlikte dişi hayvanlardan daha fazladır. Elde edilen bulgular neticesinde 0,05 güven aralığıyla virulans genlerini cinsiyet üzerinde bir etkisi olmadığı yani bağımsız olduğu sonucuna ulaşıldı.

**Çizelge 3. 4.** Virulans genlerinin cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet/ Virulans Genler	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>Eae</i>	<i>EhxA</i>	Gen Bulunmayan
Dişi	31 (%22.96)	17 (%12.59)	9 (%6.66)	34 (%25.18)	54 (%40)
Erkek	8 (%27.73)	18 (%13.13)	16 (%11.37)	50 (%36.49)	46 (%33.57)

\*Bu çalışmada 135 dişi ve 137 erkek koyun kullanıldı.

STEC’in ırk ile olan ilişkisini değerlendirmek için ise 143 adet akkaraman koyundan ve 129 adet merinos koyundan rektal sıvap alındı. Akkaraman koyundan alınan 143 rektal sıvaptan 109 *E. coli* izole edildi. *E. coli* izolatların 47’sinde bu dört gen bölgesinin hiçbiri bulunmamakla beraber 62’si bu dört gen için pozitif tespit edildi. *Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *ehxA* genleri pozitif tespit edilenler 62 izolat içinde ise 39 (%62.90) adet *Stx1*, 12 (%19.32) *Stx2*, 19 (%30.65) *eae*, 40 (%64.52) *ehxA* gen bölgesi

tespit edildi. Merinos koyunlardan alınan 129 rektal sıvaptan ise 105'inden *E. coli* izole edildi. *E. coli* izolatlarının 51'i bu dört gen bölgesi için pozitif olarak tespit edildi. Bunlardan 29 (%56.86) *Stx1*, 23 (%45.10) *Stx2*, 6 (% 11.76) *eae*, 44 (%86.27) ise *ehxA* gen bölgesi tespit edildi (Çizelge 3.5.). Bu çalışmada istatistiki olarak önemli olmamakla birlikte akkaraman koyunlarda STEC taşıyıcılığı daha fazladır.

İkinci hipotezimizde ise *Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *ehxA* genlerinin ırklar (akkaraman, merinos) üzerinde etkisi olup olmadığı analiz edildi. Bağımlık ilişkisi tespit edildi. Bu çerçevede yeni bir hipotez oluşturularak hangi ırklar arasında bağımlılık ilişkisi olduğu tespit edilmeye çalışıldı. Elde edilen veriler neticesinde her iki ırkında (akkaraman, merinos) 0,05 güven aralığında bağımlı olduğu tespit edilerek ırklar arasında bir farklılığın olmadığı sonucuna varıldı.

**Çizelge 3. 5.** Virulans genlerinin türlere göre dağılımı

<b>İrk</b>	<b><i>Stx1</i></b>	<b><i>Stx2</i></b>	<b><i>Eae</i></b>	<b><i>EhxA</i></b>	<b>Gen Bulunmayan</b>
<b>Akkaraman</b>	39(%27.27)	12(%8.39)	19(%14.17)	40(%27.97)	47(%32.86)
<b>Merinos</b>	29(%22.48)	23(%17.82)	6(%4.65)	44(%34.10)	54(%41.86)

\*Bu çalışmada 143 Akkaraman ve 129 Merinos ırkı koyun kullanıldı.





## 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gastrointestinal sistemde yaygın olarak bulunan *E. coli*'nin STEC patotipi tüm dünyada 1980'lerden beri halk sağlığı sorunlarına neden olan önemli bir gıda kaynaklı patojendir. Shiga toksin üreten *E. coli* basit ishalden HK, HÜS ve ölüme sonuçlanabilen ciddi hastalıklara neden olma potansiyelinin bulunması nedeniyle önemli bir gıda kaynaklı patojendir (Cody ve Dixon, 2019). Sığırlar STEC ve EPEC suşları için temel rezervuarı kabul edilse de (Ferhat vd., 2019; Hu, vd., 2022) koyunlarda STEC ve EPEC suşlarının varlığı göz ardı edilmeyecek orandadır. Shiga toksin üreten *E. coli* suşlarının asemptomatik taşıyıcılarından olan koyunlardaki başlıca virülans faktörlerinin belirlenmesi, insanlarda gıda kaynaklı STEC enfeksiyonlarının epidemiyolojisini ve patolojisini aydınlatılabilir.

Bu çalışmada Ankara ilindeki 12 farklı koyun sürüsünden alınan 272 örnekten 215'inde (%79) *E. coli* tespit edildi. Multipleks-PCR ile *Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *ehxA* genleri için yapılan taramada pozitif PCR sayısı 114 (%53.02) idi. Koyunlarda STEC prevalansı %36.74 ve EPEC prevalansı %11.62 olarak kaydedildi. Beutin vd. (1993) yaptıkları çalışmada koyunlarda %66.6 oranında ve Martins vd. (2015) Brezilya'da yürüttükleri çalışmada %50 gibi yüksek prevalansta STEC rapor etmişlerdir. Bu veriler çalışmadaki yüksek STEC prevalansı ile uyumludur. Enterotoksijenik *E. coli* suşları HK ve HÜS'tan sorumlu birincil patotipidir. Hemolitik Üremik Sendromun gelişiminde intimin önemli rol oynar (Caprioli, Morabito, Brugère ve Oswald, 2005). Bu çalışma ETEC virülans gen kombinasyonlarından *Stx1* ve *eae* birlikte olduğu 6 adet adet izolat, *Stx2* ve *eae* birlikte olduğu 4 adet izolat tespit edilmiş olup *Stx1-eae* kombinasyonuna daha sık rastlanmıştır. Bu da Brezilya'da yapılan çalışma ile uyumludur (Gonzalez vd., 2016).

