

Hayvan Orijinli *Escherichia coli* Suşlarının Enterotoksin Tiplerinin (LT, ST) Belirlenmesi

Timur GÜLHAN Ziya İLHAN Abdülbaki AKSAKAL
Hasan SOLMAZ İsmail Hakkı EKİN

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Van, Türkiye

Geliş tarihi: 24.04.2009

Kabul Tarihi: 21.05.2009

ÖZET

Bu çalışmada, farklı hayvan türlerinin (koyun 20, buzağı 18, köpek 16, bıldırcın 15, sığır 14, devekuşu 12, kuzu 11, martı 10, tavuk 10, hindi 9, kedi 8 ve güvercin 7) dışkılarından izole edilmiş ve tavşan ince barsak ligatür tekniğiyle enterotoksijenik olduğu belirlenmiş olan 150 enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC) suşunun enterotoksin tiplendirilmesi amaçlandı. Isıya dirençli (ST) toksin tipinin saptanmasında *E. coli* ST enzim immunoassay (EIA), ısıya duyarlı (LT) toksin tipinin belirlenmesinde ise VET-RPLA ticari kitleri kullanıldı. ETEC pozitif 150 *E. coli* suşunun koyun 1 (%5) ST, 1 (%5) LT; buzağı 6 (%33.3) ST; köpek 1 (%6.2) LT; bıldırcın 1 (%6.7) LT; sığır 1 (7.1) ST; kuzu 1 (%9.1) ST, 1 (%9.1) LT ve kedi orijinli 1 (%12.5) ST olmak üzere 10 (%6.7) tanesi ST ve 4 (%2.6) tanesi de LT açısından pozitif bulundu. Devekuşu, martı, tavuk, hindi ve güvercinlerden izole edilen ETEC suşlarının hiçbirinde ST ve LT saptanmadı. Sonuç olarak martı, bıldırcın, deve kuşu ve güvercin gibi kanatlı hayvan türlerinden izole edilen *E. coli* suşları ısıya dirençli ve ısıya duyarlı enterotoksin tipleri açısından ülkemizde ilk kez bu çalışma ile incelendi.

Anahtar Kelimeler

ETEC, ELISA, Lateks aglütinasyon, ST, LT, Hayvan

The Determination of Enterotoxin Types (LT, ST) of *Escherichia coli* Strains of Animal Origin

SUMMARY

In this study, enterotoxin typing of 150 enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) strains isolated from various animal feces (20 sheep, 18 cow, 16 dog, 15 quail, 14 cattle, 12 ostrich, 11 lamb, 10 gull, 10 chicken, 9 turkey, 8 cat and 7 pigeon) and determined to be enterotoxigenic by rabbit ligated intestine test were performed. For this purpose commercial kits were used. Stable toxin (ST) and labile toxin (LT) were determined by *E. coli* ST EIA and VET-RPLA test kits, respectively. Out of 150 ETEC positive *E. coli* strains ten (6.7%) were found to be positive for ST and four isolates (2.6%) for LT, one (5%) from sheep for ST and 1 (5%) for LT; 6 (33.3%) from cow for ST; 1 (6.2%) from dog for LT; 1 (6.7%) from quail for LT; 1 (7.1%) from bovine for ST; 1 (9.1%) from lamb for ST, 1 (9.1%) for LT; 1 (12.5%) from cat for ST. ETEC strains from ostrich, gull, chicken, turkey and pigeon were found to be negative for ST and LT. As a result, with this study, heat stable and heat labile enterotoxin types of *E. coli* strains isolated from animal species such as gull, quail, ostrich and pigeon were examined for the first time in Turkey.

Key Words

ETEC, ELISA, Latex agglutination, ST, LT, Animal

GİRİŞ

Escherichia coli memeli ve kanatlıların normal barsak florasında bulunan, Gram negatif, çomak şeklinde çoğunlukla hareketli, aerobik/fakültatif anaerobik üreyen bir mikroorganizmadır. Patojen olmayan suşlar genellikle enfeksiyona sebep olmazken, patojen suşlar ciddi enfeksiyonlara sebep olabilirler. Enterotoksijenik suşlar insanlarda gastroenteritis ve turist diyarelerine, hayvanlarda ise ürogenital sistem enfeksiyonları, kolibasilozis 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 oynamaktadır (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 olduğu için özellikle sağlıklı hayvanlarda patojen etkenlerin önceden belirlenmesi ve tedavi edilmesi önem arz etmektedir (Boynukara ve ark. 2004; Morato ve ark. 2008; Rajkhowa ve ark. 2009).

