

2016

YÜKSEK LİSANS

MİKROBİYOLOJİ

İHSAN BARIŞ AŞCI



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
MİK-2016-0009

**BUZAĞI İSHALLERİNDE ROL OYNAYAN
ENTEROTOKSİJENİK *ESCHERICHIA COLI*
TÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

İHSAN BARIŞ AŞCI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

AYDIN-2016

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**BUZAĞI İSHALLERİNDE ROL OYNAYAN
ENTEROTOKSİJENİK *ESCHERICHIA COLI* TÜRLERİNİN
ARAŞTIRILMASI VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ
BELİRLENMESİ**

**İHSAN BARIŞ AŞCI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN**

Bu Yüksek Lisans Tezi Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-15065 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde İhsan Barış AŞCI tarafından hazırlanan “BUZAĞI İSHALLERİNDE ROL OYNAYAN ENTEROTOKSİJENİK *ESCHERICHIA COLI* TÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16/12/2016

Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

ADÜ

Üye : Prof. Dr. Serkan İKİZ

İÜ

Üye : Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

ADÜ

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başlamamda büyük emekleri olan değerli hocam Prof. Dr. Osman KAYA'ya, Yüksek lisans eğitimim sırasında harcadıkları tüm emekler ve analitik düşünmemi sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, tüm Mikrobiyoloji ABD öğretim üyelerine, beni akademik çizgide tutan, diyaloglarımızı dahi bir olgu tartışmasına dönüştürerek, akademik dünyaya olan hevesimi dinç tutan, bu tezin oluşmasının her aşamasında bilgisini ve desteğini esirgemeyen kadim dostum Prof. Dr. Kerem URAL 'a, tez yazım aşamasında bana destek olan Veteriner Hekim Canberk BALIKÇI' ya, bana kattıkları tüm meziyetlerden dolayı hayatıma özel dokunuşlar sergilemiş meslek büyüğüm Veteriner Hekim Ufuk SAYIN'a, bana desteğini esirgemeyen kardeşim Vet. Sağ. Tekn. Erhan UNUK'a ve Mikrobiyoloji laboratuvarında birlikte çalışıp birlikte öğrendiğimiz tüm yüksek lisans ve doktora öğrencilerine çok teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren ve her zaman varlıklarıyla kendimi güçlü hissetmemi sağlayan canım aileme ve hayatıma girdiği andan itibaren tüm güçlükleri sihirli bir şekilde hafifleten, bana desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Gül AŞCI' ya ve bana güç veren oğlum Emre AŞCI'ya çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Enterobacteriaceae Familyasındaki Etkenlerin Yol Açtığı Enfeksiyonlar	3
2.2. <i>E. coli</i> Kaynaklı Enfeksiyonlarda Etiyoloji	4
2.3. <i>E. coli</i> Antijenleri	7
2.3.1. Somatik "O" Antijenleri	7
2.3.2. Flagellar "H" Antijenleri	8
2.3.3. Kapsüler "K" Antijenleri	8
2.3.4. Fimbrial (Pilus) Antijenleri	8
2.4. <i>E.coli</i> Toksinleri	9
2.4.1. Enterotoksinler	9
2.4.1.1. Stabil Toksin (ST)	9
2.4.1.2. Labil Toksin (LT)	10
2.4.2. Nörotoksinler	11
2.4.3. Endotoksinler	11
2.4.4. Sitoksik Nekrozan Faktör (CNF)	11
2.5. Buzağı ishalleri ve Kolibasillozisler	12
2.6. Etiyoloji	17
2.7. Epidemiyoloji	18
2.8. Patogenez	18
2.9. Klinik Belirtiler	19
2.10. Teşhis	20
2.10.1. Klinik Teşhis	20

2.10.2. Nekropsi Bulguları	20
2.10.3. Laboratuvar Muayeneleri	20
2.11. Tedavi	21
2.12. Koruma	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1. Gereç	24
3.1.1. İzolasyon Örnekleri	24
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Ayıraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskleri	29
3.1.2.1. Besiyerleri	29
3.1.2.1.1. İzolasyon Besiyerleri	29
3.1.2.1.1.1. Kanlı Agar Base (Merck 1.10886)	29
3.1.2.1.1.2. Modifiye Tryptic Soy Broth	29
3.1.2.1.2. İdentifikasyon Besiyerleri	30
3.1.2.1.2.1. Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar (Difco 279100) ve CT SMAC Agar Katkısı (Merck 1.09202)	30
3.1.2.1.2.2. Eozin - Metilen Blue (EMB) Agar	30
3.1.2.1.2.3. Lassen'in 3'lü Tüp besiyerleri	31
3.1.2.1.3. Antibiyogram Besiyeri	32
3.1.2.1.3.1 Mueller-Hinton Agar	32
3.1.2.1.4. Antibiyotik Diskleri	32
3.1.2.2. Ayıraçlar	32
3.1.2.2.1. İndol Ayracı	32
3.1.2.3. Solusyonlar	33
3.1.2.3.1. EDTA (0,5 M)	33
3.1.2.3.2. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer	33
3.1.2.3.3. Gel Loading Buffer (6X)	33
3.1.2.3.4. Tris (1M)	33
3.1.2.3.5. 1M NaCl	34
3.1.2.3.6. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA)	34
3.1.2.4. Boyalar	34
3.1.3. PCR	34
3.1.3.1. Kullanılan Cihazlar	34
3.1.3.2. MgCl ₂ , Taq DNA Polimeraz, 10XTaq Buffer, dNTP Set	34
3.1.3.3. Primerler	34

3.1.4. Elektroforez	35
3.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı	35
3.1.4.2. Marker	35
3.1.4.3. Etidium Bromür	35
3.1.4.4. Standart Suş	36
3.2. Yöntem	36
3.2.1. <i>E.coli</i> İzolasyonu	36
3.2.1.1. Fenotipik İdentifikasyonu	36
3.2.1.1.1. Sefiksim-Tellürit Katkılı SorbitolMacConkey Agarda Üreme	36
3.2.1.1.2. Eozin - Metilen Blue (EMB) Agarda Üreme	37
3.2.1.1.3. Biyokimyasal Testler	37
3.2.1.1.3.1. Oksidaz Testi	37
3.2.1.1.3.2. Nitrat Test	37
3.2.1.2. Genotipik İdentifikasyon	37
3.2.1.2.1. PCR	38
3.2.1.2.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi	39
3.2.1.2.3. Jelde Yürütme	40
3.2.1.2.4. Görüntüleme ve Değerlendirme	40
3.2.2. Antibiyogram	40
4. BULGULAR	41
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	41
4.2. PCR Bulguları	41
4.3. Antibiyogram Bulguları	43
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. a) *E. coli* grupları ve ilişki patotipleri b) Patojenik *E. coli*'lerin patotip ve alttıpleri7



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. <i>E. coli</i> ’nin elektron mikroskopik görünümü	4
Resim 2. <i>E. coli</i> ’nin mikroskopik görünümü	4
Resim 3. Tavşanda lup testi	11
Resim 4. Farklı <i>E. coli</i> suşlarına ait hücresel mekanizmalar	19
Resim 5. <i>E. coli</i> ’nin EMB agarda makroskopik morfolojisi	21
Resim 6. Örnekleme yapılan Holştayn ırkı bir buzağı	24
Resim 7. Buzağuların rektumundan tekniğine uygun bir şekilde taşıma solusyonlu svaplara örneklerin alınması	25
Resim 8. <i>E. coli</i> suşlarına ait (a) EMB ve (b) Mac Conkey besiyeri görüntüleri	41
Resim 9. <i>E. coli</i> uidA spesifik gen için yapılan PCR sonuçları	42
Resim 10. ETEC est1B spesifik gen için yapılan PCR sonuçları	42
Resim 11. <i>E. coli</i> suşlarının antibiyogram görüntüsü	43

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>Enterobacteriaceae</i> familyasındaki genuslar	3
Tablo 2. Buzağlarda diyare ile seyreden enfeksiyöz hastalıklar	14
Tablo 3. Örnek alınan buzağlara ait bilgiler	26
Tablo 4. PCR’da kullanılan oligonükleotid dizileri	35
Tablo 5. <i>E. coli</i> uidA geni için mastermiks hazırlanma oranları	38
Tablo 6. ETEC est1B geni için mastermiks hazırlanma oranları	39
Tablo 7. PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı	39
Tablo 8. Örneklerde bulunan toplam bakteri sayısı	41
Tablo 9. Gen saptanmasına göre tanımlı edilen suşlar	42
Tablo 10. Kullanılan antibiyotiklerin zon çaplarının değerlendirilmesi	44
Tablo 11. Elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılık oranları	44

ÖZET

BUZAĞI İSHALLERİNDE ROL OYNAYAN ENTEROTOKSİJENİK *ESCHERICHIA COLI* TÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

Aşçı İB. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2016.

Araştırmamızda Aydın ili, buzağı işletmelerinde bulunan ishal gibi klinik bulguları mevcut olan buzağılardan enterotoksijenik *Escherichia coli* identifikasyonunun fenotipik ve genotipik yöntemlerle tespiti, izole edilen suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlandı. Araştırma materyalini Eylül-Aralık 2015 tarihleri arasında, Aydın ili ve çevresinde bulunan sığır işletmelerinde bulunan ishal semptomu gözlenen 50 adet buzağı oluşturmuştur. İshalli buzağılardan alınan toplam 50 adet dışkı svabı soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına getirilmiştir. Svap örneklerinden fenotipik yöntemlerle *E. coli* identifikasyonları yapılmıştır. *E. coli* olarak identifiye edilen izolatlar genotipik olarak PCR ile doğrulanmış ve enterotoksijenik *E. coli* varlığı da PCR ile araştırılmıştır. Araştırmanın son aşamasında identifiye edilen *E. coli* suşlarının disk difüzyon yöntemi ile antibiyogramları yapılmıştır. İncelenen 50 adet rektal svap örneğinin 47 (% 94) adedinden *E. coli* izolasyon ve identifikasyonu gerçekleştirildi. *E. coli* spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonrasında incelenen toplam 47 *E. coli* izolatının hepsi (% 100) uidA geni açısından pozitif olarak saptanmıştır. Moleküler olarak doğrulanan *E. coli* suşları, ETEC spesifik est1B gen varlığı açısından araştırıldığında sadece 1 (% 2) adet suş enterotoksijenik *E. coli* olarak saptanmıştır. Antibiyogram testleri sonucunda *E.coli* izolatlarının Gentamisin'e % 89, Sefoperazon'a % 61, Amoksisilin- Klavulanik asit'e % 51, Danofloksasin'e % 44, Enrofloksasin'e % 42 oranlarında duyarlı ve Penisilin G'ye ve Eritromisin'e % 100, Tetrasiklin'e ve Trimetoprim-Sulfometoksazol'e % 80, Kanamisin'e ise % 76.5 oranlarına dirençli olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak araştırmamızda ishalleri buzağılardan alınan rektal svap örneklerinden fenotipik ve genotipik yöntemlerle % 94 oranında *E. coli* ve bu izolatların % 2'sinden ETEC identifiye edilmiştir. *E. coli* izolatların antibiyogram testleri sonucunda çoklu antibiyotik direnci geliştiği gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, buzağı ishali, identifikasyon, PCR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* SPECIES WHICH TAKE ROLE IN CALF DIARRHEA AND DETECTION OF THEIR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY

Aşçı İB. Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Microbiology Programme, MSc Thesis, Aydın, 2016.

The scope of this study was determination of enterotoxigenic *Escherichia coli* identification by detection of phenotypic and genotypic methods and determination of antibiotic susceptibilities of isolated strains from animals which had clinical findings such as diarrhea in Aydın province. Between September-December 2015, 50 calves with diarrhea symptoms were found in cattle farms in and around Aydın province. A total of 50 stool swabs taken from diarrheal calves were brought to the laboratory of the Department of Microbiology and Microbiology at the Adnan Menderes University Veterinary Faculty under the cold chain. Identification of *E. coli* was carried out by phenotypic methods from swab samples. The isolates identified as *E. coli* were genotypically confirmed by PCR and the presence of enterotoxigenic *E. coli* was also investigated by PCR. Antibigrams of *E. coli* strains identified in the last phase of the study were made by disk diffusion method. Isolation and identification of *E. coli* from 47 (94%) of 50 rectal swab samples examined. A total of 47 *E. coli* isolates (100%) examined after PCR using *E. coli* specific primers were found to be positive for uidA gene. Molecularly confirmed *E. coli* strains were identified as only 1 (2%) strains of enterotoxigenic *E. coli* when examined for the presence of ETEC-specific est1B gene. Antibigram tests revealed that *E. coli* isolates were sensitive to 89% for Gentamycin, 61% for Cefoperazone, 51% for Amoxicillin-Clavulanic Acid, 44% for Danofloxacin, 42% for Enrofloxacin and Penicillin G and Erythromycin 100%, tetracycline and trimethoprim-sulfomethoxazole to 80% and Kanamycin to 76.5%.

As a result, 94% of *E. coli* and 2% of these isolates were identified by phenotypic and genotypic methods from rectal swab samples taken from diarrheal calves in our study. In conclusion of antibiogram tests of *E. coli* isolates, multiple antibiotic resistance development was observed.

Keywords: *Escherichia coli*, calf diarrhea, identifikasyon, PCR

1. GİRİŞ

Halk arasında “Buzağı İshalleri” veya “Buzağı Septisemisi” olarak bilinen Kolibasillozis hastalığına buzağılarda doğumdan sonraki 2-10 gün arasında rastlanmaktadır. Her ülke ve işletmede rastlanabilen hastalığa *Escherichia coli* bakterisi neden olur. Bu etken çevrede ve sağlam hayvanların bağırsaklarında her zaman bol miktarda bulunmaktadır. Hastalık daha çok uygunsuz bakım ve beslenme koşulları nedeniyle direnci azalan buzağılarda ortaya çıkmaktadır. Direnci azalan buzağı, bu etkeni solunum, ağız veya göbek kordonu yoluyla alır ve hastalığa yakalamaktadır (Argenzio, 1985; Radostits ve ark, 1999).

Buzağı ishallerinde immunolojik direncini azaltan nedenler aşağıda sıralanmış ve bu nedenler;

1. Ahırın temiz olmaması,
 2. Ahırın rutubetli, çok sıcak ya da soğuk olması,
 3. Buzağının ağız sütünü içmemesi,
 4. Buzağılara içirilen süt miktarının çok fazla olması,
 5. İçirilen sütlerin soğuk ya da bozuk olması,
 6. Güç doğum,
 7. Yeni doğan buzağılarla, yetişkinlerin birarada tutulması,
 8. Mevsim durumu (Özellikle kış sonları ve ilkbahar başları)
- olmak üzere sınıflandırılabilir.

Kolibasilloz hastalığına yakalanan buzağılarda durgunluk, analarını emmede isteksizlik, vücut ısılarında düşüş, sarı-beyazımsı ve kokusuz bir ishal görülür. Hasta buzağının kuyruk kısımlarında sulu ishal semptomları görülmektedir. Hastalığın teşhisinde, doğumdan sonraki 3-5 gün içinde ortaya çıkan ishal olaylarına Buzağı Septisemisi (Kolibasillozis) denilebilmektedir. Ancak, diğer etkenlerden ileri gelen ishallerle karışmaması için laboratuvar teşhisine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla, ölen yavru buzağı mümkünse putrifikasyona uğramadan laboratuvara gönderilmesi gerekmektedir. Bazı hasta buzağılar, 5-10 gün içerisinde iyileşmektedir. Bazıları ise, birden ağırlaşmakta ve en geç 6 saat içerisinde ölmektedir. *E. coli* etkeninin yerleşik olduğu ahırlarda her yıl hastalık çıkmaktadır (Radostits ve ark, 1999).

Dünya genelinde yaygın olarak görülen bakteriyolojik kaynaklı sindirim sistemi hastalıkları gerek insan sağlığı gerekse hayvan sağlığını olumsuz yönde etkileyen halen önemli bir sağlık sorunudur. Bakteriyolojik kaynaklı hastalıklar Veteriner Hekimlikte

ekonomik kayba neden olmaları, ölüm ile seyreden klinik tablo meydana getirebilmeleri bununla birlikte zoonoz olmaları açısından önemli yer tutmaktadır.

Araştırmamızda buzağı ishallerinin önemli etmenlerinden biri olan enterotoksijenik *E. coli* etkeninin ishalleri buzağılarda fenotipik ve genotipik metotlarla ortaya konulması ve antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda en etkin antimikrobiyel ilaçların tespit edilmesi ile buzağı yetiştiriciliğinde önemli rol oynayan tedavi masraflarının minimum seviyede tutulması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enterobacteriaceae Familyasındaki Etkenlerin Yol Açtığı Enfeksiyonlar

Enterobacteriaceae familyasında yer almakta olan ajanlar, oksidaz negatif ve fermentatif bakteriler olarak bilinmekte ve bu etkenler özellikleri kesin olarak belirlenen 41 genus altında incelendiği bilinmektedir (Tablo 1) (Erdoğan ve ark, 2003).

Tablo 1. Enterobacteriaceae familyasındaki genuslar

Enterobacteriaceae Familyası	
Genus	Genus
1-Enterobacter	22-Obesumbacterium
2-Alterococcus	23-Pantoea
3-Arsenophonus	24-Pectobacterium
4-Brenneria	25-Photobacterium
5-Buchnera	26-Plesiomonas
6-Budvicia	27-Pragia
7-Buttiauxella	28-Proteus
8-Calymmatobacterium	29-Providencia
9-Cedecea	30-Rahnella
10-Citrobacter	31-Saccharobacter
11-Edwardsiella	32-Salmonella
12-Erwinia	33-Serratia
13-Escherichia	34-Shigella
14-Ewingella	35-Sodalis
15-Hafnia	36-Tatumella
16-Klebsiella	37-Trabulsiella
17-Kluyvera	38-Wigglesworthia
18-Leclercia	39-Xenorhabdus
19-Leminorella	40-Yersinia
20-Moellerella	41-Yokenella
21-Morganella	

Enterobakteriler 3 ana bölüm altında sınıflandırılmaktadır.

