ESCHERICHIA COLI İSHALLERİNDE LABORATUVAR TANISI

Betigül ÖNGEN

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL
ongenb@gmail.com

ÖZET

İshalle ilişkili altı farklı Escherichia coli patotipi tanımlanmıştır. Barsak patojeni olmayan E.coli'lerle bir çok özelliklerinin ortak olması bu patotiplerin dışkıdan izolasyon ve identifikasyonunu güçleştirmektedir. Bugün, E.coli patotiplerinin her birini saptayan çeşitli tanı yöntemleri tarif edilmiş olmakla birlikte bir kısmı rutin laboratuvarlar için uygun değildir. Son yıllarda virulans faktörlerinin saptanmasına yönelik moleküler tanı yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yazıda E.coli ishallerinin tanısında kullanılan yöntemler ile bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajları tartışılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Escherichia coli, ishal, E.coli ishallerinin laboratuvar tanısı*

SUMMARY

Laboratory Diagnosis in *Escherichia coli* Diarrheae

Six different Escherichia coli pathotypes associated with diarrhea have been recognized. There are many properties shared with non-diarrheagenic E.coli, making their isolation and identification from fecal material difficult. Although various diagnostic methods detecting to each E.coli pathotype have been described now, some of them is not suitable for routine laboratories. In recent years, molecular diagnostic methods based on virulence factors have been frequently used. The diagnostic methods used in E.coli diarrhea and their advantages and disadvantages are discussed.

Keywords: *Escherichia coli, diarrhea, laboratory diagnosis in E.coli diarrheae*

Escherichia coli basit besiyerlerinde bile üreyebilen ve kültürden kolaylıkla izole edilen bir bakteridir. Ancak *E.coli*'nin patojen suşları ile normalde barsakta kommensal yaşayan ve patojen olmayan suşlarının birçok özellikleri ortaktır. Bu nedenle dışkı florasında bulunan *E.coli* suşları içinden virulan tipleri ayırt ederek barsak infeksiyonlarının tanısını koymak kolay değildir. İshal etkeni *E.coli*'lerin antijenlerini, toksinlerini, virulans genlerini saptamaya yönelik çok sayıda tanı yöntemi tarif edilmiştir. Bu yöntemler genellike *E.coli* patotiplerini başarıyla saptayabilmekle birlikte bir kısmı henüz rutin kullanıma uygun değildir[2].

İshal yapan *E.coli*'ler patojenik özelliklerine göre patotiplere (veya virotiplere) ayrılırlar. Bugün için altı farklı *E.coli* patotipi tanımlanmıştır: 1. Shiga toksin oluşturan *E.coli* (STEC) [ya da verotoksijenik *E.coli* (VTEC)], 2. Enteropatojenik *E.coli* (EPEC), 3. Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC), 4. Enteroinvaziv *E.coli* (EİEC), 5. Enteroagregativ *E.coli* (EAEC) ve 6. Diffüz aderan *E.coli* (DAEC). Ancak bunlardan diffüz aderan *E.coli* (DAEC)'nin klinik önemi henüz tartışmalıdır[19,20].

STEC İNFEKSİYONLARININ TANISI

Shiga toksin (Stx) oluşturan *E.coli* (STEC) suşlarının bir kısmı EPEC suşlarında olduğu gibi A/E (bağlanıp yüzeyini bozma) etkisi gösterebilen ya da A/E lezyonu oluşturan suşlardır. Bu tip A/E fenotipindeki STEC suşları enterohemorajik *E.coli* (EHEC) olarak da adlandırılmaktadır[5]. Bu yazıda bu suşlardan genel tanımıyla STEC olarak söz edilecektir.

STEC infeksiyonlarının tanısı daha çok sık izole edilen ve ciddi komplikasyonları (HÜS ve hemorajik kolit) nedeniyle öne çıkan bir serotip olan O157:H7 üzerine yoğunlaşmıştır. Gelişen

tekniklere rağmen O157 dışındaki STEC infeksiyonlarının tanısı daha zordur. Tanıda kullanılan yöntemler:

1. Doğrudan bakterinin saptanması

STEC izolasyonu için doğrudan dışkı örneğinden kültür yapılıp izole edilen kuşkulu kolonilerde Stx varlığı araştırılabilir. Stx testi pozitif olan dışkı örneklerinden de kültür yapılabilir[19].

STEC O157:H7 kültürü: STEC içinde en sık rastlanan serotipler olan O157:H7 ve O157:H - suşlarının çoğu, diğer *E.coli*' lerin aksine sorbitolu bir gecelik inkübasyondan sonra fermente etmezler. Diğer *E.coli* suşlarının % 80 kadarı ise sorbitolu hızlı fermente eder. Bakterinin bu özelliğinden yararlanılarak standart MacConkey besiyerine % 1 laktoz yerine % 1 sorbitol ilavesiyle sorbitollü MacConkey (SMAC) agar geliştirilmiştir[17,19,20,28]. SMAC agarda O157 suşlarının (çoğunun) oluşturdukları şeffaf görünümlü (sorbitol negatif) en az 3-10 koloni seçilerek biyokimyasal ve diğer özellikleri açısından incelenir[20].