Martins vd. (2015) Güney Brezilya'da 130 sağlıklı koyunda STEC prevalansını araştırdıkları çalışmada %52.8 *Stx1* ve %14.3 *Stx2* kaydetmişlerdir. Bu çalışmada ise 215 adet izolattan 68 (%25) *Stx1*, 35 (%12.86) *Stx2* geni tespit edildi. Çalışmalar arasında oransal olarak benzerlik olsada *Stx1* ve *Stx2* genleri daha düşük yüzdelerde tespit edilmiştir.

Djordjevic (2001) tarafından yapılan çalışmada anaç koyunlarda %1.53 *Stx1-Stx2-ehxA*, %3.94 *Stx1-eae-ehxA*, %0 *Stx2-eae-ehxA*, %3.87 *Stx1-eae*, %24.23 *Stx1-ehxA*, %0.22 *Stx2-eae*, %0,11 *Stx2-ehxA*, %0.44 *eae-ehxA* genleri tespit edilmiştir. Fakat bu çalışmada aynı gen kombinasyonları farklı oranlarda tespit edilmiştir.

Çin'in Jiangsu kentinde Han (2022) tarafından yürütülen çalışmada ise koyundan elde edilen STEC izolatlarından *Stx1* %69.1, *Stx2* %29,4 ve *Stx1-Stx2* %1,47 olarak tespit edilmiş olup bu tez çalışmasında kaydedilen sadece *Stx1* %8,84 ve *Stx2* %1,4 oranından daha yüksektir. Fakat bu tez çalışmasındaki 114 pozitif izolatta *Stx1* %59,64 ve *Stx2* %30,70 olarak bulundu. Bu çalışmada *Stx1* ve *Stx2* genlerinin tek başına tespit edilme oranı düşük olup diğer genler ile birlikte görülmesi yapılan diğer çalışmalardan daha fazladır. Hem *eae* hem de *Stx2* taşıyan STEC'ler şiddetli HÜS vakaları ile %91.07 oranında ilişkilendirilmiş (Hua vd., 2020) olup bu çalışmada 4 adet izolatta bu iki gen bölgesi birlikte tespit edildi. Yukarıda bahsedilen tüm çalışmalar *Stx1*'in koyunlardan izole edilen STEC'lerde baskın gen olduğunu düşündürmektedir. İzolatların 101 (%46,98)'inde ise *Stx1*, *Stx2*, *eae* ve *ehxA* genlerinden herhangi biri tespit edilmemiştir.

Koyunlar arasında *Stx1c* alt tipin sıklıkla izole edildiği bilinmektedir (Blanco, 2003b; Vettorato, Leomil, Guth, Irino ve Pestana de, 2003; Brett, 2003; Martin, 2011). Liu vd. (2022) Çin'de yürüttükleri bir çalışmada, sığır ve koyun çiftliklerinden izole edilen 56 STEC suşu üzerinde yaptıkları çalışmada %55.4 *Stx1*, %3 *Stx2* ve %39.3 *Stx1+Stx2* tespit etmişlerdir. koyunlardan izole edilen *Stx1* geni içeren izolatın %64.3'sü *Stx1c*, %35,7'si *Stx1a* olarak bulunmuştur. Bu tez çalışmasında *Stx1* geni tespit edilen 68 izolatta %82.35 *Stx1c* yüksek oranda kaydedilmiştir. Aynı çalışmada *Stx1a* %35,7 olarak bulunmuş fakat bu çalışmada ise *Stx1a*, *Stx1a-Stx1c*, *Stx1a-Stx1c-Stx1e* genleri ile birlikte düşük oranda kaydedilmiştir. Yue vd. (2022) çalışmasında *Stx1c*'nin %41,2 tespit edilmiş olması koyunlardaki baskın alt tipinin *Stx1c* olduğunu destekler niteliktedir. Diğer çalışmalarda koyunların *Stx1c* alt tipinin ana rezervuarı olduğu fikrini desteklemektedir (Zweifel vd., 2004; Brett vd., 2003; Liu vd., 2022). *Stx1c* HK veya HÜS ile ilişkili olmasa da asemptomatik enfeksiyonu veya hafif diyareyi tetikleme eğilimindedir (Brandal vd., 2015).

Bu çalışmada *Stx2* alt tiplendirmesi koyunlarda sırasıyla *Stx2f*, *Stx2c*, *Stx2b*, *Stx2d*, *Stx2h* alt tiplerinin daha yüksek oranda ve insanlar için en öldürücü kombinasyon olarak kabul edilen (Friedrich, vd., 2002) *Stx2a-Stx2c*'den 2 ve *Stx2c-*

Stx2d'den ise 8 adet tespit edildi. Han vd. (2022) Çin'nin Jiangsu kentinde 231 koyun, 70 sığırdan izole edilen STEC ve EPEC izolatlarından virulans genlerinin karakterizasyonunu amaçlayan çalışmalarında koyunlarda %14,7 *Stx2b*, %14,7 *Stx2k* ve %1,5 *Stx1c-Stx2b* tespit edilmiş olup bu çalışmada ise farklı olarak *Stx2a*' dan düşük oranda, *Stx2f*'den diğer genler ile farklı kombinasyonlarda daha yüksek oranda tespit edildi. *Stx2k* ise hiç bulunamamıştır. Sporadik HÜS vakaları ile ilişkilendirilmiş (De Boer vd., 2015) *Stx2b* alt tipiden ise bu tez çalışmasında %45.71 oranla Han vd. (2022) belirttiği %14,7'ye göre yüksek oranda saptanmıştır.

Domuzların ödem hastalığı (Gyles, 2007) ve insanlarda semptomsuz, hafif hastalık ile ilişkilendirilen (Orth vd., 2007) nadiren de insanlardan izole edilen (Beutin vd., 2008) *Stx2e* gen bölgesine 2 izolatta rastlandı. Bu da koyunlarından izole edilen *E. coli*'lerde *Stx2e* gen bölgesinin bulunabileceğini göstermiştir.