1- Esas Patojenler: *E. coli*, *Yersinia* sp. ve *Salmonella* sp. türlerine ait serotipler

2- Fırsatçı Patojenler

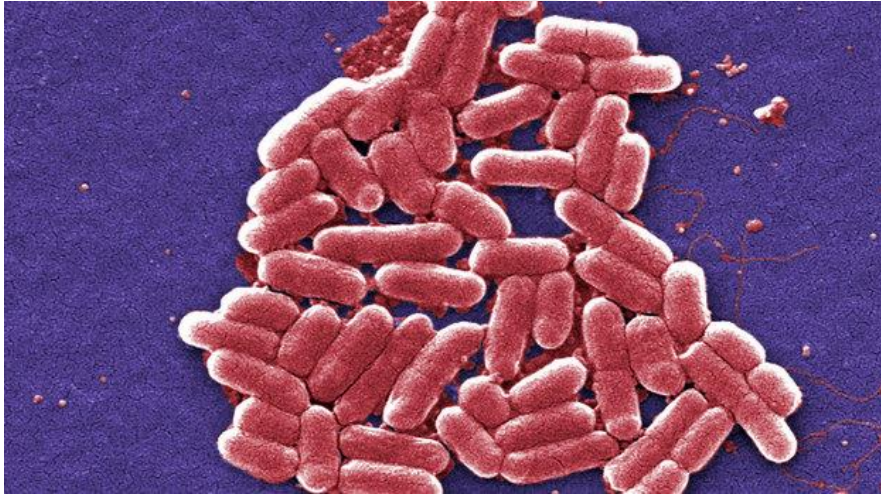
3- Patojen Olmayanlar: İnsan ve hayvanlarda klinik belirti oluşturmayan dışkıdan ve çevreden izole edilen türler olduğu bilinmektedir.

Enterobacteriaceae familyasındaki mikroorganizmaların ortak özellikleri; Gram negatif, çomak tarzında, sporsuz olmaları, aerobik veya fakültatif anaerobik üreme özelliğine sahip olmalarıdır. Ayrıca bu etkenler rutin laboratuvar besi yerlerinde kolaylıkla

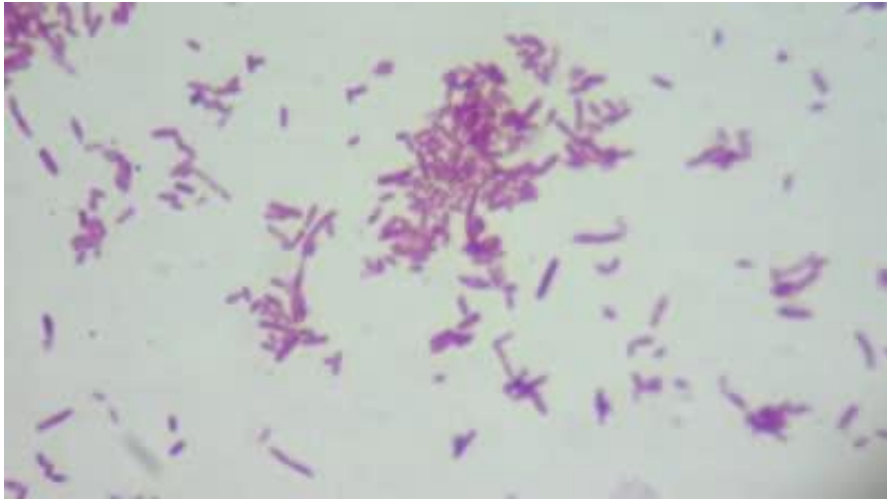
üreyebilmektedir. Genellikle hareketli olan bu etkenler arasında hareketsiz olanlara da rastlanılmakta olup (Örneğin: *Salmonella Gallinarum* ve *Salmonella Pullorum*) yine bu etkenler katalaz pozitif ve genellikle nitratları nitritlere redükte etme özelliğine sahip olduğu bilinmektedir (İzgür, 2006).

2.2. *E. coli* Kaynaklı Enfeksiyonlarda Etiyoloji

Uzun yıllar *Escherichia* cinsinde tek bir tür, *E. coli* olarak bilinirken bu türe *E. vulneris*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* eklenmiştir. Bunlardan *E. vulneris* ise özellikle sularda bulunduğu ve balık patojeni olabileceği hakkında bildirimler vardır (İzgür, 2006). Gram negatif, 1.1-1.5x2.0-6.0 mikron boyutlarında, çomak şeklinde olan *E. coli*, Enterobacteriaceae familyası içinde yer alan *Escherichia* genusunun en önemli bir türü olarak bilinmektedir (Resim 1, Resim 2).



Resim 1. *E. coli*'nin elektron mikroskopik görünümü (Anonim 1)



Resim 2. *E. coli*'nin mikroskopik görünümü (Anonim 2)

Peritrik flagellaya sahip olması nedeniyle hareketli olan *E. coli*, fakültatif anaerobik özelliktedir. Hareketsiz olan suşları da vardır. *E. coli* nutrient agar ve kanlı agar, enterobakteriler için bazı selektif ve diferensiyel besi yerlerinde (Mac Conkey agar, EMB agar vs) 37 °C'de 24 saatte gözle görülebilmekte ve S tipli koloniler meydana getirmektedir. *E. coli*'nin bazı suşları kanlı agarda hemoliz oluşturmaktadır. *E. coli* laktozu ayrıştırdığı için Mac Conkey agarda pembe renkli, EMB'de ise metalik refle görünümünde koloniler meydana getirmektedir. Nutrient buyyonda, 24 saatte 37 °C'de bulanıklık yaparak üremektedir. *E. coli* genellikle, bazı karbonhidratları (laktoz, mannitol, glukoz) asit ve gaz oluşturarak fermente etmektedir. İndol ve Metil Red (MR) testleri pozitifdir olmaktadır. Üre, H₂S ve Voges Proskauer (VP) testlerinde genellikle negatif olan *E. coli*, sitrattan da yararlanılamamaktadır. Ayrıca, oksidaz negatif olan *E. coli*, nitratları nitritlere redükte etme özelliğine de sahip, *E. coli*'nin antijenik yapısı oldukça komplike olmakta ve özellikle patojen suşlarda bu yapılar önem taşımaktadır (İzgür, 2006).

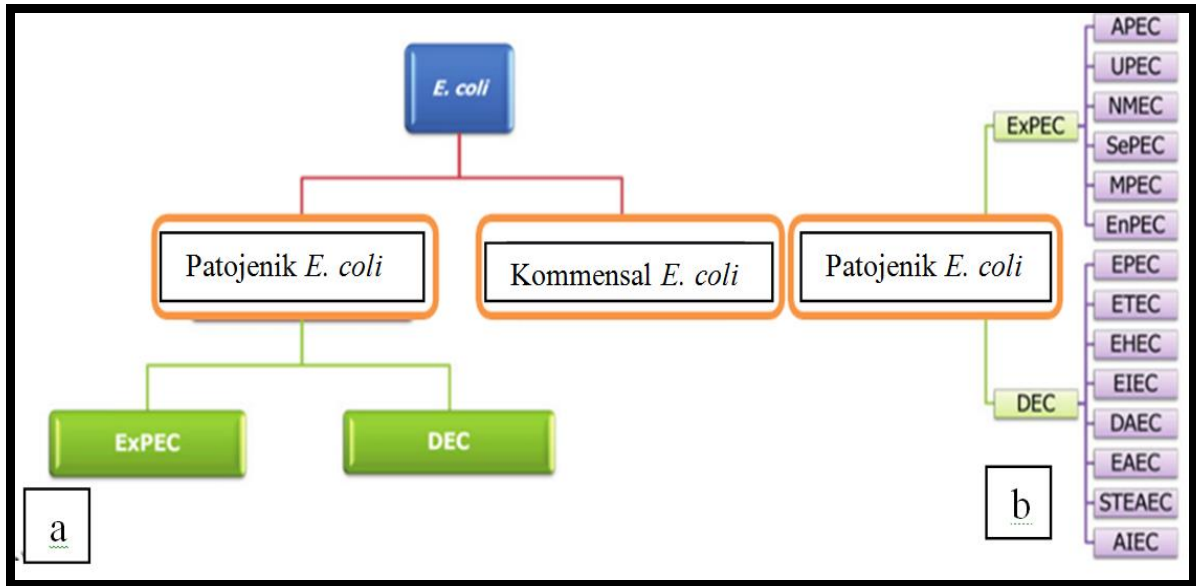
E. coli memeli ve kanatlıların normal barsak florasında bulunan, Gram negatif, çomak şeklinde çoğunlukla hareketli, aerobik/fakültatif anaerobik üreyen bir mikroorganizma olduğu bilinmektedir. Patojen olmayan suşlar genellikle enfeksiyona sebep olmazken, patojen suşlar ciddi enfeksiyonlara sebep olabilirler. Enterotoksijenik suşlar insanlarda gastroenteritis ve seyahat diyarelerine, hayvanlarda ise ürogenital sistem enfeksiyonları, kolibasillosis ve koliseptisemilerine neden olmaktadır (DeRoy ve Maddox, 2001; Blanco ve ark, 2006). İnsanlara patojen suşların bulaştırılmasında çoğunlukla sığır ve koyun gibi evcil hayvanlar, martı gibi yabani kanatlılar önemli rol oynamakta olduğu bilinmektedir (Boynukara ve ark, 2002; Hossain ve ark, 2008; Gülhan ve ark, 2009; Rajkhowa ve ark, 2009). Etken, insanlara çeşitli evcil ve yabani hayvanların dışkıları ile direkt temas veya kontamine gıdaların (iyi pişirilmemiş et ve pastörize edilmemiş süt ürünleri) tüketilmesi sonucu bulaşabilmektedir. Hastalıklı veya taşıyıcı hayvanlarla temas halindeki insanlar muhtemel risk altında olduğundan dolayı özellikle sağlıklı hayvanlarda patojen etkenlerin önceden belirlenmesi ve tedavi edilmesi oldukça önemlidir (Boynukara ve ark, 2004; Morato ve ark, 2008; Rajkhowa ve ark, 2009).

E. coli suşlarında patojeniteyi belirleyen önemli özelliklerden birisi enterotoksin sentezi olduğu bilinmektedir. ETEC'ler, 60 °C'de 30 dk'da inaktive olan labil toksin (LT) ve 100 °C'ye 15 dk dirençli olan stabil toksin (ST) olmak üzere başlıca iki tip enterotoksin sentezlemekte ve enterotoksin tipi hayvan türlerine göre farklılık göstermektedir. LT daha çok buzağı ve sığır orijinli suşlarda sentezlenirken; ST sentezi ise türlere göre değişkenlik

gösterdiği bildirilmiştir (DebRoy ve Maddox, 2001; Rigobelo ve ark, 2006; Hossain ve ark, 2008).

İnsan ve hayvan orijinli suşların çoğunda plazmidlerce kodlanan LT; *Vibrio cholerae* suşları tarafından üretilen kolera toksinine (CT) yapısal, antijenik ve aktivite bakımından benzemekte olup LT, LT-I ve LT-II olmak üzere iki alt tipe ayrılmaktadır. Bu toksin barsak villus epitel hücrelerinde siklik adenosin monofosfat artışı ile klor salınımını uyararak, sodyum klorür emilimini engellemekte olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, kript hücrelerinde sodyum sekresyonu artarak, klor ve su kaybı oluşmakta ve ayrıca ince barsakların lumenine sıvı ve elektrolit akışı sonucu şiddetli ishaller meydana gelmektedir. ST, LT'e göre düşük molekül ağırlığına sahiptir ve immunojenitesi daha zayıftır. ST, STA (ST-I) ve STB (ST-II) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadır. STA'nın tespitinde infantil fare testi (İFT), STB'nin belirlenmesinde ise domuz barsak ligatür testi en yaygın kullanılan yöntemler olarak bilinmektedir. STA, siklik guanozin monofosfat seviyelerinde artışa neden olarak guanilat siklazı aktive etmektedir. STA'nın; LT, adheziv faktörler ve antibiyotiklere dirençlilik gibi farklı kombinasyonları içeren genleri taşıyan plazmidlerce kodlandığı bildirilmiştir. (Erganiş ve ark, 1989; Majali ve ark, 2000; Hossain ve ark, 2008).

E. coli iki önemli gruba ayrılır: Kommensal ve Patojenik. Gastrointestinal hastalıkların bulaştırılmasından sorumlu olan patojenik grup da iki alt grupta incelenir: Ekstraintestinal Patojenik (ExPEC) ve Diyarejenik *E. coli* (DEC). ExPEC altı alt patotipe ayrılmıştır: Üropatojenik *E. coli* (UPEC), yenidoğan menejitisi ile ilgili *E. coli* (NMEC), kanatlı patojenik *E. coli* (APEC), sepsisle ilgili patojenik *E. coli* (SePEC), meme patojenik *E. coli* (MPEC) ve endometrial patojenik *E. coli* (EnPEC). DEC'nin sekiz alt patotipi bulunmaktadır: Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), Diffüzaderant *E. coli* (DAEC) ve Enteroagregatif *E. coli* (EAEC). Son yıllarda iki yeni alt patotip varlığı bildirilmiştir: Aderantinvasiv *E. coli* (AIEC) ve Shigatoksijenik Enteroagregatif *E. coli* (STEAEC) (Clements ve ark. 2012) (Şekil 1).



Şekil 1. a) *E. coli* grupları ve ilişki patotipleri b) Patojenik *E. coli*'lerin patotip ve alttipleri

Enterotoksijenik *E. coli* suşları, sentezledikleri enterotoksinlerle özellikle genç hayvanlarda şiddetli ishallere neden olabildiği bildirilmiştir (DebRoy ve Maddox, 2001). Enterik enfeksiyonlardan izole edilen suşların, enterotoksijenik karakterleri enzim immunoassay (EIA), pasif hemaglutinasyon (PA), çeşitli lateks aglutinasyon testleri, farklı hayvanlarda barsak ligatür (lup) testleri, infantil fare testi (İFT), Vero, HeLa ve Y1 hücre kültürleri, tavşan vasküler permeabilite testi, DNA prob tekniği, Radio İmmuno Assay (RIA), immunoblot ve farklı PCR teknikleri ile ortaya konabildiği çeşitli araştırmalarla belirlenmiştir (Scotland ve ark, 1989; Blanco ve ark, 1997; Güler ve ark, 2008; Hossain ve ark, 2008). Enterotoksin tiplerinin saptanmasında genellikle çabuk sonuç veren ve güvenilirliği yüksek olan lateks aglutinasyon testleri (Scotland ve ark, 1989; Carroll ve ark, 1990) ve farklı ELISA teknikleri (Mills ve Tietze, 1984; Carroll ve ark, 1990; Urban ve ark, 1990; Salvadori ve ark, 2003) kullanılmaktadır.

2.3. *E. coli* Antijenleri

2.3.1. Somatik "O" Antijenleri

Bu antijenler lipopolisakkarit özelliğinde olup, ısıya dirençli yüzey antijenleridir. *E. coli*'lerin serogruplandırılmasında (yaklaşık 160'dan fazla) önem taşırlar ve aglutinasyon testi (makro veya mikro) ile ortaya konulabildiği bilinmektedir. Fakat kapsüller ve fimbrial

antijenlere sahip *E. coli*'lerde, somatik antijenlerin ortaya konulması güçlük yarattığı bilinmektedir. Bu nedenle bu tür suşların 120 °C'de 2 saat ısıtıldıktan sonra aglütinasyona tabi tutulmasında yarar olduğu bildirilmektedir (İzgür, 2006).

2.3.2. Flagellar "H" Antijenleri

Hareketli suşlarda bulunan, protein yapısında, ısıya dayanıksız bu antijenler de aglütinasyonla ortaya konulabilir. *E. coli* "H" antijeniyle 60'a yakın serogruba ayrılmaktadır. Bu iki antijenik yapıya göre gruplandırılan *E. coli* 0157:H7 gıda ile hayvanlardan insanlara bulaşan ve insanlarda hemorajik kolitisten sorumlu serotip olduğu bilinmektedir (İzgür, 2006).

2.3.3. Kapsüler "K" Antijenleri

Polisakkarit (M4 asetil neuraminik asit) özelliğinde olan bu antijenik yapı, kapsül taşıyan *E. coli* suşlarında "O" somatik antijeninin üzerinde bulunmaktadır. "K" antijenine göre de 100'e yakın serogrup tesbit edilmektedir. Bu nedenle "K" antijeni taşıyan suşlar "O" antiserumları ile aglutine olmamaktadır. "K" antijenlerinin önemli iki komponenti bulunmaktadır;

1-K(A) antijenleri: 120 °C'de 2 saatte tahrip olabilen antijenlerdir. Esas olarak 08, 09, 020 ve 0101 gibi O-serogruplarında bulunmaktadır.

2-K(B) antijenleri: 100 °C'lik ısıda tahrip olan bu kapsüler antijenler de polisakkarit yapısındadır (İzgür 2006).

2.3.4. Fimbrial (Pilus) Antijenleri

Önceleri "K" antijeninin L fraksiyonu olarak adlandırılan bu antijenler protein yapısında olmakta ve hücre duvarının filamentöz uzantılarında, yani fimbrialarında (piluslarında) yer aldığı son yıllarda yapılan araştırmalarla anlaşılmaktadır. Bazı *E. coli*'lerde bulunan fimbriaları iki gruba ayrılır ve bunların başlıca iki görevi bulunmaktadır;

1-Sex pilusları: Sayıları 4 civarında bulunan seks pilusları aracılığıyla *E. coli* suşları arasında veya *Enterobacteriaceae* familyasının diğer cinslerine ait türler arasında konjugasyon

yapabilen *E. coli*'ler, bazı ekstrakromozomal genetik elementlerin aktarılmasını sağlamaktadır.

2-Diğer piluslar (virulans pilusları): Sayıları 200 civarında olan diğer piluslar sayesinde de etkenler bağırsak epitellerine tutunabilmektedir (adhesiv özelliği). Bu antijenler de “K” antijenleri gibi bir suşun “O” antijenine göre identifiye edilmesini önlemektedir. *E. coli*'lerde bulunan bu antijenlerin saptanması, özellikle enteropatojenik *E. coli* (EPEC)'lerin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Çünkü bu piluslar *E. coli*'lerin virulans faktörü olarak kabul edilmekte ve hemaglutinasyon özelliklerine göre de *E. coli* türleri 2 grup altında incelenmektedir (İzgür, 2006).

a-Tip-I: Çeşitli hayvan kanlarını hemaglutine (HA) edebilen bu tip fimbriaların, bu özellikleri mannozla inhibe edilebilmektedir (Mannoz duyarlı-MS). Bunlar F1 antijenleri olarak da adlandırılmaktadır (İzgür, 2006).

b-Tip-II: Bu fimbriaların HA özellikleri ise, mannozla önlenemez özelliktedir (Mannoz dirençli-MR). Bu tip fimbrialara da domuzlardan izole edilen K88 suşu, buzağılardan izole edilen K99 suşu antijenleri örnek verilebilmektedir (İzgür, 2006).