Biyokimyasal identifikasyon: İzole edilen kuşkulu suşların biyokimyasal olarak *E.coli* olduğu doğrulanmalıdır. Çünkü N grubu *Salmonella, Yersinia enterocolitica* serotip O9, *Citrobacter freundii* ve *Escherichia hermanii* gibi diğer kimi bakteriler O157 antiserumu veya lateks ayıracı ile çapraz reaksiyon verebilirler[19,20]. *E.hermanii* biyokimyasal ve serolojik olarak *E.coli* O157'ye benzer bir bakteridir; sellobiyoz fermentasyonu (*E.coli* negatif, *E.hermanii* pozitiftir) ve potasyum siyanür varlığında üreme (*E.coli* üremez, *E.hermanii* ürer) özellikleri ile ayrılabilir[20,28]. Ayrıca yeni bir tür olan *Escherichia albertii* de ticari identifikasyon sistemlerinde (veri tabanına dahil edilmediğinden) *Salmonella, Hafnia, Yersinia,* inaktif *E.coli* veya bazen de *E.coli* O157:H7 olarak tanımlanabilmektedir[5,19]. O157:H7 suşlarının bir diğer ayırıcı özelliği katı besiyerinde ramnozu fermente etmemeleridir; sorbitol negatif olan diğer serogruplardan *E.coli* suşlarının % 60'ı ramnozu fermente eder[20].

Serotiplendirme: *E.coli* olarak identifiye edilen sorbitol negatif bakterinin O (somatik) antijeni ve H (kirpik) antijenleri saptanarak serotiplendirmesi yapılabilir. *E.coli*'nin bugüne kadar 181 O antijeni ve 56 H antijeni tanımlanmıştır. İshalle ilişkili gerçek serotip kombinasyonu sayısı daha sınırlıdır. Serotiplendirmede, suş önce O157, daha sonra agar oranı düşük bir besiyerinde pasaj yapılarak H7 antiserumu (veya lateks ayıracı) ile denenir[19,20]. O157 antijeni negatif bulunan suşların diğer O ve H antijenleri genellikle referans laboratuvarlarda araştırılır[19]. O157 ve H7 antijenlerine karşı hazırlanmış, floressein, peroksidaz veya fosfatazla konjuge edilmiş O157 antikorlarını da hazır olarak bulmak mümkündür[20].

CDC verilerine göre, insandan izole edilen O157 suşlarının yaklaşık % 85 kadarı O157:H7 serotipinde, % 12 kadarı hareketsiz ve % 3 kadarı da H7 dışında bir H tipinde bulunmuştur. Hareketsiz olan *E.coli* O157 suşları (O157:NM) da genellikle Stx oluştururlar[17,19]. Bu nedenle hareketsiz olan veya H7 antijeni negatif bulunan suşlar da ayrıca Stx yönünden araştırılmalıdır[19,20,23]. İshal etkeni *E.coli* suşlarının serotiplendirmesi özellikle epidemiyolojik açıdan önemlidir; ancak pahalı ve zaman alıcı olduğundan her laboratuvarda yapılamamaktadır[19].

Modifiye SMAC besiyerleri: Ayırıcı ve seçici özelliklerinin arttırılması amacıyla SMAC agar besiyerinin çeşitli modifikasyonları geliştirilmiştir. Sefiksim-tellüritli SMAC (CT-SMAC) agar, selektif özelliği nedeniyle Stx oluşturan *E.coli* O157:H7 (ve *Shigella sonnei*) suşlarının üremesine olanak verirken diğer *E.coli*'lerin üremesini kısmen ya da tamamen inhibe eder. Ancak kimi Stx oluşturan O157:H- suşlarının CT-SMAC agarda üremedikleri bildirilmektedir[14,19,20]. Besiyerine ilave edilen novobiyosinin O157:H7 suşları için seçiciliği arttırıcı etkisi vardır. Sefiksimli SMAC agara sorbitol yanında ramnoz da ilave edilerek geliştirilen CR-SMAC besiyerinde O157:H7 serotipine ait renksiz kolonilerin oranının arttığı bildirilmiştir[20].

Beta-glukuronidaz (MUG) testi ve Rainbow agar: *E.coli* O157:H7 diğer *E.coli* suşlarından beta-D-glukuronidaz oluşturmaması ile fark gösterir. Beta-D-glukuronidaz enzimi florojenik olarak [(4-methyl-umbelliferyl-D-glucuronide (MUG) kullanılarak)] veya kolorimetrik

olarak (5-bromo-6-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide ilave edilmiş agarda) saptanabilir[19,23]. Ancak bu özellik O157 dışındaki STEC suşlarının veya sorbitol pozitif O157 STEC suşlarının saptanması için uygun değildir[23]. *E.coli* O157 suşlarının beta-glukuronidaz negatif özelliği hazır bir besiyeri olan Rainbow agar O157 besiyerinde (Biolog, Inc., Hayward, CA.) araştırılabilmektedir. Kromojenik ayırıcı bir besiyeri olan Rainbow agarda glukuronidaz negatif, galaktozidaz pozitif O157:H7 suşları siyah veya gri renkte, kommensal suşlar ise pembe renkte koloni oluştururlar[17,20,23]. Bugüne kadar Rainbow agarın etkinliğini araştıran çalışmalar çok sınırlı olmakla birlikte, bir çalışmada SMAC'a göre daha üstün bulunmuştur[21]. Nadiren MUG pozitif, üreaz pozitif STEC O157 suşları da izole edilmektedir[19].

Ayrıca CHROMagar O157 (Becton Dickinson) hazır besiyerinde de O157 suşları açık mor, diğer bakteriler mavi veya renksiz koloni oluştururlar. SMAC besiyerinde veya bu tip kromojenik besiyerlerinde izole edilen olası bir O157 suşunun kesin tanısı için mutlaka Stx oluşumu gösterilmelidir[23].