Shiga toksinin *Stx2a*, *Stx2c* ve *Stx2d* alt tipleri insanlarda ciddi hastalık tablosu ile ilişkilendirilmektedir (Shen vd. 2022). Bu tez çalışmasında; *Stx2a* düşük, *Stx2c* ve *Stx2d* genleri yüksek prevalansta tespit edilmiştir. Bu veriler, koyunlarda bulunan STEC suşlarının, insanlarda hastalık tablosu oluşturma potansiyeli olabileceğini düşündürmüştür. Bai vd. (2018) dağ sıçanlarından yeni bir *Stx2* alt tipi belirlemişlerdir. Dağ sıçanlarında %66.7 tespit edilen *Stx2h* alt tipinden bu çalışmada da %21.62 oranında tespit edilmiştir. Bu sonuç *Stx2h* alt tipinin diğer hayvan türlerinde de olabileceğini düşündürmüştür. Isıl işleme ve düşük pH'a dayanıklı olduğu bildirilen *Stx2f*'nin, *Stx2a*'dan daha düşük toksitesin olduğu bildirilmiştir (Skinner, McMahon, Rasooly, Carter ve He 2013). *Stx2f*'nin bu kararlı yapısı gıda kontaminasyonları ile olan enfeksiyon riskini arttırmaktadır. Bu çalışmada ise *Stx2f* %60 prevalansta bulunması koyunların *Stx2f* için önemli bir rezervuarı olduğunu düşündürmektedir. *Stx2f*'ye benzer yapıda olduğu tespit edilen (Gill vd., 2022) *Stx2j*' den bu çalışmada 2 (%5.40) adet tespit edildi. *Stx2l* STEC ile yakın zamanda ilişkilendirilen yeni bir alt tiptir (McCarthy vd., 2021). Yang vd. (2022) Çin' de yaptıkları çalışmada çiğ koyun ve sığır etinde 5 adet *Stx2l* tespit etmiş (Yang vd., 2022) olmaları bu çalışmada bulunan %8.57 *Stx2l* sonucunu desteklemektedir.

Çin'in Jiangsu kentinde Han (2022) tarafından yürütülen çalışmada koyunlarda STEC prevalansı %61.5 ve sığırlarda ise %12.9 prevalansta kayıt edilmiştir. Aynı şekilde Amézquita-López (2012) 240 çiftlik hayvanında yaptıkları çalışmada sığırlarda %4.58 koyunlarda ise %5.41 STEC izole etmiştir. Tüm bu çalışmalar

koyunlarda STEC prevalansının sığırlardan daha yüksek oranda olabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak; STEC'ler gıda kaynaklı, önemli halk sağlığı sorunu olan zoonotik patojenlerdir. Özellikle 5 yaş altı çocuklarda ölümlerle sonuçlanabilen HÜS vakalarına neden olan STEC izolatlarının başlıca virulens özelliklerinin analiz edilmesi, insanlarda gıda kaynaklı STEC enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve patojenitesini aydınlatılması açısından önemlidir. Bu çalışma koyunların da önemli bir STEC rezervuarı olduğu göstermektedir.



## KAYNAKLAR

- Amézquita-López, B. A., Quiñones, B., Cooley, M. B., León-Félix, J., Castro-del Campo, N., Mandrell, R. E., Jiménez, 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*, 7(12), e51565.
- Bai, X., Fu, S., Zhang, J., Fan, R., Xu, Y., Sun, H., He, X., Xu, J., & Xiong, Y. (2018). Identification and pathogenomic analysis of an *Escherichia coli* strain producing a novel Shiga toxin 2 subtype. *Scientific reports*, 8(1), 6756.
- Balière, C., Rincé, A., Delannoy, S., Fach, P., & Gourmelon, M. (2016). Molecular Profiling of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Enteropathogenic *E. coli* Strains Isolated from French Coastal Environments. *Applied and environmental microbiology*, 82(13), 3913–3927. <https://doi.org/10.1128/AEM.00271-16>
- Bäumler, A. J., & Heffron, F. (1995). Identification and sequence analysis of *ipfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*, 177(8), 2087–2097. <https://doi.org/10.1128/jb.177.8.2087-2097.1995>
- Bélanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., & Dozois, C. M. (2011). *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS immunology and medical microbiology*, 62(1), 1–10.
- Bergey D. H. Sneath P. H. A. & Holt J. G. (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology. vol. 2. Williams & Wilkins.*
- Beutin, L., Geier, D., Steinrück, H., Zimmermann, S., & Scheutz, F. (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of clinical microbiology*, 31(9), 2483–2488.
- Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., Aleksic, S., Gillespie, H. A., & Whittam, T. S. (1997). Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2175-2180.
- Beutin, L., Krüger, U., Krause, G., Miko, A., Martin, A., & Strauch, E. (2008). Evaluation of major types of Shiga toxin 2E-producing *Escherichia coli* bacteria present in food, pigs, and the environment as potential pathogens for humans. *Applied and environmental microbiology*, 74(15), 4806–4816.