E. coli suşlarında patojeniteyi belirleyen önemli özelliklerden birisi enterotoksin sentezidir. 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 sentezlemektedirler. Enterotoksin tipi hayvan türlerine göre farklılık göstermektedir. LT daha çok buzağı ve sığır orijinli suşlarda sentezlenirken; ST sentezi ise türlere göre

değişkenlik göstermektedir (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 benzerdir. LT, LT-I ve LT-II olmak üzere iki alt tipe ayrılmaktadır. Bu toksin barsak villus epitel hücrelerinde siklik adenozin monofosfat artışı klor salınımını uyararak, sodyum klorür emilimini engellemektedir. Böylece, kript hücrelerinde sodyum sekresyonu artmakta, 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 sahip olup, immunojenitesi daha zayıftır. ST, ST_A (ST-I) ve ST_B (ST-II) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadır. ST_A'nın tespitinde infantil fare testi (İFT), ST_B'nin belirlenmesinde ise domuz barsak ligatür testi en yaygın kullanılan yöntemlerdir. ST_A, siklik guanozin monofosfat seviyelerinde artışa neden olarak guanilat siklazı aktive etmektedir. ST_A'nın; LT, adheziv faktörler ve antibiyotiklere dirençlilik gibi farklı kombinasyonları içeren genleri taşıyan plazmidlerce kodlandığı belirlenmiştir (Erganiş ve ark. 1989; Majali ve ark. 2000; Hossain ve ark. 2008).

Bu çalışmada; koyun, buzağı, köpek, bildırcın, sığır, devekuşu, kuzu, martı, tavuk, hindi, kedi ve güvercin gibi farklı hayvan türlerinden izole edilen enterotoksijenik *E. coli* suşlarında ST ve LT enterotoksin tiplerinin belirlenmesi amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Enterotoksijenik E. coli suşları: Araştırmada, 1998-2001 yılları arasında Van ili ve çevresindeki sağlıklı görünen koyun, buzağı, köpek, bildırcın, sığır, devekuşu, kuzu, martı, tavuk, hindi, kedi ve güvercin dışkılarından izole edilen ve tavşan ince barsak ligatür tekniğinde enterotoksijenik olarak tespit edilmiş olan (Gülhan 2003) toplam 150 adet ETEC suşu materyal olarak kullanıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Enterotoksijenik *E. coli* suşlarının hayvan türlerine göre dağılımı

Table 1. Distribution of enterotoxigenic *E. coli* strains by animal species

Hayvan Türü	Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
Koyun	20
Buzağı	18
Köpek	16
Bıldırcın	15
Sığır	14
Kuzu	11
Kedi	8
Devekuşu	12
Martı	10
Tavuk	10
Hindi	9
Güvercin	7
Toplam	150

Besi yerleri ve suplementler: ETEC suşlarında enterotoksin tiplerinin (LT ve ST) saptanmasında CA-YE broth (Oxoid), polymyxin B sülfat (Oxoid) ve Mundell's besiyerinden (Oxoid) yararlanıldı (Oxoid Manual 2006).

ELISA ve lateks aglütinasyon test kitleri: ETEC suşlarında stabil toksin tespitinde kompetatif Enzyme Immunoassay (*E. coli* ST EIA, Oxoid, TD0700A), labil toksinin belirlenmesinde ise pasif reverz lateks aglütinasyon (VET-RPLA, Oxoid, TD0920A) test kitleri kullanıldı (Oxoid Manual 2006).