Enterohemolizin (Ehly) testi ve enterohemolizin agar: İnsandan izole edilen Stx oluşturan O157 STEC suşlarının % 90 kadarı ve O157 dışındaki STEC suşlarının % 60-80'i enterohemolizin (Ehly) olarak adlandırılan tipik bir *E.coli* hemolizini oluştururlar; bu hemolizin diğer *E.coli* suşlarının oluşturduğu α-hemolizinden farklıdır. Bu özellik selektif olmayan ancak ayırıcı bir besiyeri olan enterohemolizin agar [örneğin, kalsiyum ilave edilmiş yıkanmış koyun kanlı agar (WSBA-Ca)]'da incelenebilir. Bu yöntemin bir dezavantajı ekim yapıldıktan 3-4 saat sonra hemolitik kolonilerin incelenmesi (α-hemolizin belirginleşir) ve tekrar bir gece inkübasyona bırakılmasıdır (hem α-hemolizin hem de enterohemolizin belirginleşir)[20]. WSBA-Ca besiyerine mitomisin C ilave edilmesi "Ehly" hemolizinin görülmesini kolaylaştırır ve bu aktiveteye sahip O157 dışındaki STEC suşlarının oranını arttırır[19]. O157 dışındaki STEC suşlarının bir kısmı enterohemolitik fenotip göstermediğinden ayrıca enterohemolitik özellikte olup toksin oluşturmayan suşlar bildirildiğinden WSBA-Ca besiyeri ile birlikte ilave tanı yöntemleri kullanılmalı, izole edilen enterohemolitik koloniler daha sonra Stx pozitifliği açısından incelenmelidir[19,20].

Zenginleştirme/immunomanyetik ayırma: Besin maddelerinden STEC O157 izolasyon oranını arttıran bir teknik olan immünomanyetik ayırma (IMS) yöntemi dışkı örneklerinin kültürüne adapte edilmiştir[14]. Bu yöntemde dışkının GN buyyonunda veya vankomisin, sefiksim ve sefsulodin ilave edilmiş tamponlu peptonlu suda kısa bir ön zenginleştirme işlemini, antikor kaplı manyetik boncuklarla inkübasyon ve sonrasında manyetik ayırma işlemi takip eder. Paramanyetik boncuk-bakteri kompleksi tekrar süspansiyon yapılarak SMAC, CT-SMAC veya CR-SMAC agar besiyerlerine yayılır[14,20]. IMS yöntemi hastalığın ileri dönemlerinde dışkıda az sayıda bakteri bulunduğunda, asemptomatik taşıyıcılardan veya uygun olmayan şekilde beklemiş örneklerden STEC O157 izolasyon oranını arttıran oldukça duyarlı bir yöntemdir. O157, O111 ve O26 için IMS boncukları (Dynabeads anti-*E.coli* O157; Dynal, Inc, NY) ticari olarak mevcuttur ya da laboratuvarlar kendileri diğer O antijenlerine özgül antikorlarla boncuklar hazırlayabilirler[14,19,20].

STEC hangi koşullarda aranmalıdır? *E.coli* O157 infeksiyonlarının artan insidensi ve özellikle ciddi komplikasyonları nedeniyle CDC 1993 yılında tüm dışkı örneklerinin ya da en azından kanlı olanların SMAC besiyeri kullanılarak *E.coli* O157:H7 kültürünün yapılmasını önermiştir[17,19]. Bugüne kadar STEC aranıp aranmayacağını belirleyecek dışkıda kan varlığından başka gözle görülür bir kriter bildirilmemiştir. Hastaların ancak yarısından azında dışkıda lökosit saptandığından dışkıda lökosit bakılması da yardımcı bir kriter değildir[20].

Dışkıda STEC saptanması için kullanılan tanı testlerinin (kültür ve diğer yöntemler) rutin mikrobiyoloji laboratuvarına adaptasyonu ek bir maliyet getirmektedir; laboratuvar lokal prevalans verilerini de gözönünde bulundurarak birim maliyeti düşürmek ya da bu testleri rutin testlere ilave etmek veya en azından kanlı dışkılara uygulamak konusunda karar vermek zorundadır. Prevalansın düşük olduğu kimi böl-

gelerde laboratuvarların bu bakterileri aramaya başlamasıyla olgu sayısının artabildiği kaydedilmiştir[17,19,20]. Çok merkezli bir çalışmada, O157 kültürü yapılmasında dışkıda kan bulunması tek kriter olarak kullanıldığında dışkıların % 3'ünün incelenmesiyle tüm O157 infeksiyonlarının % 63'ünün saptanabildiği; dışkıda gözle görülebilir kan bulunması veya dışkıda kan hikayesinin olması durumunda örneklerin % 22'sinin incelenmesiyle olguların % 90'ından fazlasının saptandığı bildirilmiştir[27]. Bununla birlikte, tanı tekniklerinin geliştirilmesiyle, virulans faktörlerini saptayan yöntemlerin kullanıldığı son çalışmalar STEC infeksiyonlarının yarısına yakınını O157 dışı STEC suşlarının oluşturduğunu göstermektedir[17]. Bu nedenle tanıda "serotipe özgül olmayan" virulans faktörlerini saptayan testlerin kullanılması önerilmektedir[17].

Kültür için dışkı örneği ne zaman alınmalıdır? STEC suşlarının izolasyonu, kültürün hastalığın erken döneminde yapılmasına bağlıdır. Yapılan prospektif bir çalışmanın sonuçlarına göre, ishalin başlamasından itibaren 2 gün içinde alınan örneklerden kültür yapıldığında izolasyon oranının % 100 olduğu, ishalin başlamasından 3-6 gün sonra veya daha uzun süre sonra kültür yapıldığında ise izolasyon oranının sırasıyla % 91.7 ve % 33 olduğu bildirilmiştir[30]. Bu nedenle HÜS belirtileri kendini gösterdiğinde genellikle hastaların üçte ikisinin dışkısında *E.coli* O157:H7 olmadığı söylenebilir. Bunun aksine kimi hastalar infeksiyondan haftalarca veya aylarca sonra dışkılarıyla bakteri çıkarabilmektedirler[20,23].