- 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*. *Journal of clinical microbiology*, 27(11), 2559–2564. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.11.2559-2564.1989>
- Bielaszewska, M., Sinha, B., Kuczius, T., & Karch, H. (2005). Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infection and immunity*, 73(1), 552–562. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.552-562.2005>
- Bitzan, M., Richardson, S., Huang, C., Boyd, B., Petric, M., & Karmali, M. A. (1994). Evidence that verotoxins (Shiga-like toxins) from *Escherichia coli* bind to P blood group antigens of human erythrocytes in vitro. *Infection and immunity*, 62(8), 3337–3347. <https://doi.org/10.1128/iai.62.8.3337-3347.1994>
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Gonzalez, E. A., Bernardez, M. I., ... & Usera, M. A. (2003a). Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157: H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Experimental biology and medicine*, 228(4), 345-351.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M. P., González, E. A., Bernárdez, M. I., & 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 variant gene (*eae-xi*). *Journal of clinical microbiology*, 42(2), 645–651. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.645-651.2004>
- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M. P., Dahbi, G., González, E. A., Bernárdez, M. I., & Blanco, J. (2003b). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *Journal of clinical microbiology*, 41(4), 1351–1356. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1351-1356.2003>
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife*, 4, e05826.
- Boden, R., Hutt, L. P., & Rae, A. W. (2017). Reclassification of *Thiobacillus aquaesulis* (Wood & Kelly, 1995) as *Annwoodia aquaesulis* gen. nov., comb. nov., transfer of *Thiobacillus* (Beijerinck, 1904) from the Hydrogenophilales to the Nitrosomonadales, proposal of Hydrogenophilalia class. nov. within the 'Proteobacteria', and four new families within the orders Nitrosomonadales and Rhodocyclales. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(5), 1191–1205. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001927>
- Boyd, B., & Lingwood, C. (1989). Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron*, 51(2), 207–210. <https://doi.org/10.1159/000185286>
- Brandal, L. T., Sekse, C., Lindstedt, B. A., Sunde, M., Løbersli, I., Urdahl, A. M., & Kapperud, G. (2012). Norwegian sheep are an important reservoir for human-pathogenic *Escherichia coli* O26:H11. *Applied and environmental microbiology*, 78(12), 4083–4091.

- Brandal, L. T., Wester, A. L., Lange, H., Løbersli, I., Lindstedt, B. A., Vold, L., & Kapperud, G. (2015). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Norway, 1992-2012: characterization of isolates and identification of risk factors for haemolytic uremic syndrome. *BMC infectious diseases*, 15, 324. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1017-6>
- Brett, K. N., Ramachandran, V., Hornitzky, M. A., Bettelheim, K. A., Walker, M. J., & Djordjevic, S. P. (2003). *stx1c* Is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle. *Journal of clinical microbiology*, 41(3), 926–936.
- Brooks, H. J. L., Mollison, B. D., Bettelheim, K. A., Matejka, K., Paterson, K. A., & Ward, V. K. (2001). Occurrence and virulence factors of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meat in Dunedin, New Zealand. *Letters in Applied Microbiology*, 32(2), 118-122.
- Brunder, W., Schmidt, H., & Karch, H. (1996). KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* (Reading, England), 142 ( Pt 11), 3305–3315. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-11-3305>
- Brunder, W., Schmidt, H., & Karch, H. (1997). EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Molecular microbiology*, 24(4), 767–778. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3871751.x>
- Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., & Duchateau, L. (2003). Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary research*, 34(5), 521–564. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003023>
- Capps, K. M., Ludwig, J. B., Shridhar, P. B., Shi, X., Roberts, E., DebRoy, C., Cernicchiaro, N., Phebus, R. K., Bai, J., & Nagaraja, T. G. (2021). Identification, Shiga toxin subtypes and prevalence of minor serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feedlot cattle feces. *Scientific reports*, 11(1), 8601. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87544-w>
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., & Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary research*, 36(3), 289–311.
- Caprioli, A., Scavia, G., & Morabito, S. (2014). Public Health Microbiology of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 2(6), 10.1128/microbiolspec.EHEC-0014-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0014-2013>
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., & Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiology and molecular biology reviews*: MMBR, 71(1), 158–229. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-06>
- Castellani A, Chalmers AJ. (1919) Manual of Tropical Medicine, 3rd ed. Williams Wood and Co., New York, 1919. <https://lpsn.dsmz.de/species/escherichia-coli>  
Erişim tarihi:25.11.2022

- Castro, V. S., Carvalho, R. C. T., Conte-Junior, C. A., & Figueiredo, E. E. S. (2017). Shiga-toxin producing *Escherichia coli*: pathogenicity, supershedding, diagnostic methods, occurrence, and foodborne outbreaks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1269-1280.
- Chapman, P. A., Siddons, C. A., Gerdan Malo, A. T., & Harkin, M. A. (1997). A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiology and Infection*, 119(2), 245–250. <https://doi.org/10.1017/s0950268897007826>
- China, B., & Goffaux, F. (1999). Secretion of virulence factors by *Escherichia coli*. *Veterinary research*, 30(2-3), 181-202.
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental microbiology reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Cody, E. M., & Dixon, B. P. (2019): Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatric clinics of North America*, 66(1), 235–246.
- Conceição, R. A., Ludovico, M. S., Andrade, C. G. T. J., & Yano, T. (2012). Human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) is able to adhere to and invade kidney epithelial cells in culture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45, 417-424.
- Cookson, A. L., Bennett, J., Thomson-Carter, F., & Attwood, G. T. (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(20), 6360–6369. <https://doi.org/10.1128/AEM.00316-07>
- Cornick, N. A., Booher, S. L., & Moon, H. W. (2002). Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157: H7 in adult ruminants. *Infection and Immunity*, 70(5), 2704-2707.
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(3), 490–495.
- De Boer, R. F., Ferdous, M., Ott, A., Scheper, H. R., Wisselink, G. J., Heck, M. E., Rossen, J. W., & Kooistra-Smid, A. M. (2015). Assessing the public health risk of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by use of a rapid diagnostic screening algorithm. *Journal of clinical microbiology*, 53(5), 1588–1598.
- Dho-Moulin, M., & Fairbrother, J. M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary research*, 30(2-3), 299-316.
- Djafari, S., Ebel, F., Deibel, C., Krämer, S., Hudel, M., & Chakraborty, T. (1997). Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 25(4), 771–784. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5141874.x>