Metot

ST'in belirlenmesi: ST'nin tespitinde, suşlar CA-YE brotha ekilip 37 °C'de 18-24 saat çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda kültürler 900 g'de 30 dk santrifüj edilip ayrılan süpernatantlar testte örnek olarak kullanıldı. Çalışma reagentleri (antikor-enzim konjugat solusyonu, yıkama tamponu, substrat solusyonu), test prospektüsünde belirtildiği gibi kullanıma hazırlandı. Striplerin (16 kuyucuklu) ilk üç kuyucuğu pozitif, negatif ve steril kültür medium kontrolleri için ayrıldı. Teste başlarken, her stripdeki kuyucukların içeriği boşaltılıp her göz yıkama tamponu ile yıkanarak sıvı tamamen ortamdan uzaklaştırıldı. Birinci, ikinci ve üçüncü kuyucuklara sırasıyla 200'er µl negatif, pozitif ve steril kültür medium kontrolleri konuldu. Geriye kalan kuyucukların her birine test edilecek bakterinin kültür süpernatantından 200 µl bırakıldı. Tüm kuyucuklara 10 µl sulandırılmış antikor-enzim konjugat solusyonundan eklendi. Mikropleyter oda ısısında 90 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda tüm kuyucuklardaki sıvı aspire edilerek boşaltıldı. Tüm kuyucuklara 200'er µl sulandırılmış yıkama tamponu eklenip, 30 sn karıştırıldıktan sonra sıvı aspire edildi ve yıkama işlemi aynı şekilde 4 kez tekrarlandı. Tüm kuyucuklara 100'er µl substrat solusyonundan ilave edilip, karıştırıldıktan sonra pleyter oda ısısında 30 dk bekletildi ve renk oluşumu çıplak gözle değerlendirildi. Renk oluşuktan sonra her kuyucuğa 100'er µl durdurucu solüsyon eklenerek test sonlandırıldı. Pozitif kontrol kuyucuğunda renk oluşmaması, negatif ve kültür medium kontrol kuyucuklarında sarı renk oluşması testin doğru olarak yapıldığını gösterdi. Her örneğin renk yoğunluğu üç kontrol ile karşılaştırılarak incelendi. Pozitif kontrole yakın yoğunluğa sahip örnekler pozitif, negatif kontrole yakın yoğunluğa sahip örnekler negatif olarak değerlendirildi (Oxoid Manual 2006).

LT'in belirlenmesi: LT'nin belirlenmesi amacıyla *E. coli* suşları Mundell's besiyerine ekilip, 37 °C'de 18-24 saat çalkalanarak inkübe edildi. Sıvı kültürlerin üzerine polymixin B (10.000 IU/ml) ilave edilip 37 °C'de 4 saat bekletildi. İnkübasyondan sonra kültürler 900 g'de 20 dk santrifüj edilip süpernatantlar kullanılmak üzere ayrıldı. Test V tabanlı (8x12=96 kuyucuklu) mikropleyterde gerçekleştirildi. Lateks ve kontrol reagentleri sulandırılıp kullanıma hazırlandı. Her bir kuyucuğuna 25'er µl sulandırma solusyonundan bırakıldı. Birinci kuyucuğa test edilecek bakterinin süpernatantından 25 µl ilave edilip, kuyucuklar arasında 25 µl sıvı aktarımı yapılarak çift katlı sulandırmalar elde edildi. Tüm kuyucuklara 25'er µl duyarlılaştırılmış lateks reagentinden eklendikten sonra oda ısısında 20-24 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda meydana gelen aglütinasyonlar kontrol lateksi ve pozitif kontrol suşların kullanıldığı kuyucuklarla karşılaştırılarak değerlendirildi (Oxoid Manual 2006).

BULGULAR

Koyun orijinli 20 suşun 1'i (%5) ST, 1'i (%5) LT; buzağılardan izole edilen 18 suşun 6'sı (%33.3) ST; 16 köpek izolatının 1'i (6.2) LT; bildircin orijinli 15 suşun 1'i (%6.7) LT; 14 sığır izolatının 1'i (7.1) ST; kuzu orijinli 11 suşun 1'i (%9.1) ST, 1'i (%9.1) LT; kedilerden izole edilen 8 ETEC suşunun 1'i (%12.5) ST açısından pozitif bulundu. Devekuşu, martı, tavuk, hindi ve güvercinlerden izole edilen ETEC suşlarının hiçbirinde ST ve LT saptanamadı. Böylece 150 ETEC suşundan 10'u (%6.7) ST, 4'ü (%2.7) de LT olmak üzere toplam 14'ünün (%9.3) enterotoksin tipi belirlenmiş oldu (Tablo 2).