Biyogüvenlik sorunları: *E.coli* O157:H7 ve diğer Stx oluşturan *E.coli* suşları klinik mikrobiyologlar için en tehlikeli barsak patojenlerinden biridir. Bugüne kadar laboratuvardan kazanılmış ve sonrasında böbrek yetmezliği ve hemorajik kolit gelişen en az üç *E.coli* O157:H7 infeksiyonu bildirilmiştir[4,20]. Bunların hiçbirinde gözle görülür bir kaza veya kurallara uymama gibi bir durum olmadığı, bu durumun olasılıkla bakterinin infeksiyon dozunun çok düşük olmasıyla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür[5]. İngiltere'de STEC yeniden sınıflandırılarak risk 2 grubundan *Salmonella* Typhi ve *Shigella dysenteriae* tip1'in bulunduğu risk 3 grubuna alınmıştır[4,20].

2. Dışkıda O157 antijeni saptanması

Dışkı örneklerinde *E.coli* O157 antijenini saptayan serotipe özgül kitler geliştirilmiştir[13,20]. Poliklonal ve FITC (fluorescein isothiocyanate) ile işaretli anti-O157 antikorlarının kullanıldığı direkt immunfloresan boyama ile 2 saat kadar bir süre içinde *E.coli* O157 saptanabilmektedir. Dışkıda O157 antijenini saptayan ticari ELISA kitleri (LMD, LMD Laboratories; Premier *E.coli* O157, Meridian Diagnostics) ile de 1 saatte sonuç alınabilmektedir. Hem immünfloresan hem de ELISA testleri benzer duyarlılık göstermekle birlikte SMAC kültürüne göre daha duyarlıdırlar[23]. Bu yöntemlerin bir avantajı doğrudan dışkıya uygulanabilmesidir; sadece *E.coli* O157'yi saptayabilmesi ve göreceli pahalı olması dezavantajları arasındadır[17]. O157 antijeni saptandığında yine Stx yönünden doğrulama yapılmalıdır[23].

3.Virulans faktörlerinin saptanması

3.1. Shiga toksin (Stx) araştırılmasında kullanılan yöntemler

STEC suşlarının bakteriyofajdaki genlerle kodlanan iki farklı Shiga toksini [ya da verotoksini (Stx1 ve Stx2)] vardır. Ayrıca, Stx2'nin Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f gibi birkaç varyantı bulunur[17,19]. STEC suşları bu toksinlerinden birini ya da her ikisini birden oluştururlar. Stx veya Stx'i kodlayan genler çeşitli biyolojik, immünolojik veya moleküler yöntemlerle saptanabilmektedir[19].

a. Hücre kültürü sitotoksisite deneyleri

Dışkıda sitotoksin aktivitesinin Vero (Afrika yeşil maymun) hücre kültürü ile gösterilmesi altın standart yöntemdir. Vero hücrelerinin plazma membranlarında yüksek konsantrasyonda Gb3 reseptörleri ve ayrıca Gb4 reseptörü (Stx2e için tercih edilen reseptör) bulunduğundan bu hücreler bilinen tüm Stx varyantlarına çok duyarlıdırlar[23]. Bu deneyde sulandırılmış dışkı örneği veya bakteri kültür süspansiyonunun inoküle edildiği hücreler sitopatik etki yönünden incelenir. Karışık dışkı kültürünün polimiksin-B ile muamelesiyle hücre kültürü-

nün duyarlılığı arttırılabilmektedir[20,23].

Hücre kültürü rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanması zor ve sonuçları 48-72 saatten önce elde edilemeyen bir yöntemdir. Ayrıca, sitotoksisite pozitifliğinin diğer bakterilere ait ürünler veya toksinlerin bir sonucu olabileceği, bu nedenle pozitif örneklerin daima Stx1 ve Stx2'ye karşı özgül (tercihen monoklonal) antikorlarla nötralizasyon testi ile doğrulanması gerektiği bildirilmektedir[2,20,23].

b.İmmünolojik testler

ELISA yöntemi ile Stx saptanması: Dışkıdan ve dışkı kültürlerinden doğrudan Stx1 ve Stx2 saptanmasında kullanılan çok sayıda ELISA testi geliştirilmiştir[13,23]. Bu testlerle serogruba bağlı olmaksızın STEC (veya diğer Stx oluşturan türler) saptanabilmekte ve bir gün içinde sonuç alınabilmektedir. Sandviç tekniğinin kullanıldığı ELISA testlerinin çoğunda aranan toksine karşı monoklonal veya saflaştırılmış poliklonal antikorlar kullanılmıştır. Saflaştırılmış Gb3 (Stx reseptörü) veya kist hidatik sıvısı (Stx'i bağlama özelliğindeki P1 glikoproteinini içerir) da katı fazı kaplamak için kullanılmaktadır. Kültür veya doğrudan dışkı ile inkübasyondan sonra katı faza kaplanmış antikora bağlı toksin, ikinci bir Stx'e özgül antikor (enzimle konjuge edilmiş) ilavesiyle saptanır[23].