E. coli'lerde bulunan “O”, “K” ve “H” antijenlerinin sentezi bakteri kromozomu tarafından yönetilmesine rağmen, fimbria antijenlerinin sentezi hem kromozom, hem de plazmidler aracılığı ile olmaktadır (İstanbuluoğlu, 1978).

2.4. *E. coli* Toksinleri

2.4.1. Enterotoksinler

Enterotoksinler genellikle genç hayvanların (buzağı, kuzu, domuz yavrusu) bağırsak infeksiyonlarından sorumlu *E. coli*'ler tarafından sentezlenmektedir. Enterotoksin oluşturan *E. coli*'ler ETEC (Enterotoksijenik *E. coli*), oluşturmayanlar ise, NETEC (non enterotoksijenik *E. coli*) olarak adlandırılmaktadır. Enterotoksinlerin iki fraksiyonu bulunmaktadır.

2.4.1.1. Stabil Toksin (ST)

Isıya dayanıklı olup, STa ve STb diye iki varyantı bulunmaktadır. İmmunojenik özelliği yoktur ve aside dirençli değildir, ayrıca proteinazlara da çok duyarlı olduğu bilinmektedir. STa'nın kısa sürede oluşan etkisi, bağırsak epitelinde quanil siklazı aktive

ederek ortaya çıkmaktadır. Bu biyolojik etki kısa sürelidir ve hücre içi guanosin monofosfat artışı sonunda bağırsak boşluğunda sıvı ve elektrolit sekresyonu artmakta ve bağırsaktan sıvı emilimini dolaylı olarak azalmaktadır. STa, sığır, koyun ve insan örneklerinden izole edilen bazı ETEC'lerde saptandığı bildirilmektedir. STb'nin ise sitotoksik etkisi henüz belirlenememiştir (İzgür, 2006).

2.4.1.2. Labil Toksin (LT)

Isıya duyarlı olup, etki tarzı ve antijenik yapısı nedeniyle, kolera toksinine aynı zamanda K88 adhezine de sahiptir. LT2 ise daha çok sığırlardan izole edilen bazı ETEC'lerde belirlenmektedir. Hücre içi cAMP'ı katalize eden adenilat siklazı aktive ederek, bağırsak lumenine elektrolit salımına ve özellikle de Na⁺, Cl⁻ ve su salımına neden olmaktadır. LT1 ve LT2 olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. LT1 üreten ETEC suşlar çoğunlukla domuzlara ait olup, aynı zamanda K88 adhezine de sahiptir. LT2 ise daha çok sığırlardan izole edilen bazı ETEC'lerde belirlendiği bilinmektedir (İzgür, 2006).

Enterotoksinlerin belirlenmesinde çeşitli tekniklerden yararlanılmaktadır. En çok kullanılan teknikler ise aşağıda belirtilmiştir;

1-Bağırsak ligatür(lup) testi: İzole edilen *E. coli* suşlarının kültür filtratları, laparotomi yapılarak, bağırsakları 8-10 cm'lik bölümler halinde ligatüre edilmiş tavşanların, bu bağırsak bölümlerine enjekte edilerek 24 saat izlenmektedir. Enterotoksin sentezleyen suşların bölümlerinde, sıvı ve gaz sekresyonuna bağlı olarak şekillenen şişkinlikler pozitif olarak değerlendirilmektedir (Resim 3) (İzgür, 2006).

2-Fare testi (İnfant mouse testi): Bu test daha çok ST1 in belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. *E. coli*'lerin kültür filtratları 3-4 günlük yavru farelere % 1'lik Evans Blue ile birlikte verilerek, fareler 28°C'de 4 saat tutulduktan sonra öldürülmekte ve bağırsak ağırlıklarının vücut ağırlığına oranı saptanarak, sonuçlar değerlendirilmektedir (İzgür, 2006).

3-Doku kültürü testi: Bu amaçla Yİ adrenal hücre kültürleri kullanılmaktadır. Kültür süper natantlarının hücrelerde yaptıkları değişikliklere göre değerlendirmeler yapılmaktadır (İzgür, 2006).



Resim 3. Tavşanda lup testi (Dasgupta ve Dastidar 2012)

2.4.2. Nörotoksinler

E. coli'de bulunan lipoprotein özelliğindeki belirtilen bu nörotoksin, domuzlarda enterotoksemiye neden olabilmektedir. Genellikle bu nörotoksinler 0139:K82(B), 0141:K85(B), 0138:K81(B) serotipleri ile birlikte bazı hemolitik *E. coli*'ler tarafından oluşturulmaktadır. Isıya duyarlı olan bu toksin, farelerde merkezi sinir sistemi hasarlarına neden olmaktadır. Bu özelliği ile de enterotoksin ve endotoksinlerden ayrılmaktadır (İzgür, 2006).

2.4.3. Endotoksinler

Bu toksinler bütün *E. coli* suşlarında bulunmaktadır. Protein-fosfolipid-polisakkarit yapısında olan "O" somatik antijeninin polisakkarit fraksiyonları, antijeniteyi belirlemektedirken, lipoproteinler toksisiteyi belirlemektedir. Septisemi durumlarında şok belirtileri ile birlikte şiddetli hipertermiye neden olmaktadır (İzgür, 2006).

2.4.4. Sitoksik Nekrozan Faktör (CNF)

E. coli'lerin bazı suşları tarafından üretilen bu toksin, hücre kültürlerinde çoklu çekirdeklenmeye neden olmakla birlikte tavşan derisinde nekrozlara neden olabilmektedir. Molekül ağırlıkları farklı iki alt grubu bulunan bu toksinin (CNF-1 ve CNF-2) CNF-2 alt grubu, ayrıca fare ekstremitelerinde de nekroza neden olabilmektedir. *E. coli* etkenlerinin bazıları kolisin denilen bakteriyotoksinler sentezlemektedir. Günümüze kadar A'dan V'ye

kadar isimlendirilmiş 20'ye yakın kolisin tespit edildiği bilinmektedir. Fajlarla aynı ortak algaçlara tutunarak da etkili olabilen bu kolisinler sayesinde *E. coli*'ler gruplandırılabilir. Kloroform ve U.V.'den etkilenmeyen ve kültür filtratlarında bulunan kolisinlerin patojenite ile ilgisi bulunmamaktadır. *E. coli*'lerin bakteriyofajları da bulunmaktadır. Sayıları her geçen gün artan bu fajlar sayesinde faj tiplendirmesi de yapılabilir. *E. coli* fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı oldukça dirençli olduğu bilinmektedir. Doğal koşullarda (su, dışkı ve hayvan barınaklarında) aylarca canlı kalabilmektedir. Fenol ve kreosol gibi dezenfektanlara da direnç göstermekte ve 55 °C'de 1 saat ısıtılmakla inaktive olmamaktadır (İzgür, 2006).

E. coli'nin neden olduğu enfeksiyonlar aşağıda belirtilmiştir;

1-Evcil hayvanlarda intestinal hastalıklar (Kolibasillozisler): Bu enfeksiyonlar özellikle yeni doğmuş ve genç hayvanların (buzağı, kuzu, domuz yavrusu, tay, civciv gibi) enfeksiyonlarıdır (İzgür, 2006).

2-Evcil hayvanlarda ekstra intestinal hastalıklar: Bu tür enfeksiyonlara çeşitli şekillerde rastlanılmaktadır;

A-Ürogenital sistem enfeksiyonları

a-Kedi ve köpeklerde *E. coli*'den ileri gelen sistitis ve pyelonefritis'ler

b-Köpek ve atlarda genital sistem enfeksiyonları

B-Meme bezi enfeksiyonları (mastitisler): Bu tür mastitislere tüm evcil dişi hayvanlarda rastlanılmakta ve *E. coli*, sığırlarda mastitisin primer etkeni olabildiği gibi, domuzlarda da metritis-mastitis-agalactiae sendromlarının en önemli etkeni olarak bilinmektedir (İzgür, 2006).

C-Akciğer yangıları (Pnömoni): *E. coli* opportunist patojenite özelliği sayesinde akciğer enfeksiyonlarından sekonder etken olarak izole edilmektedir (İzgür, 2006).

D-Yara enfeksiyonları: Özellikle açık yaradan, kontaminasyon sonucu, saf veya karışık kültürlerden izole edilmektedir (İzgür, 2006).

2.5. Buzağı ishalleri ve Kolibasillozisler

Bu tür enfeksiyonlar, insan başta olmak üzere, özellikle buzağı, kuzu, domuz yavrularında, taylarda ve civcivlerde görülmektedir (İzgür, 2006).

Sığır yetiştiriliciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olan, ishal, sepsis ve toksemi şeklinde seyreden, ani ölümlere karakterize bir hastalık olduğu bilinmektedir (Emre

ve ark, 1998). Neonatal sepsisemi 100 yılı aşkın süredir devam eden bir durum olup, genellikle 2 haftalık yaştan küçük immün sistemi gelişmemiş buzağuları etkileyen bir hastalık olarak bilinmektedir (Fecteau ve ark, 2009).

Neonatal buzağı ishalleri sığırcılık işletmelerinin en önemli problemlerinden biri olması, yüksek mortalite ve morbidite oranlarına sahip olduğu, ishallerin sağaltımı ve ishalden korunma için yapılan çalışmalar ile birlikte hastalık sebebi dolayısıyla büyüme ve gelişmede yavaşlama, durma ve bunlarla beraber ölümlerin olması nedeni ile dünyada oldukça önem arz eden ekonomik kayıplara yol açan bir problem olduğu bilinmektedir (Radostits ve ark, 2006; House ve ark, 2011).

Ölüm nedenleri arasında ishal, pnömoni ve sepsis gibi problemlerin olduğu bilinmektedir. Ölümlerin hastalıklara bağlı bakteriyemi ve endotoksemi ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir (Lofstedt ve ark, 1999).

Enfeksiyona bağlı küçük işletmelerde ölümler % 10-15 (% 50'ye çıkabilir) iken koruma yapılan işletmelerde bu oran % 1-8 arasında değiştiği bildirilmektedir. Hastalıkla ilgili sağaltım girişiminde bulunulmaması durumunda hastalık oldukça kötüleşen bir prognozla ilerler ve ölüm kaçınılmaz olmaktadır (Gay ve ark, 1994).

İshalde rol oynayan etiyolojik faktörlerin karışık olmasından dolayı, uygun sağaltımın yapılamaması, sıvı-elektrolit sağaltımının doğru ve düzenli olmaması gibi nedenlerden dolayı yukarıda bahsedilen sonuçların olduğu bildirilmektedir (Beam ve ark, 2009).

Neonatal sepsisemi, bakteriyemi ve sepsis terimleri, buzağuların sistemik enfeksiyonlarını belirtmek için kullanılan terimler olarak tanımlanmaktadır. Bu terimlerin anlamları arasında ufak farklılıklar olmasına rağmen, hepsi buzağı ishalleri için kullanılan terimlerdir. Bakteriyemi; kan dolaşımındaki bakterinin hücre kültürü ile belirlenmesi anlamını taşımaktadır. Sepsisemi; sistemik bir bulgu olmakla birlikte sepsis veya septik şoka sebep olan patojenik etkenin dolaşıma girmesi sonucu çeşitli sistem ve organlarda yerleşerek bunların toksinlerinin var olduğu anlamını taşımaktadır. Bununla birlikte sadece bakteri ile sınırlı olmamakla birlikte tüm mikroorganizmaları da içine almaktadır. Sepsis ise enfeksiyon ile beraber yangısal olayların beraber seyretmesi olarak tanımlanmakta ve bunun nedeninin immün yetmezlik olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir (Lofstedt ve ark, 1996; Fecteau ve ark, 1997; House ve ark, 2011).

Uygun olmayan çevre koşulları, immün sistemin yeterince gelişmemesi viral, bakteriyel, paraziter, protozoal etkenlerin tek başına ve/veya miks enfeksiyonlar tarzında görülmesi hastalığın etiyolojisinde yer aldığı çalışmalarda bildirilmektedir (Hall ve ark, 1992;

Radostits ve ark, 2006; Ok ve ark, 2009). Buzağılarda diyare ile seyreden enfeksiyöz hastalıklar Tablo 2’de belirtilmiştir.

Tablo 2. Buzağılarda diyare ile seyreden enfeksiyöz hastalıklar (Turgut 2000)

ETKEN	YAŞ	ATEŞ	DEHİDRASYON	DIŞKININ KARAKTERİ	DİĞER KLİNİK ÖZELLİKLERİ	KESİN TEŞHİS	SPESİFİK PROFİLAKSİ
Enterejonik <i>E. coli</i>	< 1 hafta	Yok	Orta şiddetli	Sulu, pis kokulu, sarı renkte, pH alkali	Şiddetli metabolik asidoz, hiperkalemi	Yavru farelerin barsaklarında toksin üretimi	Ana buzağının ve aşılanması
S. Dublin S. Typimurium	Tüm yaş	Var	Hafif-orta şiddette	Yumuşak, sulu mukoza döküntülü ve kanlı	Yaygın entorokolitis nötrofilde sola kayma	Dışkı kültürü	Ananın aşılanması taşıyıcının eliminasyonu
C. perfringens tip C ve B	<2 hafta	Yok	Hafif-orta şiddette	Kanlı diyare	CNS bozukluğu, yaygın hemorajik enteritis	Hücre döküntülerinde etken, anaerobik kültür	Anaların aşılanması
Rotavirus	< 1 hafta	Yok veya hafif	Orta şiddette	Yaygın sulu	Çabuk yayılır, morbidite %100’dür.	Dışkı kültürü fekal FA testi	Doğumda oral aşılama, ananın aşılanması
Coronavirus	5-21 gün	Yok veya hafif	Şiddetli, kısa zamanda şekillenir	Yaygın sulu, pH asit	Çabuk yayılır, morbidite %100, sıvı-elektrolit ted. Cevap vermez	Dışkı kültürü, fekal immuno-elektromikroskop	Doğumda oral aşılama, ananın aşılanması
Bovine viral diyare virusu (BVD)	>3 hafta	Bifazik	Orta şiddette	Sulu, yaygın değil	Mortalite ve morbidite düşük, içi yanak lezyonlar	Patogno mik gastrointestinal lezyonlar	Gebe olmayan inekler aşılanır, buzağı aşısı ve hiperimmün serum
Adenovirus	>10 gün	?	Hafif-orta	Sulu	Sol.sis. hastalığı, sancı	Boğaz kültürü	Yok

Buzağı ishallerini oluşturan etiyolojik ve epidemiyolojik nedenlerin tam olarak bilinmemesi, hastalığın kontrol ve eradikasyonunun yapılmasından dolayı buzağı ishalleri güncelliğini ve önemini yitirmediği açıktır. Hastalığın oluşumundaki etken ve suşunun farklılığı, çevresel ve stres faktörlerinin fazlalığı hastalığı oldukça karışık bir duruma getirmektedir. Buzağı sepsisemilerine en çok yol açan mikroorganizma *E. coli*, daha az sıklıkta *Klebsiella sp.*, *Salmonella sp.*, Gram (+) ve Gram (-) etkenler olarak bilinmektedir

(Fecteau ve ark, 1997). Hastalık kolostral antikör alımının düşük olduğu buzağılarda daha çok görüldüğü belirtilmektedir (Erdoğan ve ark, 2003).

Buzağların immun sistemlerinin yeterli oranda gelişmemesi, kolostrum alımındaki eksiklikler ve kolostrumdaki immunglobulin oranının düşük olması hastalık için önemli predispoze faktörler arasında olduğu bildirilmektedir. Yeni doğan buzağılarda morbidite ve mortalite çok karışık bir etiyolojiye sahip olduğu bilinmektedir. Buzağı ishallerinin ortaya çıkmasında yeterli kolostrum alınmaması, patojenik etkene maruz kalma, beslenme, hijyen ve temizliğin eksik olması önemli risk faktörleri olarak bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada laktojenik immunité ve sağlıklı buzağı arasında yüksek korelasyonlu bir ilişki olduğu bildirilmektedir (Lundborg, 2004).

İshal oluşumunun asıl nedeni enfekte hayvanların dışkıları olmaktadır. Yenidoğan buzağlar bu etkenleri; kontamine olmuş altlık, zemin, suluk, yemlik ve diğer buzağların perineum bölgelerini yalamaları sonucu ve/veya anneleri emerken ya da süt içmeleri esnasında almaktadır. Hastalığın bulaşması fekal-oral, solunum, omfalojen ve daha az sıklıkla da fetal dönem enfeksiyonları ile meydana geleceği bildirilmektedir (Hofmann, 1992; Radostis ve ark, 1999).

Çevresel koşulların uygun olmaması, yetersiz beslenmenin sebep olduğu stres intestinal direncinin bozulmasına ve patojen etkenlerin dolaşıma girerek septisemi tablosu oluşturmaya neden olmaktadır. İnce barsaklara yerleşen *E. coli*, ürettiği enterotoksin sonucu barsaklarda sıvı-elektrolit kaybına yol açmaktadır. Bunların sonunda ishal, dehidrasyon ve asit-baz dengesinde bozulmalar şekillenmektedir. Hastalığa karışan viruslarda emilim bozukluğuna (malabsorbsiyon) yol açabilmektedir. Enterotoksinler intestinal mukozada adenilat siklaz aktivitesini stimüle ederek siklik AMP'yi arttırmakta ve intestinal kanalda sekresyon artışına neden olmaktadır. Sekresyon sıvısı alkali karakterde (Na ve HCO₃'den zengin) olduğundan dolayı metabolik bir asidoz gelişmektedir. İshal oluşumunda; konakçı duyarlılığı, barsak lümeni ve mikroorganizmaların bulunduğu ortamın fiziksel, kimyasal ve hijyenik şartları, etiyolojik etkenlerin serotipleri gibi faktörlerin rol aldığı bildirilmektedir (Radostits ve ark, 1999; Fecteau ve ark, 2009; House ve ark, 2011).