Tablo 2. Hayvan türlerine göre stabil ve labil toksin tiplerinin dağılımı

Table 2. Distribution of stabile and labile toxin types by animal species

Hayvan Türü (n)	ST (%)	LT (%)	Tiplendirilemeyen (%)
Koyun (20)	1 (5)	1 (5)	18 (90)
Buzağı (18)	6 (33.3)	-	12 (66.7)
Köpek (16)	-	1 (6.2)	15 (93.8)
Bildircin (15)	-	1 (6.7)	14 (93.3)
Sığır (14)	1 (7.1)	-	13 (92.9)
Kuzu (11)	1 (9.1)	1 (9.1)	9 (81.8)
Kedi (8)	1 (12.5)	-	7 (87.5)
Devekuşu (12)	-	-	12 (100)
Martı (10)	-	-	10 (100)
Tavuk (10)	-	-	10 (100)
Hindi (9)	-	-	9 (100)
Güvercin (7)	-	-	7 (100)
Toplam (150)	10 (6.7)	4 (2.6)	136 (90.7)

TARTIŞMA ve SONUÇ

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, RIA, immunoblot ve farklı PCR teknikleri ile ortaya konabilmektedir (Scotland ve ark. 1989; Carroll ve ark. 1990; 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. Bu çalışmada, ETEC suşlarında LT'in belirlenmesinde pasif reverz lateks aglutinasyon testi, ST'in tespitinde ise kompetatif EIA tekniği kullanıldı.

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. 1993b; 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. 1993b), ishali 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)'inde 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), ishali buzağılardan izole edilen 250 *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 ishali buzağılarda yüksek oranda ST (%25.4) ve LT (%13.2) geni taşıyıcılığı saptanmıştır.

Ülkemizde gerçekleştirilen bir araştırmada (Güler ve ark. 2008), farklı çiftliklerdeki ishali buzağılara ait dışkılarından izole edilen 75 *E. coli* suşunun 12'si (%16) enterotoksijenik 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 *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 izolatın 31 (%14.9)'ünde IFT ile STa, 45 (%21.6)'ünde de lup testiyle STb saptanmıştır. Wolk ve ark. (1992), 60 buzağı izolatının 35 (%58.3)'ünün, 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. Blanco ve ark. (1996) ishali kuzulardan izole ettikleri 144 *E. coli* suşunun 2 (%1.4)'sinde LT saptamışlardır.

Morato ve ark. (2008), sağlıklı 230 ve ishali 70 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. Benzer bir çalışmada (Blanco ve ark. 1993a), sağlıklı kedilerden izole edilen 159 *E. coli* suşunun tamamı Vero ve HeLa hücre kültürlerinde LT açısından negatif olarak bulunmuştur. Maselmeh ve ark. (1990), kedi ve köpeklerden izole ettikleri 281 suşun 40 (%14.2)'inde DNA hibridizasyon tekniği ile ST, 22 (%7.8)'sinde ise Y1 hücre kültürü ile LT saptadıklarını bildirmişlerdir. 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 *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 İFT'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.

Bu araştırmada, 20 koyun, 18 buzağı, 16 köpek, 15 bildircin, 14 sığır, 12 devekuşu, 11 kuzu, 10 martı, 10 tavuk, 9 hindi, 8 kedi ve 7 güvercin olmak üzere sağlıklı hayvanların dışkılarından izole edilmiş ve tavşan ince barsak ligatür tekniğinde enterotoksijenik bulunmuş olan 150 ETEC suşunun enterotoksin tiplendirilmesi yapıldı. LT enterotoksin tipi VET-RPLA, ST enterotoksin tipi ise *E. coli* ST EIA ticari kitleriyle incelendi. Koyun orijinli 20 suşun 1'i (%5) ST, 1'i (%5) LT; buzağılardan izole edilen 18 suşun 6'sı (%33.3) ST; 16 köpek izolatının 1'i (6.2) LT; bildircin orijinli 15 suşun 1'i (%6.7) LT; 14 sığır izolatının 1'i (7.1) ST; kuzu orijinli 11 suşun 1'i (%9.1) ST, 1'i (%9.1) LT; kedilerden izole edilen 8 ETEC suşunun 1'i (%12.5) ST açısından pozitif bulundu. Devekuşu, martı, tavuk, hindi ve güvercinlerden izole edilen ETEC suşlarının hiçbirinde ST ve LT saptanamadı. Böylece 150 ETEC suşunun 10'unda (%6.7) ST, 4'ünde (%2.6) de LT olmak üzere toplam 14'ünün (%9.3) enterotoksin tipi belirlenmiş oldu.