Bakteri kültürleri, dışkı örnekleri ve besin maddelerinde toksin antijeni saptayabilen Stx ELISA testleri hazır ticari kitler halinde mevcuttur (Premier EHEC-Meridian Diagnostics; LMD-LMD Laboratories)[20]. Ticari ELISA kitlerinin (veya inhouse ELISA testinin) duyarlılığı kültür ve verositotoksisite testleri ile karşılaştırmalı çalışmalarda genellikle yüksek bulunmaktadır. Bu testlerde duyarlılık suşun oluşturduğu sitotoksinin tipi ve miktarına göre değişebilir. Polimiksin B ve/veya mitomisin C ilave edilmiş buyyon kullanıldığında Stx üretimi arttığından bu koşullarda, ELISA testlerinin total floranın % 0.1'i kadar az miktarda bulunan STEC'i saptayabildiği bildirilmiştir[23]. Ayrıca yapılan iki büyük çalışmada Premier EHEC ELISA'nın dışkı kültüründen STEC saptanmasında en az verositotoksisite testleri kadar duyarlı olduğu saptanmıştır[16,18].

Ters pasif lateks aglütinasyonu (RPLA) ile Stx saptanması: Stx1 ve Stx2'yi saptayan VTEC-RPLA (Oxoid, Unipath Lt, England), Verotox F (Denka Seiken, Japan) RPLA yönteminin uygulandığı ticari kitlerdir[20,23]. Bu yöntem, polimiksin B ile bir seri sulandırım yapılan kuşkulu STEC kültür ekstraktları veya kültür süzüntülerinin Stx1 ve Stx2'ye özgül antikorlarla kaplı lateks partikülleri ile inkübasyonu ve 24 saat sonra aglütinasyonun incelenmesi esasına dayanır[23]. STEC suşlarının kültür ekstraktlarının kullanıldığı bir çalışmada verositotoksisite testi ile kıyaslandığında bu test için % 100 duyarlılık ve özgüllük bildirilmiştir[15]. Ancak karışık dışkı kültür ekstraktlarını kullanan çalışma verileri henüz yeterli değildir[23].

Bu tür immünolojik testlerin avantajı, serotipe özgül olmamaları nedeniyle tüm STEC serotiplerini saptayabilmeleri ve sitotoksisite testlerine göre daha hızlı ve kolay uygulanabilir olmalarıdır; bir dezavantajı daha pahalı testlerdir[17,20,23].

c. Moleküler yöntemlerle *stx* genlerinin saptanması

DNA ve oligonükleotid problarla hibridizasyon: *stx1* ve *stx2* genleri klonlandıktan ve nükleotid sekansları belirlendikten sonra STEC tanısı için problar geliştirilmiştir. Bu problar koloni hibridizasyon yöntemiyle dışkıdan izole edilen çok sayıdaki *E.coli* suşunun veya primer izolasyon besiyerlerinde üreyen kolonilerin *stx* genleri varlığı açısından doğrudan taranması amacıyla kullanılmaktadır. *stx1* ve/veya *stx2* genleri bulunan suşların ayırımını sağlayan bu yöntem duyarlı ve özgül bir yöntemdir ancak sıvı besiyerindeki kültürler veya dışkı ekstraktlarının taranması için duyarlı değildir[23].

PCR: *stx* genlerinin sekans bilgileri elde edilince PCR'la bu genlerin amplifikasyonu için çok çeşitli oligonükleotid primer setlerinin tasarlanması mümkün olmuştur. Karışık veya tek koloni, karışık buyyon kültürü hatta doğrudan dışkı veya besin ekstraktı PCR'da kullanılabilir. Bu güne kadar tarif edilen *stx*-PCR deneylerinin bir kısmında *stx1*, *stx2* ve bazen de *stx2* varyantları için farklı primer çiftleri aynı reaksiyonda kullanılmaktadır. Diğer bir kısmında ise tüm *stx* genlerini amplifiye edebilen tekli bir primer çifti kullanılmakta ve sonrasında gen tipinin belir-

lenmesi için 2. bir PCR döngüsü veya doğrudan amplifiye fragmentteki tipe özgü sekanslara karşı işaretli oligonükleotidlerle hibridizasyon yapılmaktadır. Duyarlılığı arttırmasının yanında, ikinci bir hibridizasyon aşamasının amplifiye ürünün belirlenmesinde doğrulama yapması açısından da faydası vardır. Ayrıca, *stx2* genlerinin amplifiye kısımlarının restriksiyon analizi yapılarak *stx1* ve *stx2* varyantlarının ayırımı sağlanabilmektedir[23].

PCR yöntemi *stx* genlerinin araştırılması amacıyla doğrudan dışkı ve gıda maddeleri gibi kompleks örneklere uygulanabilir ancak bu tip örneklerde *Taq* polimeraza inhibitör özellikte maddeler bulunabildiği için direkt ekstraktlar kalıp (template) olarak kullanıldığında duyarlılık çoğunlukla optimalin altında olmaktadır. Bu tür örnekler kullanılacağında duyarlılığın arttırılması için kalıp DNA'nın buyyon kültürlerinden ekstrakte edilmesi önerilmektedir. En az 4 saat buyyonda zenginleştirme hem örnekteki inhibitörlerin seyreltilmesini sağlar hem de bakteri üremesi nedeniyle hedef sekansın kopya sayısı artmış olur. İncelenen örnekte STEC az sayıda bulunabileceğinden PCR'da duyarlılığın optimizasyonu son derece önemlidir. Ayrıca, özellikle *stx2* genlerinde sekans polimorfizmi olduğu bilinmektedir. Primer ve hedef arasında sekansta uyuşmazlık olması (özellile primerin 3' ucunda) bağlanma etkinliğini bariz bir şekilde azaltır bu da doğrudan PCR'ın duyarlılığını etkiler. Primer seçerken (veya oluştururken) sekans heterojenitesi bildirilen bölgelerin kullanılmamasına dikkat edilmelidir. Hem *stx1* hem de *stx2*'nin amplifikasyonu için tekli primer çiftlerininin kullanıldığı PCR deneylerinde bu komplikasyonun daha az görüldüğü bildirilmektedir. PCR genellikle referans laboratuvarlarının kullandığı, deneyim gerektiren bir yöntem olmakla birlikte bugün klinik laboratuvarların bir kısmında uygulanmaya başlamıştır[23].