İshalin başlaması ile birlikte kısa bir süre içerisinde şekillenen sıvı-elektrolit denge bozukluğuna bağlı olarak (Na⁺,K⁺, H⁺, NaHCO₃) oluşan metabolik asidoz ve hiperkalemi sonucu oluşan kalp blokajına bağlı olarak ölümlerin meydana geldiği bildirilmektedir (Hall ve ark, 1992; Radostits ve ark, 2006). Ayrıca kronik vakalarda şiddetli kilo kaybı veya sekonder sepsise bağlı olarak ölümler meydana gelebileceği bildirilmektedir (Weldon, 1992).

E. coli doğada yaygın bulunan bir mikroorganizmadır. Buzağının immunité düzeyi, mikroorganizmanın özelliği, suşun dokulara invazyon kabiliyeti, enterotoksin üretme ve sepsisemi yapma özelliği ile diğer çevresel faktörler gibi hastalığa predispoze oluşturabilecek şartlar ile enfeksiyon meydana gelmektedir. Hastalığın oluşmasında kolostrumun yetersiz alınması çok büyük önem arz ederken, kolostrum hem bağışıklığı arttırmakta hem de *E. coli*'lerin barsakta üremelerini baskılamakta olduğu bildirilmektedir (Fecteau ve ark, 2009; Radostits ve ark, 1999; House ve ark, 2011).

Buzağı ishallerine neden olabilecek etkenler arasında Gram negatif bakteriler olduğu bilinmektedir. *E. coli* gibi lipopolisakkarit (LPS) içeren etkenler önemli faktörler olmaktadır. İlâveten, lipopolisakkaritler gram negatif bakterilerin hücre duvarındaki endotokseminin gelişmesinde önemli bir faktör olduğu bildirilmektedir. Endotoksinin endotelial hücreler üzerine etkisi sitokin aracılığıyla prokoagulan aktivasyonu ile enflamatuvar yanıtı uyarmakta olduğu bildirilmiştir. Endotoksin endotel hücrelerindeki hasara bağlı aktivasyonu başlatmaktadır. Koagülasyonun intrinsik ve ekstrinsik yollarına bağlı subendotelial kollajen ve tromboplastin salgılatarak doku plasminojen aktive edici ve plasminojen aktivator inhibitörü olarak bilinmektedir (Green ve ark, 1993).

Septisemilerle beraber gelişen ölüm olaylarının mekanizmaları birbirlerinden farklılık göstermektedir. Örneğin, hem hücresel metabolizma hemde besin alımındaki bozukluklara bağlı olarak meydana gelen hipotermi sonucu dehidrasyon ve endotoksemik şok meydana gelmektedir. İshalli buzağılarda hipotermi gözleendiği yapılan çalışmada saptanmıştır. Pek çok ishalli buzağıda dehidrasyon ve asidoza bağlı olarak intraselüler ve ekstraselüler potasyum (K⁺) konsantrasyonundaki bozukluklar sonucu gelişen aritmiden ölmektedir. Ek olarak kronik olgularda şiddetli kilo kaybı veya sekonder sepsise bağlı ölümlerin şekillendiği bildirilmektedir (Weldon ve ark, 1992; House ve ark, 2011). Etkin bir immün yanıt ve yangı arasındaki denge, şok gibi olumsuz bir etki ile sonuçlanabilmektedir. Buzağının immün sistemi enfeksiyonu belirlemede veya enfeksiyonla mücadelede başarısız olduğuunda konakçıda sistemik yangısal yanıt sendromu oluşmaktadır (Naylor, 1989).

Septik şokta hipotansiyon ve/veya hipoperfüzyon oluşması septik şokun daha şiddetli bir hal almasına neden olmaktadır. Septik şok, değişik derecelerde hipovolemik (kapılar sızıntı ile oluşan sıvı kaybı), kardiyojenik (septik vasküler direnç kaybı) ve dağıtım şokunun (sistemik vasküler direnç azalması) birlikte görülmesi olarak da adlandırılabilir. Sepsis ve septik şok terimleri arasındaki ayrım, septik şokta şiddetlenerek giden bir organ disfonksiyonu ile karakterize sepsis durumu söz konusu olduğu bildirilmektedir (Fecteau ve ark, 2009).

Endotoksinler, yangı genlerinin aktivasyon ve ekspresyonu ile Gram (-) bakterilerin mannoz ve glikoprotein yapıda olan hücre duvarları tarafından salgılanmaktadır. Süperantijenler, toksinler ve dolaşımdaki makrofaj-lenfosit aktivasyonu, sitokinlerin ve yangısal mediatörlerin serbest bırakılması sürecini başlatabilmektedir. Sepsisin başlaması arakidonik asit metabolitlerinin üretimi, miyokardiyal depresan faktörleri, endojen opiyatlar ile sepsisin birçok mediatörünün üretimi ve serbest bırakılmasını içine almaktadır. Sepsis devam ederken; tümör nekroz faktörü (interlöykin-1-2-4-6-8), tromosit aktive edici faktör, interferon-g, eikosanoidler (B4, C4, D4, E4 gibi lökotrienler, tromboksan A2, prostaglandin E2, I2), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör, endotelin-1, komplement fragmanları C3a ile C5a, toksik oksijen radikalleri, polimorfonükleer nötrofil kaynaklı proteolitik enzimler, trombositler, transforme büyüme faktörü-b, vasküler permeabilite faktörü, makrofajlardan salınan prokoagülan ve inflamatuvar sitokin, bradikinin, trombin, pıhtılaşma faktörleri, fibrin, plazminojen aktivatör inhibitör, miyokardiyal depresan madde, b-endorfin, ısı şok proteinleri ve adezyon molekülleri (endotelin kaynaklı adezyon molekülü, intraselüler adezyon molekülü ve vasküler adezyon molekülü ortaya çıktığı bildirilmektedir. Sepsis sırasında çıkan tüm bu mediatörlerin olumsuz etkileri olmakta ve sepsisin sistemik ile klinik bulgularının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Sepsisin geliştiği olgularda endotelde geçirgenlik artışı, miyokardiyal depresyon ve ara metabolizmanın bozulması sonucu hipovolemi, hipotansiyon ve solunum yetmezliği gibi önem arz eden komplikasyonların ortaya çıkacağı bildirilmektedir (Kliegman ve ark, 2007).

2.6. Etiyoloji

Hastalık etkeni *E. coli*'dir. Buzağılarda hastalık yapan *E. coli*'lerin O8, O9, O15, O20, O26, O35, O78, O86, O101, O115, O117 ve O119 serotiplerine dahil oldukları bilinmektedir. Ayrıca buzağılarda ishal oluşturan *E. coli*'lerin enterotoksijenik (ETEC) özellikte olup, bu toksinlerden enterotoksin STa sentezledikleri, adezinlerden ise K99 veya K99+F41 pilus antijenlerine sahip oldukları bilinmektedir. Yine ishal oluşturan suşlar arasında enteropatojen *E. coli* (EPEC)'lerde ve enterohemorajik *E. coli* (EHEC)'lerde bulunmaktadır. Bu suşlar, infeksiyonun şekillenmesinde, özellikle, pilus antijenleri (adezinleri) ile etkili olmaktadır. Septisemiye neden olan suşların da toksin ve adezinleri bulunmaktadır. Ayrıca bu suşlar sitotoksik nekrozan faktör 1 ve 2 (CNF-1, -2) sentezlemektedir (Snodgrass ve ark, 1986; Ballmer ve ark, 2007).

2.7. Epidemiyoloji

Buzağı septisemisine, sığır yetiştiriciliği yapılan her ülke ve bölgede rastlamak mümkündür. *E. coli* normal intestinal kanal florasını oluşturan bir mikroorganizma olmasına rağmen, sayısının fazla miktarda artması ile enfeksiyon oluşturmaktadır. Ayrıca dışkı ile

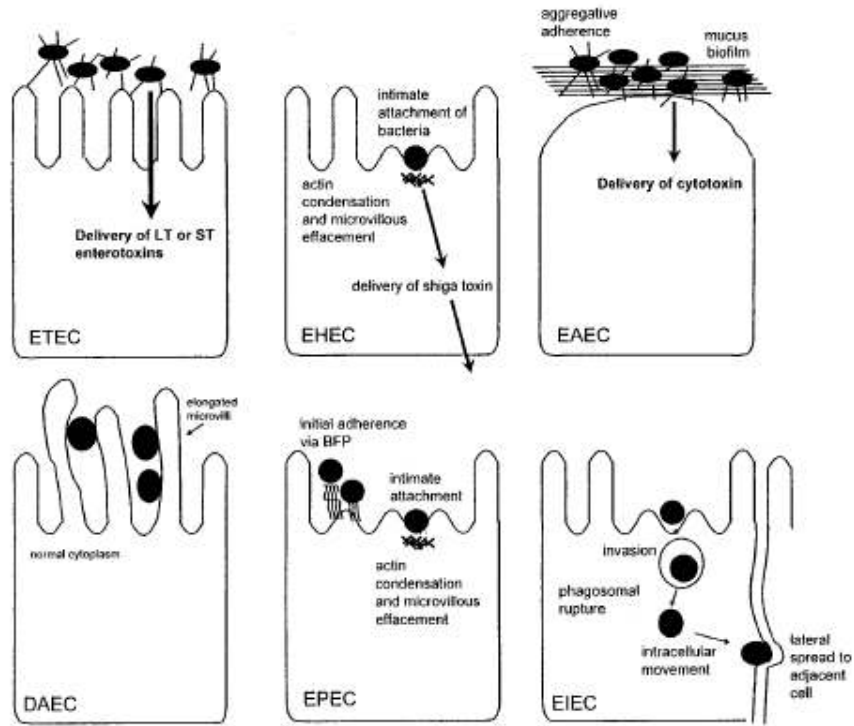
kontamine olmuş yem ve sularla patojen *E. coli*'lerin oral yolla alınması enfeksiyonun şekillenmesinin önemli nedenleri arasında bulunmaktadır. Genelde, intestinal kanalda *E. coli* sayısını kontrol eden iki esas mekanizma bulunmaktadır. Birinci faktör, floradaki diğer bakteriler ve *E. coli* arasındaki bakteriyel interferansa bağlı bir etkileşim, diğer faktör ise yetersiz pasif bağışıklık olarak bilinmektedir. Yeni doğan buzağılarda intestinal kanal sterildir. Fakat annenin vajinal ve perianal florasındaki mikroorganizmalar, ağız ve rektum aracılığı ile bağırsak kanalına çok çabuk kolonize olabilmektedir. Doğumu takip eden birkaç saat içinde koliform grubu etkenler, laktobasiller ve zorunlu anaerob bakteriler bu kolonizasyonu oluşturmaktadır. Gram pozitif, anaerobik özellikte olan laktobasiller apatojendir ve genellikle ince bağırsakta bulunarak, ürettikleri asit nedeniyle pH'yı düşürmekte ve bu nedenle de *E. coli*'ler üreyememektedir. Bir diğer taraftan, yavrulara verilmesi gereken kolostrum ve süt, *E. coli*'ye karşı annede sentezlenen spesifik ve nonspesifik antikorları içerdiğinden dolayı, bunlar sayesinde *E. coli* 'lerin üremesi yine inhibe edilmektedir. Böylelikle, oluşan gastrointestinal flora, kolostrum ve süt ile alınan immunglobulinler ile denge halinde tutulmaktadır. Hijyenik koşulların iyi olmaması, doğum öncesi annelerin başka bölgelere transportu, intestinal kanalda bulunan *E. coli* yükünün artması, stres faktörleri, iklim değişiklikleri, beslenmede düzensizlikler ve en önemlisi de patojen *E. coli*'lerin çeşitli şekillerde vücuda alınması, hastalık için hazırlayıcı nedenler olduğu bildirilmektedir (Çabalar ve ark, 2001).

2.8. Patogenezi

Buzağı kolibasillozis'inde çeşitli yollarla vücuda alınmış *E. coli*'lerden toksik özellikte olanlar (Enterotoksijenik *E. coli*-ETEC suşlar) öncelikle enterositlerin mikrovilluslarına K99 veya K99+F41 adezinleri aracılığıyla kolonize olarak bağırsak epiteline adeze olmaktadır. Bu kolonizasyon ancak yaşamın ilk saatlerinde şekillenebilmesine rağmen adezinler için özel hücre reseptörleri doğumdan 12 saat sonra kaybolmakta olduğu bildirilmektedir (Busato ve ark, 1998). ETEC suşlar tarafından sentezlenen STa toksinleri intestinal kanal lumeninde su ve elektrolitlerin aşırı salgılanmasını provoke eder ve bu durum akut ishale, dehidrasyona ve

asidoza neden olmaktadır (Enterotoksemik kolibasilozis). Genellikle oluşan şok tablosunu ölüm takip etmektedir (Gulliksen ve ark, 2009).

Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)'lerin neden olduğu buzağı sepsisemilerinde ise iç organlarda, eklemlerde ve sinirlerde bozukluklar şekillenmektedir. Ancak bu patolojik bozukluklara yol açan *E. coli*'lerin patogenesisi henüz tam açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu suşlar arasında sitotoksik nekrozan faktör (CNF-1 ve CNF-2) sentezleyenlerin olabileceği düşünülmektedir. Akut veya subakut görülebilen kolisepsisemisinde enfeksiyon şekillenen olgular gelişmemektedir (Gulliksen ve ark 2009) (Resim 4).



Resim 4. Farklı *E. coli* suşlarına ait hücresel mekanizmalar (Kaper ve ark, 2004)

2.9. Klinik Belirtiler

Hastalık klinik olarak dehidrasyon ve ishal ile karakterize görülmektedir. Lakin akut form gösteren ve ETEC suşlarından ileri gelen enterotoksemik kolibasilozisde; yeni doğmuş buzağılar 2-6 saat içinde komaya girerek ölebilmektedir. Sepsisemik form da bazen akut seyredebilmektedir. Fakat sistemik bozukluklarına ilaveten, çoğu olgularda, arthritis ve topallık görülebilmektedir. Subakut kolibasilozis ise çoğunlukla doğumdan sonraki ilk üç hafta içinde görülmektedir. Kötü kokulu, sık aralıklarla defekasyon ve dehidrasyon göze çarpmaktadır. Vücut sıcaklığı yüksektir. Halsizlik, iştahsızlık, bazı durumlarda topallık ve

bazen de meningitise bağlı inkoordinasyon durumları görülebilmektedir. Enfeksiyon şekillenen olgularda genellikle gelişim yeterli olamamaktadır (İzgür, 2006).

2.10. Teşhis

2.10.1. Klinik Teşhis

Akut durumlarda, özellikle enterotoksemik formunda klinik bulguları monitörize etmek mümkün olmamaktadır. Ani ölümler dikkati çekmektedir. Septisemik ve subakut olgularda, ishal, pneumoni ve arthritisi ile bu belirtileri gösteren diğer bazı hastalıklarla karışabilmektedir. *Salmonella sp.*, *Clostridium perfringens* tip C, bazı viral enfeksiyonlar ve gıdaya bağlı enteritislerden ayırt edilebilmesi için laboratuvar muayenelerinin yapılmasını zorunlu kılmaktadır (İzgür, 2006).

2.10.2. Nekropsi Bulguları

Nekropside, genellikle, hastalığa ait tipik bulguları görmek mümkün olmamaktadır. İç organlarda septisemiye ait genel lezyonların bulunmasının yanında, bazı durumlarda akciğerlerde pnömoni ve eklemlerde de artritise ilgili patolojik bulgulara rastlanılmaktadır (Brenner ve ark, 1995).

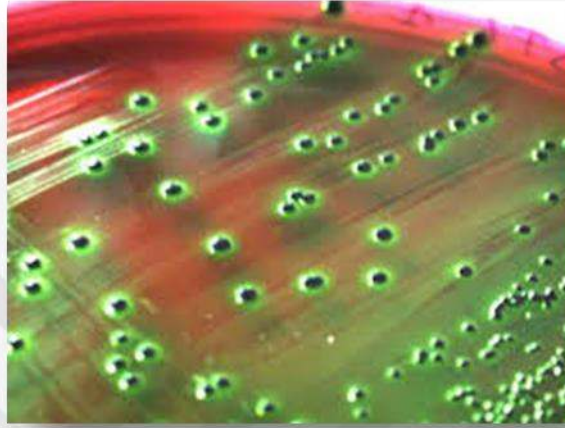
2.10.3. Laboratuvar Muayeneleri

Bu amaçla laboratuvara yeni ölmüş veya agoni halindeki hayvanlara ait organlar (karaciğer, dalak, akciğer, vs) ve bağırsak içerikleri gönderilmesi önerilmektedir (Erganiş ve ark, 1989).

Bakteriyoskopi: Septisemiden ölen hayvanlara ait organlardan yapılan preparatlarda Gram negatif çomakların görülmesi *E. coli*'yi düşündürebilmektedir. Fakat kesin tanı için yeterli olmamaktadır (Erganiş ve ark, 1989).

Kültür: Bu amaçla kanlı agar, MacConkey ve EMB agar gibi besi yerlerine ekimler yapılmakta ve 24-48 saat 37°C'de inkubasyondan sonra üreyen koloniler *E. coli* yönünden değerlendirilmektedir (Resim 4). Buyyon kültüründe 24 saatte homojen bulanıklık yapan *E.*

coli biyokimyasal testlerle (karbonhidrat fermentasyon testleri, H₂S, indol, MR, VP, Nitrat, vs) identifiye edilmektedir. Ancak üreyen *E. coli*'lerin patojenik özellikte olup olmadıklarının belirlenmesi amacıyla; virulans faktörlerinin (adezin-B'ler) çeşitli testlerle araştırılması gerekmektedir. Örneğin; in vitro koşullarda bu amaçla HA testi kullanılabilmektedir. Ek olarak, virulens faktörlerinin PCR gibi moleküler yöntemlerle de doğrulanması yapılabilmektedir (Ok ve ark, 2009).



Resim 5. *E. coli*'nin EMB agarda makroskopik morfolojisi (Kaper ve ark, 2003)

Hayvan deneyi: Özellikle ETEC suşlarının belirlenmesi amacıyla, bağırsak lup testi, fare testi ve doku kültürü testlerinin kullanılması gerekmektedir (İzgür,2006).