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 (Shin ve ark. 1994; Blanco ve ark. 1993b; Rajkhowa ve ark. 2009) veya genellikle negatif bulunduğu rapor edilmektedir (Osek ve Winiarczyk 2001; Güler ve ark. 2008; Morato ve ark. 2008). İshali hayvanlardan izole edilen suşlarda ise daha yüksek pozitiflik saptandığı bildirilmektedir (Hammermueller ve ark. 1995; Rigobelo ve ark. 2006; Salvadori ve ark. 2003). Sağlıklı hayvanlardan izole edilen *E. coli* suşlarının kullanıldığı bu çalışmada LT ve ST pozitifliğinin düşük olması bu görüşleri destekler niteliktedir. Ayrıca bu araştırmada devekuşu, martı, tavuk, hindi ve güvercinlerde bu toksin tiplerinin saptanamaması kanatlı hayvan türlerinden izole edilen *E. coli* suşlarında gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları ile (Vidotto ve ark. 1990; Emery ve ark. 1992; Blanco ve ark. 1997) uyumluluk göstermektedir.

Sonuç olarak; bildircin, devekuşu, martı ve güvercinlerden izole edilen *E. coli* suşları ST ve LT enterotoksin tipleri açısından ülkemizde ilk kez bu çalışma ile incelenmiştir. Tavşan ince barsak ligatür tekniği ile enterotoksijenik oldukları saptanan *E. coli* suşlarının ticari kitlerle yapılan ST ve LT enterotoksin tiplendirilmesi oldukça düşük oranda (%9.3) bulunmuştur. Bu durum tavşan ince barsak ligatür tekniği ile ETEC bulunan ancak ST veya LT enterotoksin özelliği belirlenemeyen suşların laboratuvar koşullarında saklama esnasında bu yeteneklerinde azalma olabileceği ile açıklanabilir (Rajkhowa ve ark. 2009). Bu araştırmada enterotoksijenik oldukları halde ST ve LT açısından ticari kitlerle tiplendirilemeyen suşlar, enterotoksijenik özelliğe sahip VTs gibi toksinlerin varlığı açısından konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle daha detaylı bir şekilde araştırılacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığınca 2008-VF-B056 nolu proje olarak desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abaas S, Franklin A, Kühn I, Orskov F, Orskov I (1989).** Cytotoxin activity on vero cells among *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in cats. *Am J Vet Res*, 50 (8): 1294-1296.
- Akashi N, Hitotsubashi S, Yamanaka H et al (1993).** Production of heat-stable enterotoxin II by chicken clinical isolates of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 109, 311-316.
- Blanco J, Blanco M, Wong I, Blanco JE (1993a).** Haemolytic *Escherichia coli* strains isolated from stools of healthy cats produce cytotoxic necrotoxin factor type 1 (CNF1). *Vet Microbiol*, 38, 157-165.
- Blanco J, Cid D, Blanco JE, Blanco M, Ruiz Santa Quiteira JA, de la Fuente R (1996).** Serogroups, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs in Spain. *Vet Microbiol*, 49 (3-4): 209-217.
- Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J (1997).** Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: Relationship with in vivo pathogenicity. *J Clin Microbiol*, 35 (11): 2953-2957.
- Blanco M, Blanco J, Blanco JE, Ramos J (1993b).** Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am J Vet Res*, 54 (9): 1446-1451.
- Blanco M, Blanco JE, Dahbi G et al (2006).** Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: Identification of two novel intimin variants (mB and jR/b2B). *J Med Microbiol*, 55, 1165-1174.
- Boynukara (Uslanoğlu) B, Çabalar M, Gülhan T, Ekin İ.H (2002).** Detection of *Escherichia coli* K99 and rotavirus in some healthy dairy cattle herds in Van province of Turkey. *XXII. World Buiatrics Congress*, 170-171, Hannover, Germany.
- Boynukara (Uslanoğlu) B, Aksu Z, Gülhan T (2004).** *Escherichia coli*'nin insanlarda oluşturduğu infeksiyonlar. *Vet Hek Mikrobiyol Derg*, 4 (1-2): 29-38.
- Carroll PJ, Woodward MJ, Wray C (1990).** Detection of LT and ST1a toxins by latex and EIA tests. *Vet Rec*, 1237, 335-336.
- DebRoy C, Maddox CW (2001).** Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Anim Health Res Rev*, 1 (2): 129-140.
- Emery DA, Nagaraja KV, Shaw DP, Newman JA, White DG (1992).** Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis*, 36, 504-511.
- Erganiş O, Kaya O, Çorlu M, İstanbulluoğlu E (1989).** Hemagglutination, hydrophobicity, enterotoxigenicity and drug-resistance characteristics of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis*, 33, 631-635.