3.2. Diğer virulans faktörlerinin saptanması

Stx genlerinin sıklıkla kaybolabildiği (özellikle hastalığın ileri dönemlerinde) bilinmektedir. Bu nedenle, STEC suşlarının virulansla ilişkili diğer genlerinin araştırılmasına yönelik problar ve PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Bu genlerden tanıda en sık olarak yararlanılanlar aşağıda belirtilmiştir[20,23].

a. *eae* geni: Enterositlerde A/E lezyonu oluşmasından sorumlu olan ve bakterinin enterosite sıkıca tutunmasını sağlayan intimini kodlayan kromozomal *eae* geninin saptanmasına yönelik problar ve ayrıca primerlerin kullanıldığı PCR yöntemi tanıda sıklıkla kullanılmaya başlamıştır[5,17,19]. *eae* geni bulunan STEC suşları ishal oluşturabilirler ancak, hemorajik kolit ve HÜS'la ilişkili patolojik lezyonlar Stx'in etkisi nedeniyledir. HÜS'lu ve hemorajik kolitli hastalardan *eaeA* geni bulunmayan STEC suşlarının izole edildiği de bildirilmiştir[17]. Ayrıca *eae* geni EPEC'lerde de bulunduğundan tek başına intiminin saptanması yeterli olmayıp deneylerde *eae* geni ile birlikte *stx* geni de araştırılmalıdır[17,24].

b. *hlyA (ehxA)* geni: Plazmit kaynaklı enterohemolizin geninin *(hlyA)* varlığı ile STEC suşunun ciddi seyirli infeksiyona yol açabilme kapasitesi arasında ilişki olduğu düşünüldüğünden *hlyA* geninin saptanmasının klinik önemi olabileceği bildirilmektedir. Bu amaçla *hlyA (ehxA)* gen probu ve PCR primerleri tanımlanmıştır[2,19,23].

eae geninin 3' kısmındaki sekans varyasyonundan yararlanılarak yapılan PCR deneyleri O157 serotipinin diğer serotiplerden ayırımında kullanılabilmektedir. Bununla birlikte O157, O111 ve O113 gibi *E.coli* serogruplarında O antijen biyosentezini kodlayan genetik lokusa **(rfb bölgesi)** ait sekansın bilinmesi serogruba özgül daha güvenilir PCR yöntemlerinin gelişmesini sağlamıştır. STEC O157:H7 ile ilgili olarak saptanabilecek diğer iki genetik faktörden biri H7 antijenini kodlayan ***flih7* geni**, diğeri O157:H7 suşlarında beta-glukuronidaz negatif fenotipten sorumlu ***uidA* geni**nde tek bazlık mutasyondur (mismatch amplifikasyon mutasyon deneyi ile saptanır)[23].

3.3. Çoklu (multipleks) PCR

STEC'in çeşitli virulans faktörlerine yönelik PCR primerleri çoklu PCR deneylerinde tek bir örnekte birarada kullanılabilmektedir[17,23]. Kimi laboratuvarlar dışkı kültür ekstraktlarında önce sadece *stx*-PCR yapıp daha sonra pozitif örneklere farklı primer setlerinin kullanıldığı

çoklu PCR uygulamaktadırlar. Örneğin, *stx* pozitif bulunan örnekte dört primer seti kullanılarak *stx1* , *stx2* (*stx2* varyantları da dahil), *eae* ve STEC-*hlyA* varlığının araştırıldığı daha sonra *E.coli* O157, O111 ve O113'ün *rfb* bölgesindeki serogruba özgül sekanslara yönelik üç primer çiftinin kullanıldığı bildirilmektedir[23]. Ayrıca son yıllarda diğer ishal etkeni *E.coli* patotiplerini de ayırt edecek primerlerin kullanıldığı çoklu PCR yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır[1,9,24].

4. Serolojik tanı

Kültür negatif HÜS'lu hastalarda anti-LPS antikorlarının saptanması tanıda kullanılmıştır. HÜS'lu hastalarda LPS'ye karşı tükrük antikorlarını ve EspB proteinine karşı serum antikorlarını saptayan ELISA yöntemleri de tarif edilmiştir. Ancak serolojik tanı daha çok seroepidemiyolojik çalışmalarda anlamlıdır[19].

EPEC İNFEKSİYONLARININ TANISI

Son yıllarda EPEC'in patogenezi ile ilgili bilgilerimizin artması nedeniyle EPEC'in laboratuvar tanısında önemli değişiklikler olmuştur. Bakterinin patogenezinde lokalize aderansta rol oynayan kümeleşen fimbriyaları (BFP fimbriya) kodlayan *bfp* geni, EAF (EPEC aderans faktörü) plazmiti, EPEC için tipik olan A/E lezyonunun oluşmasında rol oynayan intimini kodlayan *eae* geni gibi genetik faktörlerin gösterilmesi bugün tanıda temel yolu oluşturmaktadır[5,13,19,20].

1. Serotiplendirme

EPEC'ler yıllarca dışkı örneklerinin ekildiği besiyerlerinden (MacConkey agar, vb) laktozu fermente eden en az 5-10 koloninin seçilip O, H ve K (kapsül) antijenlerine karşı hazırlanmış bağışık serumlarla aglütinasyon deneyi yapılması ile identifiye edilmiştir[2,20]. Ancak bu yöntem çeşitli serotiplere karşı bağışık serumların laboratuvarda hazır bulundurulmasını gerektirdiği ve zaman alıcı olduğu gibi çok duyarlı ve özgül de değildir. Ayrıca ishal olgularında etken olan serotiplere yenilerinin eklenmesi bu yolla yapılan tanıyı giderek zorlaştırmıştır. Bugün, serotip özelliği EPEC suşlarının temel karakteristik özelliklerinden sayılmamaktadır[20].