Serolojik testler: Buzağılarda hastalık yapan *E. coli* serotiplerine karşı hazırlanmış antiserumlarla üreyen kolonilerin lam üzerinde yapılan aglütinasyon testi ile hangi serogruba ait oldukları ve dolayısıyla da antijenik özellikleri kesin olarak saptanabilmektedir. Fimbria antijenlerinin saptanması amacıyla aglütinasyon, latex aglütinasyon, ELISA, FAT kullanılmaktadır (Thorns ve ark, 1992).

Ayrıca toksinleri kodlayan genlere spesifik DNA problemleri de ETEC suşları belirlemek için kullanılabilmektedir (Erganiş ve ark, 1989).

2.11. Tedavi

Buzağılarda kolibasillozisin sağaltımı antibiyotiklerle mümkün olabilmektedir. Fakat özellikle *E. coli*'lerde bulunan direnç faktörlerinin (R plazmidlerinin) konjugasyonla aktarılması sebebiyle, sağaltım öncesi hayvanlardan hastalık etkeni olarak izole ve identifiye

edilen *E. coli*'lerin antibiyogramları yapılarak etkili antibiyotiğin seçilmesinin oldukça faydası bulunmaktadır. Bununla beraber sağaltım amacıyla kan basıncını normal düzeye getirmek amacıyla gerekli ilaç takviyeleri de yapılması önerilmektedir. Bu amaçla sıvı-elektrolit takviyesi, hiperimmün serum kullanımı, bakteriyel interferans için probiyotik tedavisi bu yöntemler arasında bulunmaktadır (Boynukara ve ark, 2000).

2.12. Koruma

1. Gebe sağmal ineklerin kuruya çıkarılması,
2. Gebe ineklerin beslenmesine dikkat edilmesi (yeşil yem, kaliteli silaj, A vitamini takviyesi)
3. Güç doğumlarda veteriner hekime haber verilmesi,
4. Doğumun; temiz ve diğer hayvanlardan ayrı bir yerde yapılması,
5. Doğum sonrası, buzağının temizlenmesi, kurulanması ve göbek kordonunun antiseptiklendikten (ilaçlandıktan) sonra bağlanması,
6. Ağız sütü buzağıyı hastalıklardan koruyucu maddeler taşıdığından çok gereklidir. Bu nedenle buzağının en kısa zamanda anasını emmesi sağlanmalıdır. İlk 24 saat içinde 3-4 öğün ağız sütü mutlaka emzirilmelidir. Doğumdan sonraki 3 gün ağız sütüne devam edilmelidir. Buzağılar, suni yolla emzirilmelidir.
7. Yeni doğmuş buzağılar, emmeyi takiben anasından ayrılıp özel buzağı bölümlerine alınmalıdır. Özel buzağı bölümü; önce dezenfekte edilmeli (ilaçlanmalı), iyice havalandırılmalı, rutubetsiz olması sağlanmalı, temiz altlık sap serilmeli ve 5 günde bir mutlaka değiştirilmelidir.
8. Ahırda *E. coli* etkeninin varlığı biliniyorsa, gebe inekler hamileliğin son iki ayı içinde bu bakteri suşu ile hazırlanmış aşılarda aşılanmalıdır. Eğer ana aşılanmamışsa, buzağıya doğar doğmaz *E. coli* mikrobiyotik ile hazırlanmış antiserum koruyucu olarak uygulanmalıdır.

Ahırlardaki buzağı septisemisi (koliseptisemi) olayları, koruyucu uygulamaya rağmen önlenemiyorsa, veteriner hekim kontrolünde veya laboratuvarından alınan antibiyogram (test) sonucuna göre antibiyotik uygulanabilmektedir. Buzağı kolibasillozisininden korunmada en önemli faktör, hijyenik önlemlerin alınmasıdır. Özellikle doğum esnasında bu hijyenik kurallara (umbilikal yoluyla *E. coli*'nin alımının önlenmesi) çok dikkat edilmelidir. Ayrıca, gebe hayvanların gebeliklerinin son dönemlerinde transportları yapılmamalı ve doğum sonrası tüm yavrulara yeterli düzeyde kolostrum verilmelidir. Ancak bu pasif immunizasyonla, yavrular çevrede yaygın ve özellikle kolibasillozise neden olan *E. coli* suşlarına karşı annede

sentezlenen antikorları alabilirler. Suni emzirmenin söz konusu olduğu işletmelerde de mutlaka kolostrumun verilmesi; mümkünse tüm annelerden alınan kolostrumların harmanlanarak yavrulara verilmesinde büyük yarar vardır. Ayrıca, çoğu ülkede, hasta buzağılara *E. coli*'ye karşı hazırlanmış hiperimmün serumlar pasif immunoterapi amacıyla verilmektedir. Aktif immunizasyon amacıyla da son yıllarda birçok aşı hazırlanmaktadır. Gebe hayvanlara gebelikleri süresince çeşitli dönemlerde K99 antijeni taşıyan canlı veya inaktif *E. coli* (bakterin) aşıları yapılarak fetusun aktif immunizasyonu sağlanmaktadır. Ancak ticari olarak hazırlanmış *E. coli* aşılarından hayvanların aşılınmasıyla büyük bir yarar sağlanamadığı bildirilmektedir (İzgür, 2006).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. İzolasyon Örnekleri

Araştırmamız Eylül-Aralık 2015 tarihleri arasında, Aydın ili ve çevresinde bulunan sığır işletmeleri ziyaret edilerek gerçekleştirildi. Araştırmanın hayvan materyalini sözkonusu işletmelerden bulunan ve ishal semptomu gözlenen 50 adet buzağı oluşturmuştur. Örnek alınan bir buzağı Resim 6’de ve buzağılara ait bilgiler Tablo 3’de görülmektedir.



Resim 6. Örnekleme yapılan Holştayn ırkı bir buzağı.

Örnekler, hayvanların rektumundan tekniğine uygun bir şekilde taşıma solusyonlu svaplara alındı (Resim 7) ve soğuk zincir uygulanarak Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına ulaştırıldı. Bu örnekler, *E. coli* varlığı ve izole edilecek olan *E. coli* saha suşlarının enterotoksijenik olup olmadığı yönünden araştırıldı. Araştırmanın yapılmasında Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ADÜ-HADYEK)’nun 14.08.2015 tarih ve 64583101/2015/092 sayılı kararı ile herhangi bir sakınca görülmemiştir.



Resim 7. Buzağuların rektumundan tekniğine uygun bir şekilde taşıma solusyonlu svaplara örneklerin alınması

Tablo 3. Örnek alınan buzağılara ait bilgiler

SIRA NO	ÖRNEKLEMENİN YAPILDIĞI TARİH	BUZAĞI IRKI	YAŞ (gün)	CİNSİYE Tİ	KLİNİK BELİRTİLER	TEDAVİ	İDENTİFİYE EDİLEN BAKTERİ
1	15.09.2015	Holştayn	2	Dişi	Enteritis, Pneumoni, İştahsızlık, Halsizlik, Dehidrasyon	Hayır	<i>E. coli</i>
2	16.09.2015	Holştayn	2	Dişi	Enteritis, Pneumoni, İştahsızlık, Halsizlik, Dehidrasyon, Yarı Koma Hali	Hayır	<i>E. coli</i>
3	16.09.2015	Holştayn	30	Erkek	Enteritis, Pneumoni, İştahsızlık, Halsizlik, Dehidrasyon	Hayır	<i>E. coli</i>
4	20.09.2016	Holştayn	2	Dişi	Enteritis, Pneumoni, Halsizlik	Evet (Oral Tetrasiklin+Sülfadimidin)	<i>E. coli</i>
5	20.09.2015	Holştayn	15	Dişi	Enteritis, Halsizlik	Hayır	<i>E. coli</i>
6	21.09.2015	Holştayn	7	Dişi	Enteritis	Evet (Oral Tetrasiklin+Sülfadimidin)	<i>E. coli</i>
7	22.09.2015	Holştayn	3	Dişi	Enteritis, Septisemi, İştahsızlık, Halsizlik	Hayır	<i>E. coli</i>
8	22.09.2015	Simmental	12	Dişi	Enteritis, Halsizlik	Evet (Oral Enrofloksasin)	<i>E. coli</i>
9	22.09.2015	Simmental	13	Erkek	Enteritis, Halsizlik	Evet (Oral Enrofloksasin)	BÜO
10	23.09.2015	Holştayn	15	Erkek	Enteritis, Pneumoni, İştahsızlık, Halsizlik, Dehidrasyon	Evet (Trimethoprim+Sulfadiazin)	<i>E. coli</i>
11	23.09.2015	Holştayn	25	Dişi	Enteritis, İştahsızlık, Tenesmus	Hayır	<i>E. coli</i>
12	24.09.2015	Holştayn	30	Erkek	Enteritis, Pneumoni, İştahsızlık	Hayır	<i>E. coli</i>

Tablo 3 devamı							
13	24.09.2015	Holştayn	30	Dişi	Enteritis, Pneumoni, İştahsızlık	Hayır	<i>E. coli</i>
14	25.09.2015	Holştayn	30	Dişi	Enteritis, Pneumoni, İştahsızlık	Hayır	<i>E. coli</i>
15	25.09.2015	Holştayn	3	Erkek	Enteritis, İştahsızlık, Halsizlik	Hayır	<i>E. coli</i>
16	28.09.2015	Holştayn	2	Dişi	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
17	2.10.2015	Holştayn	45	Dişi	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
18	3.10.2015	Holştayn	15	Erkek	Enteritis	Evet (Oral Tetrasiklin+Sülfadimidin)	<i>E. coli</i>
19	5.10.2015	Holştayn	15	Erkek	Enteritis, Pneumoni	Hayır	<i>E. coli</i>
20	5.10.2015	Holştayn	20	Dişi	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
21	6.10.2015	Holştayn	15	Erkek	Enteritis	Evet (Danofloksasin ve Oral Tetrasiklin)	<i>E. coli</i>
22	10.10.2015	Simmental	12	Erkek	Enteritis	Evet (Enrofloksasin ve Oral Tetrasiklin)	<i>E. coli</i>
23	12.10.2015	Holştayn	20	Dişi	Kronik Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
24	15.10.2015	Simmental	10	Erkek	Enteritis, İştahsızlık, Halsizlik	Hayır	<i>E. coli</i>
25	17.10.2015	Holştayn	9	Erkek	Enteritis, Pneumoni, İştahsızlık, Halsizlik, Dehidrasyon	Hayır	BÜO
26	17.10.2015	Holştayn	2	Erkek	Enteritis, Septisemi, Halsizlik, Dehidrasyon	Hayır	BÜO
27	17.10.2015	Holştayn	60	Erkek	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
28	17.10.2015	Holştayn	10	Dişi	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
29	17.10.2015	Holştayn	10	Dişi	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
30	17.10.2015	Holştayn	7	Dişi	Enteritis	Evet (Enrofloksasin)	<i>E. coli</i>

Tablo 3 devamı							
31	24.10.2015	Holştayn	2	Erkek	Enteritis, Septisemi	Evet (Buzağı Septiserumu)	<i>E. coli</i>
32	25.10.2015	Holştayn	2	Erkek	Enteritis	Evet (Penisilin+Streptomisin)	<i>E. coli</i>
33	26.10.2015	Simmental	20	Dişi	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
34	26.10.2015	Simmental	10	Dişi	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
35	29.10.2015	Holştayn	20	Dişi	Enteritis, Pneumoni, İştahsızlık, Halsizlik, Dehidrasyon	Evet (Trimethoprim+Sulfadiazin)	<i>E. coli</i>
36	29.10.2015	Holştayn	3	Dişi	Enteritis, Pneumoni, İştahsızlık, Halsizlik, Dehidrasyon	Evet (Trimethoprim+Sulfadiazin)	<i>E. coli</i>
37	31.10.2015	Holştayn	15	Erkek	Enteritis,Halsizlik,	Hayır	<i>E. coli</i>
38	31.10.2015	Holştayn	15	Erkek	Enteritis,Halsizlik,	Hayır	<i>E. coli</i>
39	31.10.2015	Holştayn	7	Erkek	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
40	2.11.2015	Simmental	7	Erkek	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
41	2.11.2015	Simmental	9	Dişi	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
42	2.11.2015	Simmental	12	Erkek	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
43	2.11.2015	Simmental	16	Dişi	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
44	6.11.2015	Holştayn	10	Erkek	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
45	6.11.2015	Holştayn	2	Dişi	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
46	8.11.2015	Holştayn	12	Erkek	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
47	11.11.2015	Simmental	10	Dişi	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
48	11.11.2015	Simmental	8	Dişi	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>
49	1.12.2015	Holştayn	20	Dişi	Enteritis, Pneumoni, İştahsızlık, Halsizlik, Dehidrasyon	Evet (Trimethoprim+Sulfadiazin)	<i>E. coli</i>
50	1.12.2015	Holştayn	8	Erkek	Enteritis	Hayır	<i>E. coli</i>

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Ayıraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskleri

3.1.2.1. Besiyerleri

3.1.2.1.1. İzolasyon Besiyerleri

3.1.2.1.1.1. Kanlı Agar Base (Merck1.10886)

Blood agar.....40 g.
Distile su.....100 ml

Karışımın pH'sı 7,2 – 7,4'e ayarlanıp, 15 dakika otoklav edildikten sonra, 50 °C'ye kadar soğutulup, içine % 7 oranında sterildefibrine koyun kanı ilave edildi.

3.1.2.1.1.2. ModifiyeTryptic Soy Broth (Merck 1.09205)

Pepton(kazein)	17 g
Pepton(soya unu)	3 g
NaCl	5 g
Safra tuzları No. 3	1.5 g
D(+)-glukoz	2.5 g
Di-potasyumhidrojenfosfat	4 g
Novobiocin	0.02 g
Distile su	1000 ml

Araştırmamız için alınan dışkı örneklerinde bulunan bakterinin zenginleştirilmesinde modifiye tryptic soy broth (mTSB) kullanılmıştır. Zenginleştirme besiyeri mTSB'de Gram-negatif mikroorganizmaların gelişmesini azaltmak için novobiocin veya akriflavin bulunmaktadır. mTSB besiyeri 33 g/l konsantrasyonda distile suda eritilerek hazırlanmış ve erlenlere 225 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra erlenlerdeki besi yerleri otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

3.1.2.1.2. İdentifikasyon besiyerleri

3.1.2.1.2.1. Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar (Difco 279100) ve CT SMAC Agar

Katkısı (Merck1.09202)

Pepton	20 g
NaCl	5 g
Safra tuzları No. 3	1.5 g
Sorbitol	10 g
Kristal violet	0.001 g
Nötralred	0.03 g
Agar-agar	15 g
Distile su	1000 ml

Sorbitol MacConkey agardan 51,6 g/l oranı ile 500 ml distile su içinde ısıtılarak eritilmiş ve otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. CT-SMAC Agar Katkısı agara ilave edilmeden önce bir şişe katkı üzerine 1 ml distile su eklenip karıştırılmıştır. Otoklav sonrasında 45 °C’ye kadar soğutulan 500 ml agara aseptik şartlarda CT katkısı eklenerek karıştırılmış ve petri kaplarına 12,5 ml/petri olacak şekilde dökülmüştür.

3.1.2.1.2.2. Eozin - Metilen Blue (EMB) Agar

Pepton.....	10 g
Laktoz.....	5 g
Sükroz.....	5 g
Dipotasyum fosfat.....	2 g
Eozin Y.....	0.4 g
Metilen mavisi.....	0.065 g
Agar.....	13.5 g
Distile su.....	1000 ml

Karışımın pH’sı 7.2’ya ayarlandı ve 121 °C’de 15 dk otoklav edilmek suretiyle steril edildi.

3.1.2.1.2.3. Lassen'in 3'lü tüp besiyerleri

Tüp I

Peptone	20 g
Lactose	10 g
Glucose	1g
Sodium thiosulphate	0.2 g
Ferric ammonium sulphate	0.3 g
NaCl	6 g
Agar	17 g
Phenol red (0.2'lik)	12.5 ml
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7.6'ya ayarlandı ve 121 °C'de 15 dk otoklav edilmek suretiyle steril edildi.

Tüp II

Peptone	5 g
Neopeptone	5 g
Mannitol	2 g
Agar	2.5 g
Potassiumnitrate	1.7 g
Phenol red (% 0.2'lik)	20 ml
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7.6'ya ayarlandı ve 121 °C'de 15 dk otoklav edilmek suretiyle steril edildi.

Tüp III

L- Tryptophan	0.3 g
PotassiumDihydrogenphosphate	0.1 g
PotassiumHydrognephosphate	0.1 g
Üre	2 g
Ethanol (% 95'lik)	1 g

Phenol red (% 0.2'lik)	20 ml
NaCl	0.5 g
Distile su	1000 ml

Besiyerinin sterilizasyonu milipore (0.2 μ) filtreden süzülerek yapıldı (Koneman ve ark, 1997).

3.1.2.1.3. Antibiyogram Besiyeri

3.1.2.1.3.1. Mueller-Hinton Agar (Merck 1.05437)

Meat infusion	2,0 g/L
Casein Hydrolysate	17,5 g/L
Starch	1,5 g/L
Agar-agar	13,0 g/L

Dehidre besiyeri, 34,0 g/L konsantrasyonda damıtık su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 115 °C 'da 10 dakika sterilize edilip, steril Petri kutularına 12,5'er ml dökülür. Zor gelişen mikroorganizmaların gelişimini arttırmak için bileşime kan ilave edilebilir. Bu amaçla, otoklav çıkışında 45-50 °C'a soğutulur ve %5-10 olacak şekilde defibrine kan ilave edilir. Kan ilavesi, Enterokokların aminoglikozitlere karşı duyarlılığın belirlenmesinde sahte negatif sonuçlara neden olabilir. Kan ilave edilmeden hazırlanmış besiyeri berrak, menevişli (yanar-döner) ve sarımsı kahverengindedir. pH, 25 °C'da 7,4 $\pm$ 0,2'dir.