- Güler L, Gündüz K, Ok U (2008).** Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from calves in Turkey. *Zoonoses Public Hlth*, 55, 249-257.
- Gülhan T (2003).** Sağlıklı görünen hayvanların dışkılarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarının biyokimyasal, enterotoksijenik ve verotoksijenik özelliklerinin belirlenmesi. *YYÜ Vet. Fak. Derg*, 14 (1): 102-109.
- Gülhan T, Boynukara B, Alişarlı, M (2009).** Typing of verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from animal and human sources. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (2): 181-184.
- Hammermueller J, Kruth S, Prescott J, Gyles C (1995).** Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Can J Vet Res*, 59, 265-270.
- Holland RE, Walker RD, Sriranganathan N, Wilson RA, Ruhl DC (1999).** Characterization of *Escherichia coli* isolated from healthy dogs. *Vet Microbiol*, 70, 261-268.
- Hossain MT, Siddique MP, Hossain FMA et al (2008).** Isolation, identification, toxin profile and antibiogram of *Escherichia coli* isolated from broilers and layers in Mymensingh district of Bangladesh. *Bangl J Vet Med*, 6 (1): 01-05.
- Mainil JG, Bex F, Jacquernin E, Pohl P, Couturier M, Kaeckenbeeck A (1990).** 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*, 51, 187-190.
- Majali AM, Asem EK, Lamar CH, Robinson JP, Freeman MJ, Saeed AM (2000).** Studies on the mechanism of diarrhoea induced by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) in newborn calves. *Vet Res Com*, 24, 327-338.
- Masalmeh MA, Youssef U, Silber R (1990).** Characterization of hemolytic *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic dogs and cats. *Wien Tierärztl Mschr*, 77, 254-258.
- Mills KW, Tietze KL (1984).** Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay for identification of K99-positive *Escherichia coli* isolates from calves. *J Clin Microbiol*, 19 (4): 498-501.
- Morato EP, Leomil L, Beutin L, Krause G, Moura RA, Pestana de Castro AF (2008).** Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. *Zoonoses Public Hlth*, 14, 1-9.
- Orden JA, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Cid D, Fuente RD (2002).** Presence and enterotoxigenicity of F5 and F41 *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic small ruminants in Spain. *Small Rum Res*, 44, 159-161.
- Osek J, Winiarczyk S (2001).** Prevalence of *eae* and shiga toxin genes among *Escherichia coli* strains isolated from healthy calves. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 48, 67-72.
- Oxoid Manual (2006).** Culture media, ingredients and other laboratory services. 9th ed., Oxoid Ltd., London, UK.
- Prada J, Baljer G, Rycke JD et al (1991).** Characteristics of alpha-hemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from dogs with gastroenteritis. *Vet Microbiol*, 29 (1): 59-73.
- Rajkhowa S, Hussain I, Rajkhowa C (2009).** 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*, 106, 455-458.
- Rigobelo EC, Gamez HJ, Marin JM, Macedo C, Ambrosin JA, Avila FA (2006).** Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 58, 305-310.
- Salvadori MR, Valadares GF, Leite DS, Blanco J, Yano T (2003).** Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Braz J Microbiol*, 34, 230-235.
- Scotland SM, Flomen RH, Rowe B (1989).** Evaluation of a reversed passive latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* heat-labile toxin in culture supernatants. *J Clin Microbiol*, 27 (2): 339-340.
- Shin SJ, Chang YF, Timour M, Lauderdale TL, Lein DH (1994).** 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*, 38, 217-225.
- Starčić M, Johnson JR, Stell AL et al (2002).** Haemolytic *Escherichia coli* isolated from dogs with diarrhea have characteristics of both uropathogenic and necrotoxicogenic strains. *Vet Microbiol*, 85, 361-377.
- Taku A, Purohit VD, Sharma VK, Upadhyay SN (1991).** Detection of K99 and F41 fimbria on ST enterotoxin producing *Escherichia coli* from calves. *Indian J Anim Sci*, 61 (3): 246-248.
- Urban RG, Pipper EM, Dreyfus LA, Whipp C (1990).** High-level production of *Escherichia coli* STb heat-stable enterotoxin and quantification by a direct enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 28, 2383-2388.
- Vidotto MC, Müller EE, Freitas JC, Alfieri AA, Guimarães IG, Dantos DS (1990).** Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis*, 34 (3): 531-538.
- Wasteson Y, Olsvik O, Skancke E, Bopp CA, Fossum K (1988).** Heat-stable-enterotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dogs. *J Clin Microbiol*, 26, 2564-2566.
- Wolk M, Ohad E, Shpak B, Adler H, Nahari N (1992).** 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*, 47, 7-10.