1995 yılında 2. Uluslararası EPEC Simpozyumunda patogenezdeki son gelişmeler gözönüne alınarak EPEC için A/E histopatolojisi olması ve Stx'in olmaması en önemli temel özellikler olarak kabul edilmiştir. Az sayıda da olsa kimi salgınlarda etken olarak saptanan EAF plazmiti bulunmayan ancak A/E lezyonu oluşturan suşların plazmitini kaybetmiş olabileceği düşünülmektedir. Yine bu simpozyumda alınan ortak bir kararla EAF plazmiti bulunan, A/E lezyonu oluşturan, Stx oluşturmayan suşlar "tipik EPEC suşları", aynı özelliklere sahip ancak EAF plazmiti bulunmayanlar ise "atipik EPEC suşları" olarak kabul edilmiştir[2,5,19,20].

2. Hücre kültüründe aderans fenotipinin gösterilmesi

EPEC suşlarının oluşturduğu lokalize aderans (LA) özelliğinin gösterilmesi amacıyla HEp-2 (insan epiteli) veya HeLa hücre kültürleri kullanılmaktadır. Lokalize aderans tipinde bakteri hücre yüzeyinde bir iki bölgeye mikrokoloniler halinde tutunur[2]. Aderans tipi ayrıca formalin veya gluteraldehidle fikse edilmiş hücrelerde de gözlenebilir[19]. Hücre kültüründe lokalize aderans saptanması EAF plazmitinin varlığını gösterir. Bunun dışında A/E lezyonunda yüksek konsantrasyonda polimerize filamentöz aktin bulunduğundan bu aktin yapıyı floresan aktin boyama yöntemi (FAS) ile göstermek mümkündür. Bu amaçla doğrudan hücre kültüründe epitel hücrelerine tutunmuş bakterinin altındaki aktin iplikleri ile özgül olarak bağlanabilen FITC veya rodaminle işaretli falloidin (mantar toksini) kullanılmaktadır. Falloidin çok toksik bir madde olduğundan bunun yerine α-aktine karşı hazırlanmış monoklonal antikorlar da kullanılabilmektedir. A/E fenotipi, barsak biyopsi örneklerinin veya epitel hücre kültürlerinin elektron mikroskobu ile incelenmesi ile de görülebilir[20].

EPEC tanısında çok önemli bir diğer özellik olan Stx negatifliği çeşitli fenotipik testlerle saptanabilir. Bu testler STEC bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmaktadır[20].

3. Moleküler yöntemler

EPEC suşlarının üç önemli özelliğine (A/E etkisi, EAF plazmiti bulunmaması ve Stx'i olmaması) dayanılarak DNA probları ve PCR primerleri geliştirilmiştir[2,19,20].

a-*eae* geni: İntiminin çok korunmuş N-terminal bölgesini kodlayan sekanslara yönelik fragment bir prob (1 kb) tanımlanmıştır. A/E fenotipi ile kıyaslandığında bu prob % 100 duyarlı ve % 98 özgül bulunmuştur. O157:H7 suşları için *eae* geninin 3' değişken bölgelerinin kullanıldığı fragment problar da bildirilmiş ancak henüz EPEC ve STEC'e ait *eae* sekansını ayırt edebilecek bir prob tanımlanmamıştır[20].

EPEC tanısında PCR yöntemiyle *eae* geninin saptanması amacıyla çeşitli primerler bildirilmiştir (*eae*-PCR için STEC bölümüne bakınız). *eae* geninin korunmuş 5' bölgesi için primer çiftlerinin tüm *eae* pozitif suşlardan bu fragmentleri amplifiye ettiği ancak 3' ucundan elde edilen primerlerin belli serotiplere özgül olabildiği bildirilmiştir. EPEC ve STEC suşlarında *eae* genini saptayabilen primerler son yıllarda tanıda sıklıkla kullanılmaktadır[1,9,24].

b-EAF plazmiti: EAF plazmitinin fonksiyonu bilinmeyen bir bölgesine ait 1 kb EAF fragment probu tanımlandıktan sonra, 21 bazlık duyarlı ve spesifik bir oligonükleotid prob tanımlanmıştır. Daha sonra EAF probunun 397 bp (baz çifti)'lik bölgesini amplifiye eden bir PCR primer çifti geliştirilmiştir[20].

bfpA geninin klonlanması ile geliştirilen 850 bp'lik bir *bfpA* fragment probu EAF probundan biraz daha duyarlı bulunmuştur; HEp-2 hücrelere lokalize aderans gösteren EPEC suşları arasında *bfpA* ve EAF probları kullanıldığında sırasıyla % 99 ve % 96 hibridizasyon elde edilmiştir. Daha sonra *bfpA* geni için 29 bazlık bir oligonükleotid prob bildirilmiştir. Bu probun duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla % 95.7 ve % 100 bulunmuştur[20]. Ayrıca, *bfpA* genini saptayan % 100 duyarlı ve özgül bir PCR yöntemi bildirilmiştir[8].

Sonuç olarak A/E lezyonu oluşturan suş, doku kültürü testleri ile veya *eae* genine (ya da LEE patojenite adasına) yönelik DNA probu veya PCR ile saptanabilmektedir. Genelde, A/E lezyonu oluşturan veya fenotipik olarak lokalize aderans gösteren tipik bir EPEC suşunun EAF plazmiti de oligonukleotid (veya fragment) problar veya PCR primerleri ile saptanabilmektedir. Bununla birlikte, *stx* negatif ve *eae* pozitif suşlarda EAF probu ya da PCR deneyleri negatif sonuç verdiğinde atipik bir EPEC suşu olduğu düşünülmelidir[2,5,19,20].