3.1.2.1.4. Antibiyotik Diskleri

Antibiyotik duyarlılık testlerinde Penisilin G (10 U), Tetrasiklin (30 μ g), Enrofloksasin (5 μ g), Trimethoprim-Sulfometoksazol (25 μ g), Danofloksasin (5 μ g), Amoksisilin-Klavulanik asit (30 μ g), Gentamisin (10 μ g) ve Kanamisin (30 μ g) (Oxoid®) antimikrobiyel ajanlarını ihtiva eden diskler kullanılmıştır.

3.1.2.2. Ayıraçlar

3.1.2.2.1. İndol ayıracı

P-Dimethylaminobenzaldehyde	10 g
Isoamylalcohol	150 ml
HCl (konsantre)	50 ml

3.1.2.3. Solusyonlar

3.1.2.3.1. EDTA (0,5 M)

Disodium EDTA-2 H₂O.....186,1 g

EDTA 800 ml distile suda manyetik karıştırıcıda çalkalanarak eritilip, NaOH ile pH 8.0'e ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlanıp 121 °C'de 15 dk otoklav edildi.

3.1.2.3.2. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer

10X TBE Stok Solusyonu

Tris Base.....121,1 g

Borik Asit.....61,83 g

EDTA.....5,84 g

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dk otoklav edilip, pH 8.0 ayarlanarak buzdolabında saklandı.

0,5X TBE Kullanma Solusyonu

10X TBE.....50 ml

Distile su.....950 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlandı.

3.1.2.3.3. Gel LoadingBuffer (6X)

Bromfenol Mavisi.....25 mg

Sükroz.....4 g

H₂O.....10 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlandı.

3.1.2.3.4. Tris (1M)

Tris Base.....121 g

Tris Base 800 ml distile suda eritilip, yaklaşık olarak 60 ml HCl asit ilave edilerek pH: 7.6'ya ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlandı. 121 °C'de 15 dk otoklav edildi.

3.1.2.3.5. 1M NaCl

NaCl.....58,44 g

Distile Su.....800 ml

NaCl distile suda çözüldükten sonra son hazim 1000 ml' ye tamamlandı.

3.1.2.3.6. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA)

Tris (1M).....10 ml

EDTA(0,5 M).....2 ml

Karıştırıldıktan sonra karışım 1000 ml distile su ile tamamlandı.

3.1.2.4. Boyalar

Gram boyama (Merck-111885) yapılmıştır.

3.1.3. PCR

3.1.3.1. Kullanılan Cihazlar

PCR 25 örnek kapasiteli Eppendorf Master Cycler kademeli termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.1.3.2. MgCl₂, Taq DNA Polimeraz, 10XTaq Buffer, dNTP Set

25mM MgCl₂, Taq DNA polimeraz (5U), 10X TaqBuffer (100 mM (Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl), 100mM deoksinükleotidtrifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas) kullanılmıştır.

3.1.3.3. Primerler

E.coli suşlarında putative toksin genleri uidA ve est1b genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. PCR’da kullanılan oligonükleotid dizileri (Chandra ve ark, 2013)

Primer	Oligonükleotiddizisi (5’-3’)	Büyüklik (bp)
<i>E.coli</i> uidA	ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC	1487
	AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG	
<i>ETEC</i> est1b	TGTCTTTTTCACCTTTTCGCTC	171
	CGGTACAAGCAGGATTACAACAC	

3.1.4. Elektroforez

Elektroforez işlemi Thermo marka, elektroforez tankında, görüntüleme işlemi Vilber Lourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi.

3.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı

Agarose (Sigma)..... 1,5 veya 2 g
TBE (0,5X)..... 100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk kaynatılan karışım, 40-50 °C’ye kadar soğutuldu. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15-20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

3.1.4.2. Marker

Marker olarak 100 bp’lik DNA ladder (Fermentas®) kullanıldı.

3.1.4.3. Etidium Bromür

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında Sigma marka % 1’lik Etidium Bromür 500 ml 0,5X TBE ile hazırlanan % 2’lik agaroz jelin içerisine 5µl miktarında eklenerek kullanıldı.

3.1.4.4. Standart Suş

İzolasyon ve identifikasyon çalışmalarının her aşamasında kullanılan *E. coli* ATCC® 25922 üretici firmadan temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. *E. coli* İzolasyonu

Laboratuvara getirilen örneklerden *Escherichia coli*'nin saf olarak elde edilmesi amaçlandı. Bunun için, svap örnekleri mTSB'de zenginleştirilerek ve 42 °C'de 24 saat çalkalanarak inkube edildi. 24 saat sonunda üreme gözlenen suşların fenotipik özelliklerinin incelenebilmesi için kanlı agar, CT SMAC, EMB, MacConkey agara pasajları yapıldı. 24 saat inkübasyon sonunda üreme şekillenen besiyerlerinden preparatlar hazırlanarak Gram boyama yapılmıştır. Gram boyama sonucunda belirlenen Gram-negatif basillerin izolasyon ve identifikasyonuna gidilmiştir.

3.2.1.1. Fenotipik identifikasyon

İzole edilen suşların koloni morfolojileri değerlendirilmiş ve biyokimyasal testler ile identifikasyon yapılmıştır.

3.2.1.1.1. Sefiksim-Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey Agarda üreme

mTSB besiyerinde üreyen gram-negatif ve biyokimyasal testler açısından *E. coli* şüpheli kolonilerden CT-SMAC agarlara öze ile ekim yapıldıktan sonra petri kutuları 37 °C'de 24 saat inkubasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda renksiz olan koloniler sorbitol negatif, pembe-kırmızı koloniler ise sorbitol pozitif olarak değerlendirilmiştir (Holt ve ark 1994, Koneman ve ark 1997).

3.2.1.1.2. Eozin - Metilen Blue (EMB) Agarda üreme

mTSB besiyerinde üreyen gram-negatif ve biyokimyasal testler açısından *E. coli* şüpheli kolonilerden EMB agarlara öze ile ekim yapıldıktan sonra petri kutuları 37 °C’de 24 saat inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonunda laktozu kullanamayan bakteriler renksiz koloniler, laktozu kullanabilen *E. coli* için tipik koloniler ise yeşilimsi ve parlak metalik renkte koloniler olarak değerlendirilmiştir(Holt ve ark 1994, Koneman ve ark 1997).

3.2.1.1.3. Biyokimyasal testler

Şüpheli kolonilerin CT-SMAC agarlara pasajları yapılarak saf kültürleri elde edildi. Saf kültürlere gram boyama yapıldı. Gram negatif kolonilerden Lassen’in üçlü tüp besiyerlerine ekimleri yapıldı. Lassen üçlü tüp besiyerleri 37 °C’de 24 saat inkube edildi. İnkubasyondan sonra tüpler değerlendirildi ve *E. coli* suşlarının identifikasyonları gerçekleştirildi (Holt ve ark 1994, Koneman ve ark 1997).

3.2.1.1.3.1. Oksidaz testi

İzolasyonu yapılan mikroorganizmaların oksidaz aktiviteleri, oksidaz diski (Bacto) ile ölçüldü. Şüpheli bakterilerin 24 saatlik saf kültüründen platin öze ile alınan birkaç koloni oksidaz diskine yayılarak sürüldü. 25-30 saniye içinde diskin pembe mor bir renk alması pozitif, renk değişikliğinin olmaması negatif olarak değerlendirildi (Koneman ve ark, 1997).

3.2.1.1.3.2. Nitrat testi

İçinde nitratlı buyyon bulunan tüplere, şüpheli mikroorganizmaların saf kültüründen birkaç koloni ekildi ve 37 °C’de 5 gün inkube edildi. Daha sonra buyyonun üzerine nitrat ayraçlarından (Solusyon A, Solusyon B), 1’er ml dökülerek besiyerinin renginin kırmızı veya kiremit kırmızısı olması pozitif, renk değişikliğinin olmaması negatif olarak kabul edildi (Koneman ve ark 1997).

3.2.1.2. Genotipik identifikasyon

Öncelikle *E. coli* suşlarından PCR’da kullanılmak üzere izolatlardan total DNA ekstraksiyonu Fermentas® DNA ekstraksiyon kit ile gerçekleştirildi.

Fermentas® DNA Isolation Kit Prosedürü:

*Bir öze dolusu *E. coli* kültürü 400 µl lizis solusyonu ile süspanse edildi. 65°C’de 5 dk inkübe edildi.

*600 µl kloroform ilave edildikten sonra 10.000 rpm.de 2 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.

*800 µl presipitasyon solusyonu pelet üzerine ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 1-2 dakika karıştırıldı.

*10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildikten sonra DNA içeren pelet 1.2 M NaCl solusyonunda çözdürüldü.

*300 µl etanol eklendikten sonra 10 dakika -20°C’de bekletildi. 10.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildikten sonra %70’lik etanol ile yıkandı. Daha sonra 100 µl steril distile suda çözüldü. Her bir PCR reaksiyonu için 5 µl template DNA kullanıldı.

3.2.1.2.1. PCR

Master Mikslerin Hazırlanışı: Tüm PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 25 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, 100 mM KCl, magnesium klorür (MgCl₂) 1,5 mM, dNTP 0,5 mM, primer (her biri için) 0,2 µM, Taq DNA polymerase 5 U (Genet Bio Exprime Taq DNA polymerase®) olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve volümleri Tablo 5 ve 6’de belirtilmiştir.

Tablo 5. *E.coli* uida geni için mastermiks hazırlanma oranları (Chandra ve ark, 2013)

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim
Tag Buffer (100 mM KCl)	3 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
Primer F (0.2 µM)	0.5 µl
Primer R (0.2 µM)	0.5 µl
Taq Polimeraz (5U)	0.5 µl
ddH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır
Template DNA (200 nM)	5 µl
TOPLAM	25 µl

Tablo 6. ETEC est1B geni için mastermiks hazırlanma oranları (Chandra ve ark, 2013)

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim
Tag Buffer (100 mM KCl)	3 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
Primer F (0.2 µM)	0.5 µl
Primer R (0.2 µM)	0.5 µl
Taq Polimeraz (5U)	0.5 µl
ddH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır
Template DNA (200 nM)	5 µl
TOPLAM	25 µl

Mastermiksler hazırlandıktan sonra 0,2 mL’lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 20’şer µl hazırlanan mastermiksden ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA’dan 5’şer µl alınıp, ilgili tüplerin içerisine eklenmiş ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. *E. coli* uidA ve *ETEC* est1B analizlerinde kullanılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı (Chandra ve ark 2013)

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	5 dk
Denatürasyon	30	94°C	30 sn
Bağlanma		63°C	30 sn
Uzama		72°C	1.5 dk
Son Uzama	1	72°C	5 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

3.2.1.2.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi

0,2 mL tüplerde oluşturulan 25 µl’ lik PCR ürünlerinden 10’ ar µl pipet yardımıyla alınıp, 3 µl 6x loading dye ile karıştırıldı. Oluşturulan karışımın tamamı alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi.

3.2.1.2.3. Jelde Yürütme

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 80V 500A akımda 40 dakika yürütüldü.

3.2.1.2.4. Görüntüleme ve Değerlendirme

Elektroforez işleminin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkarıldı. Süre sonunda yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. UV ışığı ile fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PCR için ayrı değerlendirildi.

PCR analizi değerlendirmesinde, *E. coli* uidA primeri için 1487 bp, *ETEC* est1B primeri için 171 bp, uzunluğunda bant oluşumu gözlemlendi.

3.2.2. Antibiyogram

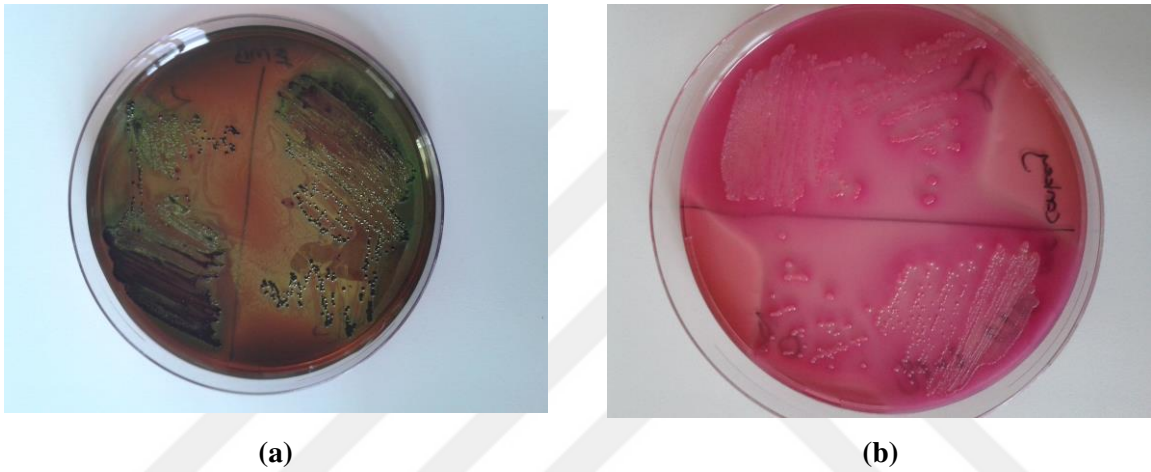
İdentifiye edilen *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla Müeller-Hinton Agar kullanılarak Disk Diffüzyon yöntemi uygulanmıştır. Hazırlanan Müeller-Hinton besiyeri 10 cm çapındaki petrilere 4 mm kalınlığında olacak şekilde döküldükten sonra katılaşımaya bırakılmıştır. *E. coli* suşlarının 0.5 Mc Farland değerindeki buyyon kültürlerinden plak besiyerinin yüzeyine 0,1 ml yada swap ile her tarafa yaydırılarak ekimleri yapılmıştır. Ekim yüzeyinin kuruması için birkaç dakika beklenildikten sonra diskler ucu alevden geçirilerek steril edilmiş pensetle kenardan 1.5 cm, birbirlerinden 1.5 cm olacak şekilde yerleştirilmiştir. Araştırmamızda penisilin, danofloksasin, tetrasiklin, enrofloksasin, trimethoprim-sulfamethoksazol, sefoperazon, amoksisilin-klavulanik asit, gentamisin, eritromisin ve kanamisin antibiyotikleri kullanılmıştır (CLSI, 2012).

Besiyerleri 15 dk oda ısısında bekletildikten sonra, 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş, disk çevresindeki inhibisyon zon sınırları ölçülerek Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) standartlarına göre yorumlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

İncelenen 50 adet rektal svap örneğinin 47 (% 94) adedinden *E. coli* izolasyon ve identifikasyonu gerçekleştirildi. *E. coli* suşlarına ait EMB ve Mac Conkey besiyeri görüntüleri Resim 8’ da verilmektedir.



Resim 8. *E. coli* suşlarına ait (a) EMB ve (b) Mac Conkey besiyeri görüntüleri

Örneklerde bulunan toplam *E. coli* sayısı Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Örneklerde bulunan toplam bakteri sayısı

Türler	İzolasyon Sayısı (adet)	İzolasyon Yüzdesi (%)
<i>E. coli</i>	47	94

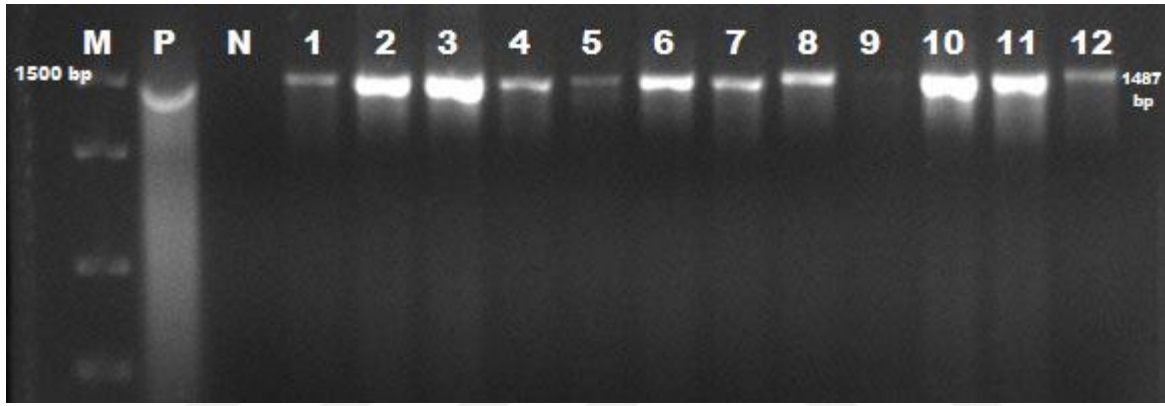
4.2. PCR Bulguları

İzolasyon ve identifikasyon sonucunda elde edilen toplam 47 *E. coli* izolatında, *E. coli* spesifik uidA ve ETEC spesifik est1B genlerini saptamak için PCR uygulanmıştır. *E. coli* spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonrasında incelenen toplam 47 *E. coli* izolatının hepsi (% 100) uidA geni açısından pozitif olarak saptanmıştır. Moleküler olarak doğrulanan *E. coli* suşları, ETEC spesifik est1B gen varlığı açısından araştırıldığında sadece 1

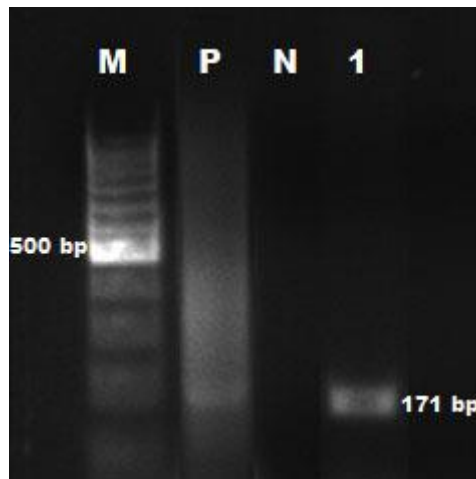
(% 2) adet suş enterotoksijenik *E. coli* olarak saptanmıştır. Gen saptanmasına göre identifiye edilen suşlar Tablo 9’de belirtilmiştir. PCR sonucunda elde edilen elektroforez görüntüleri Resim 9 ve 10’de gösterilmektedir.