- Djordjevic, S. P., Hornitzky, M. A., Bailey, G., Gill, P., Vanselow, B., Walker, K., & Bettelheim, K. A. (2001). Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. *Journal of clinical microbiology*, 39(5), 2017–2021.
- Doyle, M. E., Archer, J., Kaspar, C. W., & Weiss, R. (2006). Human illness caused by *E. coli* O157: H7 from food and non-food sources. *FRI Briefings*, 1-37.
- Doyle, M. P., & Padhye, V. V. (1989). *Escherichia coli* pp. In *Food borne Bacterial Pathogens*. 236-270
- Elliott, S. J., Sperandio, V., Girón, J. A., Shin, S., Mellies, J. L., Wainwright, L., ... & Kaper, J. B. (2000). The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE-and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 68(11), 6115-6126.
- Elliott, S. J., Wainwright, L. A., McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Deng, Y. K., Lai, L. C., McNamara, B. P., Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. (1998). The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Molecular microbiology*, 28(1), 1–4. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00783.x>
- Erdem B. (1999). *Enterobacteriaceae*. In: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji (1. Baskı), Ustaçelebi Ş (eds), Güneş Kitabevi, Ankara, s: 471-515.
- Erol İ. (2007) *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi* (1. Baskı) Pozitif Matbaacılık, s: 78-92.
- Etcheverría, A. I., & Padola, N. L. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence*, 4(5), 366–372. <https://doi.org/10.4161/viru.24642>
- Fairbrother, J. M., & Nadeau, E. (2006). *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev Sci Tech*, 25(2), 555-69.
- Fard, R., Dallal, M., Moradi, R. Z., & Rajabi, Z. (2019). Molecular Pathotyping of *Escherichia Coli* Isolates and Detection of Residual Antibiotics in Raw Cow Milk in Iran. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, 60(1).
- Ferhat, L., Chahed, A., Hamrouche, S., Korichi-Ouar, M., & Hamdi, T. M. (2019). Research and molecular characteristic of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep carcasses. *Letters in applied microbiology*, 68(6), 546–552. <https://doi.org/10.1111/lam.13142>
- Fraser, M. E., Fujinaga, M., Cherney, M. M., Melton-Celsa, A. R., Twiddy, E. M., O'Brien, A. D., & James, M. N. (2004). Structure of shiga toxin type 2 (*Stx2*) from *Escherichia coli* O157:H7. *The Journal of biological chemistry*, 279(26), 27511–27517. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401939200>
- Fratamico PM, Smith JL. (2005). *Escherichia coli*, Foodborne Infections and Intoxications. New York: *Academic Press*, p: 205-258,
- Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W. L., 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(1), 74–84.

- Fuller, C. A., Pellino, C. A., Flagler, M. J., Strasser, J. E., & Weiss, A. A. (2011). Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infection and immunity*, 79(3), 1329-1337.
- Garmendia, J., Frankel, G., & Crepin, V. F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infection and immunity*, 73(5), 2573–2585. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2573-2585.2005>
- Garrity, G.M., Bell, J.A. & Lilburn, T.G. (2004). *Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd Edition) New York: Release 5.0. Springer-Verlag, May 2004: 1-399. DOI: 10.1007/bergesoutline200405
- Gill, A., Dussault, F., McMahon, T., Petronella, N., Wang, X., Cebelinski, E., Scheutz, F., Weedmark, K., Blais, B., & Carrillo, C. (2022). Characterization of Atypical Shiga Toxin Gene Sequences and Description of *Stx2j*, a New Subtype. *Journal of clinical microbiology*, 60(3), e0222921. <https://doi.org/10.1128/jcm.02229-21>
- Goncuoglu, M., Bilir Ormanci, F. S., Ayaz, N. D., & Erol, I. (2010). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157: H7 isolated from cattle and sheep. *Annals of microbiology*, 60(3), 489-494.
- Gonzalez, A. G., Cerqueira, A. M., Guth, B. E., Coutinho, C. A., Liberal, M. H., Souza, R. M., & Andrade, J. R. (2016). Serotypes, virulence markers and cell invasion ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy dairy cattle. *Journal of applied microbiology*, 121(4), 1130–1143.
- Gould, L. H., Demma, L., Jones, T. F., Hurd, S., Vugia, D. J., Smith, K., ... & Emerging Infections Program FoodNet Working Group. (2009). Hemolytic uremic syndrome and death in persons with *Escherichia coli* O157: H7 infection, foodborne diseases active surveillance network sites, 2000–2006. *Clinical Infectious Diseases*, 49(10), 1480-1485.
- Gökçe E, Ünver A, Erdoğan H. (2010). Determination of enteric pathogens in neonatal lambs with diarrhea. *Journal of Kafkas University Faculty of Veterinary Medicine*. 16(5), 717- 722.
- Gülhan T., İlhan Z., Aksakal A., Solmaz H., Ekin İ. H. (2009). Determination of Enterotoxin Types (LT, ST) of *Escherichia coli* Strains of Animal Origin. *YYU Vet Faculty Journal*, 20(2), 27-31.
- Gyles, C. L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of animal science*, 85(suppl\_13), E45-E62.
- Han, Y., Liu, M., Han, Y., Shi, N., Wang, Q., Cui, T., Yang, L., Zhang, X., Zhu, L., Qian, H., Jin, H., & Dong, C. (2022). Genetic and phylogenetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* from livestock in Jiangsu by using whole-genome sequencing. *Journal of applied microbiology*, 132(5), 3925–3936.
- Harel, J., & Martin, C. (1999). Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary research*, 30(2-3), 131–155.