Tablo 9. Gen saptanmasına göre identifiye edilen suşlar

Hedef gen	İzolasyon Sayısı (adet)	İzolasyon Yüzdesi (%)
<i>E. coli</i> (uidA)	47	94
ETEC (est1B)	1	2



Resim 9. *E. coli* uidA spesifik gen için yapılan PCRsonuçları. **M:** 1500 bp DNA ladder, **P:**Pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 25922), **N:**Negatif Kontrol, **1-12:**uidA geni pozitif örnekler



Resim 10. ETEC est1B spesifik gen için yapılan PCRsonuçları. **M:** 100 bp DNA ladder, **P:**Pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 25922), **N:**Negatif Kontrol, **1:**ETEC est1B geni pozitif örnek

4.3. Antibiyogram Bulguları

Araştırmamızda identifiye edilen *E. coli* suşlarının disk difüzyon tekniği ile antibiyotik duyarlılıkları incelenmiştir. Antibiyotik duyarlılık testlerinde Penisilin G, Tetrasiklin, Enrofloksasin, Trimethoprim-Sulfometoksazol, Danofloksasin, Amoksisilin-Klavulanik asit, Gentamisin ve Kanamisin antimikrobiyel ajanlarını ihtiva eden diskler kullanılmıştır (Resim 11).



Resim 11. *E. coli* suşlarının antibiyogram görüntüsü

Antibiyogram testleri sonucunda *E.coli* izolatlarının Gentamisin'e % 89, Sefoperazon'a % 61, Amoksisilin- Klavulanik asit'e % 51, Danofloksasin'e % 44, Enrofloksasin'e % 42 oranlarında duyarlı ve Penisilin G'ye ve Eritromisin'e % 100, Tetrasiklin'e ve Trimetoprim-Sulfometoksazol'e % 80, Kanamisin'e ise % 76.5 oranlarına dirençli olduğu saptanmıştır. Kullanılan antibiyotiklerin zon çaplarının değerlendirilmesi Tablo 10'da, *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık oranları Tablo 11'de sunulmuştur.

Tablo 10. Kullanılan antibiyotiklerin zon çaplarının değerlendirilmesi (cm) (CLSI 2012)

Antibiyotik	S	I	R
Amoksisilin-Klavulanik Asit	≥ 18	14-17	≤ 13
Sefoperazon	≥ 21	16-20	≤ 15
Gentamisin	≥ 15	13-14	≤ 12
Tetrasiklin	≥ 15	12-14	≤ 11
Trimetoprim-sulfometoksazol	≥ 26	23-25	≤ 22
Penisilin G	≥ 26	23-25	≤ 22
Eritromisin	≥ 20	17-19	≤ 16
Kanamisin	≥ 18	14-17	≤ 13
Danofloksasin	≥ 22	18-21	≤ 17
Enrofloksasin	≥ 22	17-21	≤ 16

Tablo 11. Elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılık oranları (n=47)

Antibiyotik	S	I	R
Amoksisilin-Klavulanik Asit	24	14	9
Sefoperazon	29	16	2
Gentamisin	42	1	4
Tetrasiklin	9	-	38
Trimetoprim-sulfometoksazol	1	8	38
Penisilin G	-	-	47
Eritromisin	-	1	46
Kanamisin	4	7	36
Danofloksasin	21	5	21
Enrofloksasin	20	7	20

5. TARTIŞMA

Enterotoksijenik *E. coli* suşları, sentezledikleri enterotoksinlerle özellikle genç hayvanlarda şiddetli ishalleri neden olabilmektedirler (DebRoy ve Maddox, 2001). Enterik enfeksiyonlardan izole edilen suşların, enterotoksijenik karakterleri enzim immunoassay (EIA), pasif hemaglutinasyon (PA), çeşitli lateks aglutinasyon testleri, farklı hayvanlarda barsak ligatür (lup) testleri, infantil fare testi (İFT), Vero, HeLa ve Y1 hücre kültürleri, tavşan vasküler permeabilite testi, DNA prob tekniği, Radio İmmuno Assay (RIA), immunoblot ve farklı PCR teknikleri ile ortaya konabilmektedir (Scotland ve ark, 1989; Blanco ve ark, 1997; Güler ve ark, 2008; Hossain ve ark, 2008). Enterotoksin tiplerinin saptanmasında genellikle çabuk sonuç veren ve güvenilirliği yüksek olan lateks aglutinasyon testleri (Scotland ve ark, 1989; Carroll ve ark, 1990) ve farklı ELISA teknikleri (Mills ve Tietze, 1984; Carroll ve ark, 1990; Urban ve ark, 1990; Salvadori ve ark, 2003) kullanılmaktadır.

Farklı hayvanlardan izole edilen *E. coli* suşlarında enterotoksin tiplerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda ST oranının % 1-66.7, LT oranının ise % 1.8-13.2 arasında değişen yüzdelerde belirlendiği bildirilmiştir (Blanco ve ark, 1993; Güler ve ark, 2008; Rajkhowa ve ark, 2009).

Carroll ve ark. (1990) DNA hibridizasyon tekniği ile pozitif (STIa) olarak buldukları sığır orijinli 16 ETEC'nin tamamının ST açısından kompetatif EIA ile pozitif, LT bakımından ise lateks aglutinasyon tekniğinde negatif sonuç verdiğini rapor etmişlerdir. Benzer bir çalışmada Blanco ve ark. (1993), ishalleri sığırlardan izole edilen 197 *E. coli* suşunun birinde (% 0.5) STa ve LT belirlendiği, sağlıklı olanlardan ise 112 izolatın 3 (% 2.7)'ünde STa, 2 (% 1.8)'sinde de LT saptandığı bildirilmiştir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada Rajkhowa ve ark. (2009), sığır orijinli 54 *E. coli* suşunun 2'si (% 3.7) ST geni, 1'i (% 1.8) ise LT geni açısından PCR ile pozitif bulunmuştur. Mainil ve ark. (1990), sığır orijinli 870 ETEC suşunun 7'sinde (% 0.8) PCR ile STb geni saptamışlardır. Benzer bir çalışmada Shin ve ark. (1994), 666 sığır izolatının 7'si (% 1.1) DNA hibridizasyon prop tekniği ile STb geni açısından pozitif bulunmuştur. Brezilya'da yapılan bir çalışmada Salvadori ve ark. (2003), ishalleri buzağılardan izole edilen 250 adet *E. coli* suşunun 8'inde (% 3.9) STa, 17'sinde (% 8.3) LT-II belirlenmiştir. Aynı ülkede yapılan benzer bir araştırmada Rigobelo ve ark. (2006) ise ishalleri buzağılarda yüksek oranda ST (% 25.4) ve LT (% 13.2) geni taşıyıcılığı saptanmıştır.

Ülkemizde gerçekleştirilen bir araştırmada Güler ve ark. (2008), farklı çiftliklerdeki ishalleri buzağılara ait dışkılarından izole edilen 75 *E. coli* suşunun 12'si (% 16)

enterotoksijenik olarak bulunmuş, 45 sağlıklı buzağı izolatının ise tamamı STa açısından multipleks PCR ile negatif olarak saptanmıştır. Benzer bir çalışmada Osek ve Winiarczyk (2001) sağlıklı buzağılardan izole edilen 390 adet *E. coli* suşunun tamamı PCR ile LT ve ST genleri yönünden negatif bulunmuştur. Mills ve Tietze (1984), buzağı orijinli 251 *E. coli* suşunun 6 (% 2.4)'sında ELISA ile ST belirlemişlerdir. Başka bir araştırmada (Taku ve ark. 1991), buzağı orijinli 208 adet izolatın 31 (% 14.9)'inde IFT ile STa, 45 (% 21.6)'inde de lup testiyle STb saptanmıştır. Wolk ve ark. (1992), 60 buzağı izolatının 35 (% 58.3)'inin, kuzu orijinli 6 suştan 4 (% 66.7)'ünün ELISA ile ST yönünden pozitif bulunduğunu, test edilen tüm suşların aynı yöntemle LT açısından negatif olduğunu bildirmişlerdir. Kuzularda yapılan bir çalışmada Orden ve ark. (2002), 146 *E. coli* suşunun 2 (% 1.4)'sinde PCR ile ST geni belirlenmiştir.

Morato ve ark. (2008), sağlıklı 230 adet ve ishali 70 adet kediden izole ettikleri toplam 300 *E. coli* suşunun tamamını LT ve ST genleri açısından PCR ile negatif bulmuşlardır. Başka bir araştırmada Abaas ve ark. (1989), ishali ve sağlıklı kedilerden izole edilen 48 suşun tamamı Vero hücre kültürü ile LT ve ST yönünden negatif olarak belirlenmiştir. Gastroenteritisli köpeklerde gerçekleştirilen bir çalışmada Prada ve ark. (1991) izole edilen 24 hemolitik *E. coli* suşunun 5 (% 20.8)'inde DNA hibridizasyon tekniğiyle ST belirlenmiş, izolatların tamamı Y1 hücre kültüründe LT açısından negatif bulunmuştur. Holland ve ark. (1999), sağlıklı köpeklerden izole ettikleri 60 izolatın 32 (% 53.3)'sinde PCR ile STa belirlemişlerdir. Aynı yöntemin kullanıldığı başka bir çalışmada Starčić ve ark (2002), köpek orijinli 24 izolatın 4 (% 16.7)'ünde ST tespit edilmiştir. Hammermueller ve ark (1995), ishali köpeklerden izole ettikleri 45 adet *E. coli* suşunun 12'sinde (% 26.7) STap, 2'sinde (% 4.4) STa saptadıklarını, bu suşların tamamının LT yönünden negatif olduğunu, sağlıklı köpeklere ait 57 izolatın ise ST ve LT açısından PCR ve DNA hibridizasyon teknikleri ile negatif bulunduğunu rapor etmişlerdir. İshali köpeklerde gerçekleştirilen diğer bir araştırmada Wasteson ve ark. (1988), 5 hemolitik *E. coli* suşunun tamamı köpek ince barsak ligatür tekniği ile ETEC olarak bulunmuş, suşların 4'ünde ELISA ve DNA hibridizasyon teknikleri ile STa saptanmış, izolatların tamamı LT yönünden aynı tekniklerle negatif bulunmuştur. Vidotto ve ark. (1990), septisemik tavuklardan izole ettikleri 45 *E. coli* suşunun tamamının IFT'nde ST açısından negatif olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada Blanco ve ark. (1997), tavuk orijinli 167 *E. coli* suşunun tamamı LT açısından negatif, septisemik hayvanlardan izole edilen 458 suşun sadece biri (% 0.2) LT yönünden pozitif ve serogruplandırılan 30 izolatın tamamı STa bakımından negatif bulunmuştur. Akashi ve ark. (1993) ishali tavuklardan izole ettikleri 38 *E. coli* suşunun 7'sinde (% 18.4) STb geni

saptamışlardır. Emery ve ark. (1992), 420 septisemik hindi izolatının 24'ünde (% 6) ve 80 septisemik tavuk izolatının 6'sında (% 7) Vero ve Y-1 hücre kültürü tekniğiyle LT belirlediklerini, suşların tamamının ST açısından negatif olduğunu rapor etmişlerdir. Literatür verileri dikkate alındığında evcil hayvanlar arasında *E. coli* suşlarında ST ve LT pozitiflik oranlarının değişken olduğu görülmektedir. Ayrıca, sağlıklı hayvanlarda yapılan çalışmalarda bu toksin tipleri düşük oranlarda saptandığı (Blanco ve ark, 1993; Shin ve ark, 1994; Rajkhowa ve ark, 2009) veya genellikle negatif bulunduğu rapor edilmektedir (Osek ve Winiarczyk, 2001; Güler ve ark, 2008; Morato ve ark, 2008). İshalli hayvanlardan izole edilen suşlarda ise daha yüksek pozitiflik saptandığı bildirilmektedir (Hammermueller ve ark, 1995; Salvadori ve ark, 2003; Rigobelo ve ark, 2006).

İshalli buzağılardaki *E. coli* türlerinin coğrafik alan ve sezondaki insidensinin yüksek önemi Snodgrass ve arkadaşları tarafından 1986 yılında yapılan bir çalışmada ele alınmıştır. Bu çalışmada sezon ve coğrafyanın, buzağılardaki kolostral immunglobulinlerin pasif transferinde etkili rol oynadığını belirtmişlerdir olmaktadır (Snodgrass ve ark, 1986). Özellikle neonatal buzağılarda immunglobulin absorpsiyonunda sezonun buzağı mortalitesine önemli etkisi olduğu bildirilmektedir (Fink, 1980). Kış döneminde buzağılarda *E. coli* türlerinin yüksek oranda görülmesinin muhtemel açıklamalarından birisi de sıcaklık, yağmur, gök gürültülü fırtına gibi iklimsel değişkenler ile birlikte barometrik basınçtaki değişiklikler otonom sinir sistemi üzerine etkili olduğudur. Bu değişkenler immunitiyi etkileyebilmekte ve böylelikle buzağılar enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale gelmektedir. Alternatif olarak başka bir çalışmada, kış mevsiminde *E. coli* türlerinin yüksek oranda görülmesi kışın doğan buzağılarda serum IgG1 konsantrasyonunun düşük olması ile birlikte bahar ve yaz boyunca artması gerçeği ile açıklanabileceği düşünülmektedir (Norheim ve ark, 1985). Afzal ve ark. (1983) ile Sharma ve ark. (1984) yaptığı araştırmalarda kışın doğan buzağılarda görülen mortalitenin (sırasıyla %69,6 ve %15,36) yazın doğanlarda görülen mortaliteye göre (sırasıyla %39,4 ve %5,97) oldukça yüksek görüldüğü bildirilmektedir. Benzer sonuçlar daha önce yapılan bazı çalışmalarda da bildirilmiştir (Bhullar ve Tiwana, 1985; Varma ve ark, 1988). Araştırmamızda ise izole edilen *E. coli* suşlarının mevsimsel olarak kasım_mart ayları arasında toplanmış olması mevsimsel bir geçişi işaret etmektedir.

Herrera-Luna ve ark. (2009) tüm Avusturya'daki sürülerde sağlıklı ve ishalli buzağların %17'sinin *E. coli* ile enfekte olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca *E. coli* suşlarının da %15,2'sinin stx1, stx2, ehly ve eae genlerini içeren shiga toksin genlerini barındırdıklarını bildirmektedir. Irak, Najaf'ta bulunan ishalli buzağların *E. coli* suşlarının VTEC fenotipi ve O157:H7 serotiplerinin düşük insidensli olduğuda başka bir çalışmada bildirilmektedir (Al-

Charraikh ve Al-Muhana, 2010). Yapılan bir çalışmada K99 fimbria, stA enterotoksin, stx1 ve eae genleri sırasıyla 8, 8, 1 ve 1 izolat olarak belirlenirken herhangi bir cnf1, cnf2, stx2, stBand genlerine rastlanılmamıştır (Bradford ve ark, 1999). Başka bir çalışmada Salmonella ve Campylobacter türlerini içeren diğer etkenlerin prevalansı sırasıyla %2 ve %11 iken, *E. coli* ile enfekte buzağların %76 olduğu bildirilmektedir. Ayrıca aynı çalışmada ishalleri buzağların 22/55 (% 40) ve sağlıklı buzağların 14/88 (%16) K99 adhesin taşıdığı (P=0,001) bildirilmektedir (Acha ve ark, 2004). Araştırmamızda ise biyokimyasal testler ve karbonhidrat fermentasyon testleri ile *E. coli* olarak adlandırılan isolatların hepsi, uidA geni saptanması ile *E. coli* olarak tür bazında doğrulanmıştır. Böylelikle ishalleri buzağlarda izole edilen *E. coli* suşlarının predominant olduğu saptanmaktadır.

Literatür verileri dikkate alındığında evcil hayvanlar arasında *E. coli* suşlarında ST ve LT pozitiflik oranlarının değişken olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, sağlıklı hayvanlarda yapılan çalışmalarda bu toksin tipleri düşük oranlarda saptandığı (Shin ve ark, 1994; Blanco ve ark, 1993; Rajkhowa ve ark, 2009) ve/veya genellikle negatif bulunduğu bildirilmektedir (Osek ve Winiarczyk, 2001; Güler ve ark, 2008; Morato ve ark, 2008). İshalleri hayvanlardan izole edilen suşlarda ise daha yüksek pozitiflik saptandığı çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir (Hammermueller ve ark, 1995; Rigobelo ve ark, 2006; Salvadori ve ark, 2003). İshalleri hayvanlardan izole edilen *E. coli* suşlarının kullanıldığı bu çalışmada ishalleri örneklerden izole edilen 47 *E. coli* suşunda sadece 1 adet suş enterotoksijenik olarak saptanmıştır. Böylelikle izole edilen *E. coli*'lerin diğer serotiplerinden (enteroinvaziv, enteropatojenik, shiga-toksijenik yada diğer etkenler) kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

E. coli suşlarındaki çoklu ilaç direnci önceki çalışmalarda bildirilmektedir (Khan ve ark, 2002; Rigobelo ve ark, 2006; Dolejska ve ark, 2008). Rigobelo ve ark. (2006) yapmış olduğu çalışmada *E. coli* suşlarının en çok Sefalotin'e (% 46,1) dirençli olduğu ve bunu takiben de Tetrasiklin (% 45,7), Trimetoprim-sulfadiazin (% 43,3) ve Ampisilin'e (% 41) dirençli olduğu saptanmıştır. *E. coli* isolatlarının geniş etkili Aminoglikozidler, Sefalosporinler, Tetrasiklin, Sulfanomidler ve Florokinolonları içeren beta laktamlı antibiyotiklere karşı çoklu direnci bulunduğu önceki çalışmalarda bildirilmektedir (Bradford ve ark, 1999; Van den Bogaard, 2000). De Verdier ve ark. (2012) yapmış olduğu çalışma sonucunda *E. coli* suşlarının Sulfanomid, Streptomisin, Ampisilin ve Tetrasikline dirençli olduğu saptanmış olup aynı zamanda tüm suşların % 61'inin birden fazla antibiyotiğe karşı dirençli olduğu bildirilmektedir. Benzer araştırmalar İsveç'te (De Verdier ve ark, 2012), Birleşik Devletler'de (Berge ve ark, 2010) de yapılmıştır. *E. coli* septisemilerine bağlı buzağı ishallerinde prognoz, sağaltıma ne kadar erken başlanıldığı ve buzağıya bağlı olarak

değişmektedir. Ayrıca uygun olmayan antibiyotiklerin seçilmesi, antibiyotiğe direnç oranını arttırabileceği bir sürpriz olmamakla beraber araştırmamızda da bazı antibiyotiklere karşı % 80'in üzerinde direnç tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki *E. coli* suşlarının Penisilin G ve Eritromisin'e (% 100), Tetrasiklin'e ve Trimetoprim-Sulfometoksazol'e % 80, Kanamisin'e ise % 76.5 direnç oranı saptanmıştır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmamız sonucunda 50 adet ishalleri buzağıdan toplanan rektal svap numunelerinden yapılan izolasyon ve identifikasyon çalışmaları sonucunda toplam 47 adet *E. coli* suşu identifiye edilmiştir. Standart biyokimyasal testler sonucu *E. coli* olarak adlandırılan izolatların kontrol geni olan *E. coli uidA* ile moleküler olarak doğrulanması ile birlikte söz konusu genin saha izolatlarından pozitif olarak bulunduğu *E. coli* identifikasyonunda hızlı ve güvenilir sonuç verdiği ortaya konulmuştur. *E. coli* olarak moleküler bağlamda doğrulanan saha suşları, ETEC est1b gen varlığı açısından tekrar PCR testine tabi tutulmuş, sonuç olarak sadece 1 adet enterotoksijenik *E. coli* identifiye edilmiştir.