- Hu, B., Yang, X., Liu, Q., Zhang, Y., Jiang, D., Jiao, H., Yang, Y., Xiong, Y., Bai, X., & Hou, P. (2022). High prevalence and pathogenic potential of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in raw mutton and beef in Shandong, China. *Current research in food science*, 5, 1596–1602. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.08.021>
- Hua, Y., Bai, X., Zhang, J., Jernberg, C., Chromek, M., Hansson, S., Frykman, A., Yang, X., Xiong, Y., Wan, C., & Matussek, A. (2020). Molecular characteristics of eae-positive clinical Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sweden. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 2562–2570.
- Hwang, S. B., Chelliah, R., Kang, J. E., Rubab, M., Banan-MwineDaliri, E., Elahi, F., & Oh, D. H. (2021). Role of Recent Therapeutic Applications and the Infection Strategies of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 614963. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.614963>
- İzgür M. (2006). Enterobakteri İnfeksiyonları (Enterobacteriaceae). In: Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar), Ed: Aydın N, Paracıkoğlu J. Ankara: *İlke Emek Yayınları*, Bölüm: 11.
- Jacewicz, M., Clausen, H., Nudelman, E., Donohue-Rolfe, A., & Keusch, G. T. (1986). Pathogenesis of shigella diarrhea. XI. Isolation of a shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide. *The Journal of experimental medicine*, 163(6), 1391–1404. <https://doi.org/10.1084/jem.163.6.1391>
- Jajarmi, M., Askari Badouei, M., Imani Fooladi, A. A., Ghanbarpour, R., & Ahmadi, A. (2018). Pathogenic potential of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of caprine origin: virulence genes, Shiga toxin subtypes, phylogenetic background and clonal relatedness. *BMC veterinary research*, 14(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1407-2>
- Jajarmi, M., Imani Fooladi, A. A., Badouei, M. A., & Ahmadi, A. (2017). Virulence genes, Shiga toxin subtypes, major O-serogroups, and phylogenetic background of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle in Iran. *Microbial pathogenesis*, 109, 274–279.
- Kaper, J. B., & O'Brien, A. D. (2014). Overview and Historical Perspectives. *Microbiology spectrum*, 2(6), 10. 1128/microbiolspec.EHEC-0028-2014.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Karch, H., Schmidt, H., & Brunder, W. (1998). Plasmid-encoded determinants of *Escherichia coli* O157: H7. *Escherichia coli O*, 157, 183-194.
- Kariyawasam, S., Johnson, T. J., & Nolan, L. K. (2006). The pap operon of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1: K1 is located on a novel pathogenicity island. *Infection and immunity*, 74(1), 744-749.
- Karmali M. A. (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 2(1), 15–38. <https://doi.org/10.1128/CMR.2.1.15>
- Karmali, M. A., Gannon, V., & Sargeant, J. M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary microbiology*, 140(3-4), 360-370.

- Karmali, M. A., Steele, B. T., Petric, M., & Lim, C. (1983). Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* (London, England), 1(8325), 619–620. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)91795-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(83)91795-6)
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bover-Cid, S., Chemaly, M., ... & Bolton, D. (2020). Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *Efsa Journal*, 18(1), e05967.
- Kudva I. T., Hatfield PG, Hovde CJ. (1996). *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J Clin Microbiol.* 34(2):431-433.
- Kudva, I. T., Hatfield, P. G., & Hovde, C. J. (1997). Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *Journal of clinical microbiology*, 35(4), 892–899. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.892-899.1997>
- Lindberg, A. A., Brown, J. E., Strömberg, N., Westling-Ryd, M., Schultz, J. E., & Karlsson, K. A. (1987). Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. *The Journal of biological chemistry*, 262(4), 1779–1785.
- Lingwood, C. A. (1996). Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends in microbiology*, 4(4), 147-153.
- Lingwood, C. A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J. L., De Grandis, S., & Karmali, M. (1987). Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 262(18), 8834–8839.
- Liu, Y., Li, H., Chen, X., Tong, P., Zhang, Y., Zhu, M., Su, Z., Yao, G., Li, G., & Cai, W. (2022). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from Cattle and Sheep in Xinjiang province, China, using whole-genome sequencing. *Transboundary and emerging diseases*, 69(2), 413–422.
- Lloyd, S. J., Ritchie, J. M., & Torres, A. G. (2012). Fimbriation and curliation in *Escherichia coli* O157:H7: a paradigm of intestinal and environmental colonization. *Gut microbes*, 3(3), 272–276. <https://doi.org/10.4161/gmic.20661>
- Ludwig, A., von Rhein, C., Bauer, S., Hüttinger, C., & Goebel, W. (2004). Molecular analysis of cytolysin A (ClyA) in pathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of bacteriology*, 186(16), 5311–5320. <https://doi.org/10.1128/JB.186.16.5311-5320.2004>
- Lupindu, A. M. (2017). Isolation and characterization of *Escherichia coli* from animals, humans, and environment. *Escherichia Coli-Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. London, United Kingdom: *IntechOpen Limited*, 187-206.
- Mainil J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary immunology and immunopathology*, 152(1-2), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.032>

- Majowicz, S. E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J. M., Stapleton, J., Angulo, F. J., ... & Kirk, M. D. (2014). Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne pathogens and disease*, 11(6), 447-455.
- Martin, A., & Beutin, L. (2011). Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *International journal of food microbiology*, 146(1), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.041>
- Martins, F. H., Guth, B. E., Piazza, R. M., Leão, S. C., Ludovico, A., Ludovico, M. S., Dahbi, G., Marzoa, J., Mora, A., Blanco, J., & Pelayo, J. S. (2015). Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Paraná State, southern Brazil. *Veterinary microbiology*, 175(1), 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.003>
- McCarthy, S. C., Macori, G., Duggan, G., Burgess, C. M., Fanning, S., & Duffy, G. (2021). Prevalence and Whole-Genome Sequence-Based Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from the Recto-Anal Junction of Slaughter-Age Irish Sheep. *Applied and environmental microbiology*, 87(24), e0138421.
- Melton-Celsa A. R. (2014). Shiga Toxin (*Stx*) Classification, Structure, and Function. *Microbiology spectrum*, 2(4), 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0024->
- Méric, G., Hitchings, M. D., Pascoe, B., & Sheppard, S. K. (2016). From *Escherichia coli* to the *Escherichia coli* genome. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(6), 634-636.
- Milon, A., Oswald, E., & De Rycke, J. (1999). Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary research*, 30(2-3), 203–219.
- Mody, R. K., Gu, W., Griffin, P. M., Jones, T. F., Rounds, J., Shiferaw, B., ... & Hoekstra, R. M. (2015). Postdiarrheal hemolytic uremic syndrome in United States children: clinical spectrum and predictors of in-hospital death. *The Journal of pediatrics*, 166(4), 1022-1029.
- Momtaz H, Safarpour Dehkordi F, Rahimi E, Ezadi H, Arab R. (2013). Incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in ruminant's meat. *Meat Sci.* 95(2), 381-388.
- Mora, A., Herrera, A., López, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J. M., Alonso, M. P., Llovo, J., Bernárdez, M. I., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2011). Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 14(3), 121–141. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.142>
- Moxley, R. A. (2013). Scientific Progress and the Future in Control of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (Power Point) (No. 1457-2016-120390).
- Mühlen, S., & Dersch, P. (2020). Treatment Strategies for Infections With Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 169. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00169>