Ayrıca izole edilen *E. coli* suşlarında çoklu antibiyotik direnci geliştiği ve elde edilen bulgular doğrultusunda buzağı ishallerinden izole edilen *E. coli* suşlarında ciddi oranda antibiyotik direnci ortaya konmuştur. Gentamisin'e karşı elde edilen yüksek duyarlılık oranının, ilgili antibiyotiğin nefrotoksik etkisi nedeniyle buzağılarda kullanılmadığından dolayı meydana geldiği kanaatine varılmıştır. Saha suşlarına karşı kullanılabilecek etkili antibiyotikler olarak Amoksisilin-Klavulanik asit kombine preparatı ve Sefaperazon (3. kuşak) belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abaas S, Franklin A, Kühn I, Orskov F, Orskov I.** Cytotoxin activity on vero cells among *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in cats. *Am J Vet Res*, 1989; 50 (8): 1294-1296.
- Achá SJ, Kühn I, Jonsson P, Mbazima G, Katouli M, Möllby R.** Studies on calf diarrhoea in Mozambique: prevalence of bacterial pathogens. *Acta Vet Scand* 2004, 45(1–2):27–36.
- Afzal M, Javed MH, Anjum AD.** Calf mortality: seasonal pattern, age distribution and causes of mortality. *Pak Vet J*, 1983, 3:30–33.
- Akashi N, Hitotsubashi S, Yamanaka H, Fujii Y, Tsuji T, Miyama A, Okamoto K.** Production of heat-stable enterotoxin II by chicken clinical isolates of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 109:311-316.
- Al-Charrakh A, Al-Muhana A.** Prevalence of Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in a survey of dairy cattle in Najaf, Iraq. *Iranian J Microbiol*, 2010, 2:128–134.
- Anonim 1.** <http://news.stv.tv/tayside/230393-higher-than-usual-number-of-ecoli-cases-sparks-probe-and-warning/>. Erişim Tarihi: 17.10.2016.
- Anonim 2.** <http://www.shutterstock.com/video/clip-3949175-stock-footage-escherichia-coli-bacteria-e-coli-under-microscope-magnification-x.html>. Erişim Tarihi: 17.10.2016.
- Argenzio RA.** Pathophysiology of neonatal calf diarrhea. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 1985, 1(3):461-469.
- Ballmer K, Korczak BM, Kuhnert P, Slickers P, Ehricht R, Hachler H.** Fast DNA serotyping of *Escherichia coli* by use of an oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(2):370-379.
- Beam AL, Lombard JE, Kopral CA, Garber LP, Winter AL, Hicks JA.** Prevalance of failure of passive transfer immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. *J Dairy Sci*, 2009, 92(8):3973-3980.
- Berge AC, Hancock DD, Sisco WM, Besser TE.** Geographic, farm, and animal factors associated with multiple antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from cattle in the western United States. *J Am Vet Med Assoc*, 2010, 236(12):1338–1344.
- Bhullar MS, Tiwana MS.** Factors affecting mortality among buffalo calves. *Indian J Anim Sci*, 1985, 55:599–601.
- Blanco M, Blanco J, Blanco JE, Ramos J.** Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am J Vet Res*, 1993, 54(9): 1446-1451.

- Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J.** Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: Relationship with in vivo pathogenicity. *J Clin Microbiol*, 1997;35 (11): 2953-2957.
- Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, Alonso MP, Varela G, Gadea MP, Schelotto F, González EA, Blanco J.** Typing of intimin (eae) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (muB and xiR/beta2B). *J Med Microbiol*, 2006, 55(9):1165-1174.
- Boynukara B, Solmaz H, Akgül Y, Aksakal A.** Yeni doğan buzağların dışkılarında *E. coli* ve *E. coli* K99'un varlığı ile neonatal buzağı ishallerinin önlenmesinde oral Spektinomisin (Pentahidrat Dihidroklorit)'in etkisi. *Bültendif*, 2000, 14:2-5.
- Bradford PA, Petersen PJ, Fingerman IM, White DG.** Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in *E. coli* isolates associated with bovine calf diarrhoeal disease. *J Antimicrob Chemother*, 1999, 44(5):607-610.
- Brenner J, Elad D, Van Hamm M, Markovic A, Perl S.** Microbiological and pathological findings in young calves suffering from neonatal diseases. *Isr J Vet Med*, 1995, 50:21-24.
- Busato A, Lentze T, Hofer D, Burnens A, Hentrich B, Gaillard C.** A case control study of potential enteric pathogens for calves, raised in cow-calf herds. *J Vet Med B*, 1998, 45:519-528.
- Carroll PJ, Woodward MJ, Wray C.** Detection of LT and STIa toxins by latex and EIA tests. *Vet Rec*, 1990, 1237, 335-336.
- Chandra M, Cheng P, Rondeau G, Porwollik S, McClellandb M.** A single step multiplex PCR for identification of six diarrheagenic *E. coli* pathotypes and Salmonella. *Int J. Med. Microbiol*, 2013, 303:210-216.
- Clements A, Yoereyung JC, Constantiniu N, Frankel G.** Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 2012, 3, 71-87.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved standard-Ninth Edition (M2-A9). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
- Çabalar M, Boynukara B, Gülhan T, Ekin IH.** Prevalence of Rotavirus, *Escherichia coli* K99 and O157:H7 in healthy dairy cattle herds in Van, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 2001, 25:191-196.
- Dasgupta A, Dastidar SG.** Antibacterial & antitoxic effects of the cardiovascular drug lacidipine in an animal model. *Indian J Med Res*, 2012, 135(6): 913-916.

- De Verdier K, Nyman A, Greko C, Bengtsson B.** Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. *Acta Vet Scand*, 2012, 54(1):2.
- DebRoy C, Maddox CW.** Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Anim Health Res Rev*, 2001, 1:129-140.
- Dolejšká M, Senk D, Cízek A, Rybářiková J, Sychra O, Literák I.** Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in cattle and house sparrows on two Czech dairy farms. *Res Vet Sci*, 2008, 85(3):491–494.
- Emery DA, Nagaraja KV, Shaw DP, Newman JA, White DG.** Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis*, 1992, 36: 504-511.
- Emre Z, Alabay M, Fidancı H, Düzgün A, Çerçi H.** Prevalence of *Cryptosporidium spp.* infection and its relation to other enteric pathogens (*Escherichia coli* K 99 and rotavirus) in cattle in Ankara. Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 1998, 22:453-458.
- Erdoğan HM, Ünver A, Arslan MÖ, Çitil M, Güneş V.** Neonatal buzağı hastalıkları. V. *Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi*, 2-5 Temmuz 2003, Van.
- Erganiş O, Ateş M, Çorlu M, Kaya O.** Konya bölgesindeki ishalleri buzağılardan izole edilen *E. coli*'lerin biyokimyasal, hemagglütinasyon, mannoz rezistan hemagglütinasyon ve enteropatojenik özellikleri üzerinde araştırmalar. *Doğa Türk Vet Hay Derg*, 1989, 13(2):108-122.
- Fecteau G, Smith BP, George LW.** Septicemia and meningitis in the newborn calf. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2009, 25(1):195-208.
- Fink T.** Influence of type of housing, microclimate and management on health of calves. *Hannover: Inaugural Disser Tierärztliche Hochschule*; 1980.
- Gay CC, Besser TE.** *Escherichia coli* septicemia in calves. In: Gyles CL, ed. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallingford; 1994;75-90.
- Green D, Rademaker AW, Briët E.** A prospective, randomized trial of prednisone and cyclophosphamide in the treatment of patients with factor VIII autoantibodies. *Thromb Haemost*, 1993, 70:753.
- Gulliksen SM, Jor E, Lie KI, Loken T, Akerstedt J, Osteras O.** Enteropathogens and risk factors for diarrhea in norwegian dairy calves. *J Dairy Sci*, 2009, 92:5057–5066.
- Güler L, Gündüz K, Ok U.** Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from calves in Turkey. *Zoonoses Public Hlth*, 2008, 55:249-257.
- Gülhan T, Boynukara B, Alişarlı, M.** Typing of verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from animal and human sources. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2009, 15(2): 181-184.

- Hall JO.** Nephrotoxicity of Easter lily (*Lilium longiflorum*) when ingested by the cat. *Proc Am Coll Vet Intern Med Forum*, 1992, 6(2):121.
- Hammermueller J, Kruth S, Prescott J, Gyles C.** Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Can J Vet Res*, 1995, 59: 265-270.
- Herrera-Luna C, Klein D, Lapan G, Revilla-Fernandez S, Haschek B, Sommerfeld-Stur I, Moestl K, Baumgartner W.** Characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy calves in Austria shedding various enteropathogenic agents. *Vet Med*, 2009, 54:1–11.
- Hofmann SL.** Retinoids "differentiation agents" for cancer treatment and prevention. *Am J Med Sci*, 1992, 304(3):202-213.
- Holland RE, Walker RD, Sriranganathan N, Wilson RA, Ruhl DC.** Characterization of *Escherichia coli* isolated from healthy dogs. *Vet Microbiol*, 1999, 70:261-268.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MS, 1994, 179.
- Hossain MT, Siddique MP, Hossain FMA, Zinnah MA, Hossain MM, Alam MK, Choudury KA.** Isolation, identification, toxin profile and antibiogram of *Escherichia coli* isolated from broilers and layers in Mymensingh district of Bangladesh. *Bangl J Vet Med*, 2008, 6(1):1-5.
- House AM, Irsik M, Shearer JK.** Sepsis, Failure of Passive Transfer, and Fluid Therapy in Calves. Veterinary Medicine-Large Animal Clinical Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida; 2011.
- İstanbulluoğlu E.** Septicaemia neonatorumlu buzağılardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının biyokimyasal, serolojik, enterotoksijenik, antibiyotiklere duyarlılık, bulaşıcı tip plasmid (R-faktör) taşıma özellikleri ile infekte ve normal buzağılardan elde edilen serum örneklerinin immünoglobulin miktarları (IgG, IgA) üzerinde incelemeler. Doçentlik Tezi, Ankara, 1978.
- İzgür M.** Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ed. (Aydın N, Paracıkoğlu J) İlke Emek Yayınları, Ankara, 2006; s.109-115.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2:123-140.

- Khan A, Das SC, Ramamurthy T, Sikdar A, Khanam J, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB.** Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources in Calcutta, India. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(6):2009–2015.
- Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF.** Sepsis, Septic Shock, and Systemic Inflammatory Response Syndrome. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF, eds. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 18th ed. Philadelphia: Saunders 2007; s.1094-1099.
- Koneman EW, Allen SD, Jonda WM, Schreckenber PC, Winn WC Jr.** Enterobacteriaceae, *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th ed., Lippincott Company, Philadelphia, Newyork, 1997, 171-241.
- Lofstedt J, Dohoo IR, Duizer G.** Model to predict septicemia in diarrheic calves. *J Vet Intern Med*, 1999, 13(2):81-88.
- Lundborg K.** Housing, management and health in Swedish dairy calves. Department of Animal Environment and Health. Skara, Sweden. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, 2004.
- Mainil JG, Bex F, Jacquernin E, Pohl P, Couturier M, Kaeckenbeeck A.** Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P, and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am J Vet Res*, 1990, 51:187-190.
- Majali AM, Asem EK, Lamar CH, Robinson JP, Freeman MJ, Saeed AM.** Studies on the mechanism of diarrhoea induced by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) in newborn calves. *Vet Res Com*, 2000, 24:327-338.
- Mills KW, Tietze KL.** Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay for identification of K99-positive *Escherichia coli* isolates from calves. *J Clin Microbiol*, 1984, 19(4): 498- 501.
- Morato EP, Leomil L, Beutin L, Krause G, Moura RA, Pestana de Castro AF.** Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. *Zoonoses Public Hlth*, 2009, 14:1-9.
- Naylor JM.** A retrospective study of the relationship between clinical signs and severity of acidosis in diarrheic calves. *Can Vet J*, 1989, 30(7):577-580.
- Norheim K, Simensen E, Gjestang KE.** The relationship between serum IgG levels and age, leg injuries, infections and weight gains in dairy calves. *Nordisk Vet Med*, 1985, 37:113-120.
- Ok M, Güler L, Turgut K, Ok U, Sen I, Gündüz IK.** The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoonoses Public Health*, 2009, 56(2):94-101.

- Orden JA, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Cid D, Fuente RD.** Presence and enterotoxigenicity of F5 and F41 *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic small ruminants in Spain. *Small Rum Res*, 2002, 44:159-161.
- Osek J, Winiarczyk S.** Prevalence of eae and shiga toxin genes among *Escherichia coli* strains isolated from healthy calves. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2001, 48: 67-72.
- Prada J, Baljer G, Rycke JD.** Characteristics of alphahemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from dogs with gastroenteritis. *Vet Microbiol*, 191, 29 (1): 59-73.
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW.** Veterinary Medicine: A Textbook of the Disease of Cattle, Sheep, Pigs, Goats, and Horses. 9th ed. WB Saunders, London; 1999.
- Rajkhowa S, Hussain I, Rajkhowa C.** Detection of heat-stable and heat-labile enterotoxin genes of *Escherichia coli* in diarrheic fecal samples of mithun (*Bos frontalis*) calves by polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol*, 2009, 106:455-458.
- Rigobelo EC, Gamez HJ, Marin JM, Macedo C, Ambrosin JA, Avila FA.** Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 2006, 58:305-310.
- Salvadori MR, Valadares GF, da Silva LD, Blanco J, Yano T.** Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Braz J Microbiol*, 2003, 34(3):230–235.
- Scotland SM, Flomen RH, Rowe B.** Evaluation of a reversed passive latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* heat-labile toxin in culture supernatants. *J Clin Microbiol*, 1989, 27 (2): 339-340.
- Sharma MC, Pathak NN, Hung NN, Lien NH, Vuc NV.** Mortality in growing Murrah buffalo calves in Vietnam. *Indian J Anim Sci*, 1984, 54:998–1000.
- Shin SJ, Chang YF, Timour M, Lauderdale TL, Lein DH.** Hybridization of clinical *Escherichia coli* isolates from calves and piglets in New York State with gene probes for enterotoxins (STaP, STb, LT), shiga-like toxins (SLT-1, SLT-11) and adhesion factors (K88, K99, F41, 987P). *Vet Microbiol*, 1994, 38:217-225.
- Snodgrass DR, Terzolo HR, Sherwood D, Campell I, Menzies JD.** Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet Rec*, 1986, 119:31-34.
- Starčič M, Johnson JR, Stell AL.** Haemolytic *Escherichia coli* isolated from dogs with diarrhea have characteristics of both uropathogenic and necrotoxigenic strains. *Vet Microbiol*, 2002, 85:361- 377.

- Taku A, Purohit VD, Sharma VK, Upadhyay SN.** Detection of K99 and F41 fimbria on ST enterotoxin producing *Escherichia coli* from calves. *Indian J Anim Sci*, 1991, 61(3):246-248.
- Thorns CJ, Bell MM, Chasey D, Chesham J, Roeder PL.** Development of monoclonal antibody ELISA for simultaneous detection of bovine coronavirus, rotavirus serogroup A, and *Escherichia coli* K99 antigen in feces of calves. *Am J Vet Res*, 1992, 53(1):36-43.
- Turgut K.** Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis. Genişletilmiş 2. Baskı, Bahçivanlar Basım Sanayi AŞ, Ankara, 2000.
- Urban RG, Pipper EM, Dreyfus LA, Whipp C.** High-level production of *Escherichia coli* STb heat-stable enterotoxin and quantification by a direct enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 1990, 28:2383-2388.
- Van den Bogaard A.** Veterinary use of antibiotics in the Netherlands. Facts and numbers. *Tijdschr Diergeneeskd* 2000, 125:527–530.
- Varma AK, Sastry NSR, Kar D.** Mortality trends in female Murrah buffalo calves. *Indian J Anim Product Managem*, 1988, 4:18–21.
- Vidotto MC, Müller EE, Freitas JC, Alfieri AA, Guimarães IG, Dantos DS.** Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis*, 1990, 34(3): 531-538.
- Wasteson Y, Olsvik O, Skancke E, Bopp CA, Fossum K.** Heatstable-enterotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dogs. *J Clin Microbiol*, 1988, 26: 2564-2566.
- Weldon AD, Moise NS, Rebhun WC.** Hyperkalemic atrial standstill in neonatal calf diarrhea. *J Vet Intern Med*, 1992, 6(5): 294-297.
- Wolk M, Ohad E, Shpak B, Adler H, Nahari N.** A survey of enterotoxigenic *Escherichia coli* from calves and lambs in the region of the Western Galilee in Israel during winter 1989-90. *Isr J Vet Med*, 1992, 47:7-10.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : AŞCI, İhsan Barış
Uyruk : T.C
Doğum yeri ve tarihi : Ankara, 01.03.1978
Telefon : 05434016523
E-mail : bazil_09@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	AÜ Veteriner Fakültesi	08/2000
Lise	Sütlühisar Lisesi	07/1995

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2001-2005	Vedat Çiftçi Üretim Çiftliği	Sorumlu Veteriner Hekim
2005-Halen	Yöre Veteriner Polikliniği	Veteriner Hekim