- Nagy, B., & Fekete, P. Z. (1999). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Veterinary research*, 30(2-3), 259–284.
- Nakai, R., Nishijima, M., Tazato, N., Handa, Y., Karray, F., Sayadi, S., ... & Naganuma, T. (2014). *Oligoflexus tunisiensis* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, filamentous bacterium of a novel proteobacterial lineage, and description of Oligoflexaceae fam. nov., Oligoflexales ord. nov. and Oligoflexia classis nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt 10), 3353.
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142>
- Nataro, J. P., Kaper, J. B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P., & Levine, M. M. (1987a). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *The Pediatric infectious disease journal*, 6(9), 829–831. <https://doi.org/10.1097/00006454-198709000-00008>
- Nataro, J. P., Maher, K. O., Mackie, P., & Kaper, J. B. (1987b). Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 55(10), 2370–2377. <https://doi.org/10.1128/iai.55.10.2370-2377.1987>
- Newell, D. G., & La Ragione, R. M. (2018). Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies. *Transboundary and emerging diseases*, 65, 49-71.
- Obrig, T. G. (2010). *Escherichia coli* Shiga toxin mechanisms of action in renal disease. *Toxins*, 2(12), 2769-2794.
- Obrig, T. G., & Karpman, D. (2012). Shiga toxin pathogenesis: kidney complications and renal failure. *Ricin and Shiga Toxins: Pathogenesis, Immunity, Vaccines and Therapeutics*, 105-136.
- Ogden, I. D., MacRae, M., & Strachan, N. J. (2005). Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in sheep faeces at pasture in Scotland. *Journal of applied microbiology*, 98(3), 646–651. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02493.x>
- Omerovic, M., Müştak, H. K., & Kaya, İ. B. (2017). *Escherichia coli* Patotiplerinin Virülens Faktörleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 28(1), 1-6.
- Orth, D., Grif, K., Khan, A. B., Naim, A., Dierich, M. P., & Würzner, R. (2007): The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 59(3), 235–242.
- Oscarsson, J., Westermark, M., Beutin, L., & Uhlin, B. E. (2002). The bacteriophage-associated ehly1 and ehly2 determinants from *Escherichia coli* O26:H- strains do not encode enterohemolysins per se but cause release of the ClyA cytolysin. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 291(8), 625–631. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00176>

- Padhye, N. V., & Doyle, M. P. (1991). Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Applied and environmental microbiology*, 57(9), 2693–2698. <https://doi.org/10.1128/aem.57.9.2693-2698.1991>
- Padhye, N. V., & Doyle, M. P. (1992). *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, Pathogenesis, and Methods for Detection in Food. *Journal of food protection*, 55(7), 555–565. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-55.7.555>
- Pakbin, B., Akhondzadeh Basti, A., Khanjari, A., Azimi, L., & Karimi, A. (2020). Differentiation of *stx1a* gene for detection of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and Shigella dysenteriae type 1 in food samples using high resolution melting curve analysis. *Food science & nutrition*, 8(7), 3665–3672. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1649>
- Paton, A. W., & Paton, J. C. (2002). Direct detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. *Journal of clinical microbiology*, 40(1), 271–274. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.271-274.2002>
- Paton, A. W., Srimanote, P., Talbot, U. M., Wang, H., & Paton, J. C. (2004). A new family of potent AB (5) cytotoxins produced by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *The Journal of experimental medicine*, 200(1), 35–46. <https://doi.org/10.1084/jem.20040392>
- Paton, A. W., Srimanote, P., Woodrow, M. C., & Paton, J. C. (2001). Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infection and immunity*, 69(11), 6999–7009. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.6999-7009.2001>
- Paton, J. C., & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 450–479. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.3.450>
- Pickett, C. L., & Whitehouse, C. A. (1999). The cytolethal distending toxin family. *Trends in microbiology*, 7(7), 292–297. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(99\)01537-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01537-1)
- Prescott, L.M.; Harley & Klein. (2002). *Microbial Nutrition. Microbiology* 5th ed. page 101-110.
- Probert WS, McQuaid C, Schrader K. (2014). Isolation and identification of an *Enterobacter cloacae* strain producing a novel subtype of Shiga toxin type 1. *J Clin Microbiol.* 52(7), 2346-2351.
- Ross, B. N., Rojas-Lopez, M., Cieza, R. J., McWilliams, B. D., & Torres, A. G. (2015). The Role of Long Polar Fimbriae in *Escherichia coli* O104:H4 Adhesion and Colonization. *PloS one*, 10(10), e0141845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141845>
- Scheutz, F., & Strockbine, N. A. (2015). *Escherichia*. *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria*, 1-49.

- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N. A., Melton-Celsa, A. R., Sanchez, M., Persson, S., & O'Brien, A. D. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing *Stx* nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 2951–2963. <https://doi.org/10.1128/JCM.00860-12>
- Schüller, S. (2011). Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. *Toxins*, 3(6), 626-639.
- Sessler, K., Papatheodorou, P., Wondany, F., Krause, M., Noettger, S., Bernhard, D., Michaelis, J., Schmidt, H., & Barth, H. (2021). The enzyme subunit SubA of Shiga toxin-producing *E. coli* strains demonstrates comparable intracellular transport and cytotoxic activity as the holotoxin SubAB in HeLa and HCT116 cells in vitro. *Archives of toxicology*, 95(3), 975–983. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02965-2>
- Shen, J., Zhi, S., Guo, D., Jiang, Y., Xu, X., Zhao, L., & Lv, J. (2022). Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Whole Genome Sequencing Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Imported Foods in China during 2015-2021. *Toxins*, 14(2), 68.
- Skinner, C., McMahon, S., Rasooly, R., Carter, J. M., & He, X. (2013). Purification and characterization of Shiga toxin 2f, an immunologically unrelated subtype of Shiga toxin 2. *PloS one*, 8(3), e59760.
- Skinner, C., Patfield, S., Stanker, L. H., Fratamico, P., & He, X. (2014). New high-affinity monoclonal antibodies against Shiga toxin 1 facilitate the detection of hybrid *Stx1/Stx2* in vivo. *PloS one*, 9(6), e99854.
- Smith, H. W., & Huggins, M. B. (1983). Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *Journal of general microbiology*, 129(8), 2659–2675. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-8-2659>
- Stein, P. E., Boodhoo, A., Tyrrell, G. J., Brunton, J. L., & Read, R. J. (1992). Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. *Nature*, 355(6362), 748–750. <https://doi.org/10.1038/355748a0>
- Strockbine, N. A., Jackson, M. P., Sung, L. M., Holmes, R. K., & O'Brien, A. D. (1988). Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *Journal of bacteriology*, 170(3), 1116–1122. <https://doi.org/10.1128/jb.170.3.1116-1122.1988>
- Tarr, G. A., Oltean, H. N., Phipps, A. I., Rabinowitz, P., & Tarr, P. I. (2018). Strength of the association between antibiotic use and hemolytic uremic syndrome following *Escherichia coli* O157: H7 infection varies with case definition. *International Journal of Medical Microbiology*, 308(7), 921-926.
- Torres, A. G., Zhou, X., & Kaper, J. B. (2005). Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infection and immunity*, 73(1), 18–29. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.18-29.2005>



- Trofa, A. F., Ueno-Olsen, H., Oiwa, R., & Yoshikawa, M. (1999). Dr. Kiyoshi Shiga: discoverer of the dysentery bacillus. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 29(5), 1303–1306. <https://doi.org/10.1086/313437>
- Türütoğlu, H., Öztürk, D., Güler, L., & Pehlivanoglu, F. (2007): Presence and characteristics of sorbitol-negative *Escherichia coli* O157 in healthy sheep faeces. *Veterinari Medicina*, 52(7), 301–307
- Url1:<https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Piyasalar%C4%B1/2021Ocak%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Raporu/K%C3%BC%C3%A7%C3%BCkba%C5%9%20Eti,%20Ocak%202021,Tar%C4%B1m%20%C3%BCr%C3%BCnleri%20Piyas%20Raporu.pdf> <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/E.T:8> Mayıs 2021.
- Vanessa, S., & Carlyn, J. H. (2015). Enteroherrhagic *E. coli* and Other Shiga Toxin–Producing. *E. coli*, 23.
- Vettorato MP, Leomil L, Guth BE, Irino K, Pestana de Castro AF. (2003) Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of São Paulo, Brazil. *Vet Microbiol.* 95(1-2), 103-109.
- Walker, CE (2008). Besi sığırlarında *Escherichia coli* O157: H7: kesimde bağırsak içeriği prevalansı ve deneysel olarak aşılınmış sığırlarda yemdeki neomisin takviyesinin dışkı dökülmesine etkisi (Doktora tezi, Kansas Eyalet Üniversitesi).
- Wasteson, Y. (2002). Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43(1), 1-6.
- Weinstein, D. L., Jackson, M. P., Perera, L. P., Holmes, R. K., & O'Brien, A. D. (1989). In vivo formation of hybrid toxins comprising Shiga toxin and the Shiga-like toxins and role of the B subunit in localization and cytotoxic activity. *Infection and immunity*, 57(12), 3743–3750. <https://doi.org/10.1128/iai.57.12.3743-3750.1989>
- Williams, KP and Kelly, DP (2013). A new class proposal within the Phylum Proteobacteria, Acidithiobacillales classis nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63 (Pt\_8), 2901-2906.
- Yang, X., Bai, X., Zhang, J., Sun, H., Fu, S., Fan, R., ... & Xiong, Y. (2020). *Escherichia coli* strains producing a novel Shiga toxin 2 subtype circulate in China. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(1), 151377.
- Yang, X., Liu, Q., Bai, X., Hu, B., Jiang, D., Jiao, H., Lu, L., Fan, R., Hou, P., Matussek, A., & Xiong, Y. (2022). High Prevalence and Persistence of *Escherichia coli* Strains Producing Shiga Toxin Subtype 2k in Goat Herds. *Microbiology spectrum*, 10(4), e0157122.
- Yang, X., Liu, Q., Sun, H., Xiong, Y., Matussek, A., & Bai, X. (2022). Genomic Characterization of *Escherichia coli* O8 Strains Producing Shiga Toxin 2l Subtype. *Microorganisms*, 10(6), 1245.

- Zumbrun, S. D., Hanson, L., Sinclair, J. F., Freedy, J., Melton-Celsa, A. R., Rodriguez-Canales, J., Hanson, J. C., & O'Brien, A. D. (2010). Human intestinal tissue and cultured colonic cells contain globotriaosylceramide synthase mRNA and the alternate Shiga toxin receptor globotetraosylceramide. *Infection and immunity*, 78(11), 4488–4499. <https://doi.org/10.1128/IAI.00620-10>
- Zweifel, C., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., & Stephan, R. (2004). Serotypes and virulence genes of ovine non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Switzerland. *International journal of food microbiology*, 95(1), 19–27.