ETEC İNFEKSİYONLARININ TANISI

ETEC suşlarının neden olduğu ishallerde plazmitte kodlanan başlıca iki faktör rol oynar; bunlardan biri bakterinin enterotoksinleri [ısıya dirençli stabil toksin (ST) ve ısıya duyarlı labil toksin (LT)] diğeri kolonizasyon faktörleridir. Bakteri ya sadece ST'yi veya hem ST hem de LT'yi oluşturur. Bu faktörler aynı zamanda bakterinin tanısı için de kullanılmaktadır[20,25].

1. Serotiplendirme

Tanı önceleri belli ETEC serogruplarının (EPEC gibi) saptanmasıyla yapılmaktayken çok çeşitli serotipteki ETEC suşlarının enterotoksijen özellikte olduğu anlaşıldıktan sonra serotiplendirmenin tanıdaki önemi azalmıştır[25]. ETEC antijeni içinde en fazla çeşitlilik O antijenindedir. Bir çalışmada 954 ETEC suşunda 78 farklı O antijeni, 730 suşta 34 farklı H antijeni saptanmıştır. Buna ek olarak bir kısım suşlar tiplendirilememektedir[33].

2. CFA'ların saptanması

İshal oluşturan ETEC suşlarında kolonizasyon faktör antijenleri (CFA) olarak adlandırılan çok sayıda adezin tarif edilmiştir. Bu CFA'lar daha çok toksin oluşturan suşlarda bulunur ve çoğu fimbriyadır. İnsandan izole edilen ETEC suşlarında 22'den fazla CFA tanımlanmıştır. Bunlar içinde CFA/1, CS1-CS6 en sık görülen tiplerdir. ETEC kolonizasyon faktörleri için lam aglütinasyonu, immündifüzyon ve ELISA testleri gibi çeşitli yöntemler tanımlanmıştır[13]. Ancak CFA grupları içinde çapraz reaksiyon veren epitoplar bulunabilmektedir. Son yıllarda daha çok DNA probları ve PCR yöntemleri veya çeşitli anti-CF monoklonal antikorlarının kullanıldığı dot blot testleri geliştirilmiştir[25].

Geliştirilen bu yöntemlere rağmen ETEC suşlarının bir kısmında CFA saptanamaması, çok sayıda olmaları ve heterojenite göstermeleri nedeniyle kolonizasyon faktörlerinin araştırılması tanıda kullanışlı bulunmamaktadır[20,25].

Bugün için ETEC infeksiyonunun tanısı daha çok çeşitli biyolojik, immünolojik veya

nükleik asit temelli yöntemlerle bakterinin oluşturduğu enterotoksinlerin gösterilmesine dayanmaktadır[19].

3. Toksin araştırılmasında kullanılan yöntemler

3.1. LT'nin gösterilmesi

a. Hücre kültürü yöntemi: LT'nin saptanması için kullanılan geleneksel yöntem hücre kültürü yöntemidir. Bu amaçla tek tabakalı fare adrenal hücresi (Y1), Çin hamsteri over hücresi (CHO) veya Afrika yeşil maymun böbrek (vero) hücre kültürleri kullanılır. Toksin hücre morfolojisinde karakteristik değişiklikler oluşturur. LT, Shiga toksinin sitotoksik etkisinden farklı olarak, Y1 hücrelerinin yuvarlaklaşmasına, CHO hücrelerinin ise uzamasına neden olur[20]. Hücre kültürü yöntemi ELISA ve diğer immünolojik yöntemler geliştirilinceye kadar yaygın olarak kullanılmıştır[25].

b. İmmünolojik testler: LT kuvvetli antijenik özellikte olduğundan LT'in saptanabilmesi amacıyla klinik laboratuvarlarda uygulanması hücre kültürüne göre daha kolay ELISA, RPLA gibi yöntemler geliştirilmiştir[20,25]. ELISA yönteminde, bakteri kültüründe (süpernatan) bulunan toksin, plaklara önceden kaplanmış olan GM1 gangliosidlere bağlanır. Daha sonra bağlı toksin, toksine özgül tavşan antikorlarıyla saptanır. LT ayrıca doğrudan özel bir besiyerinde üreyen bakteri kolonileri üzerine uygulanan presipitasyon testi ile de gösterilebilir. Bu yöntemde, LT'ye özgül tavşan antikorları ilave edilerek hazırlanan besiyerinde, toksinin anti-LT antikorlarına bağlanmasıyla bir presipitin halkası oluşur[20]. Stafilokok koaglütinasyonu, lateks aglütinasyonu gibi çeşitli özgül testler yaygın kullanım alanı bulamamıştır[25].

LT'nin (ve kolera toksininin) antijenik olarak saptanması için RPLA da kullanılabilir; bu yöntemle çalışan kitler ticari olarak (VET-RPLA Oxoid; VTEC-RPLA Denka Seiken) mevcuttur. Bu testler kültürde izole edilen 5-6 *E.coli* kolonisinin seçilerek sıvı besiyerinde bir gece inkübe edilmesi ve toksin salınımını arttırmak amacıyla polimiksin-B'li ortamda tekrar 4 saat inkübasyonunu takiben süpernatanda veya membran filtrasyonu sonucu elde edilen süzüntüde toksin aranması esasına dayanır[19,20,25]. Bu yöntemler içinde özellikle GM1-gangliosid ELISA, LT saptanmasında kullanılan en yaygın yöntem olmuştur. Daha sonra özgül monoklonal antikorlar kullanılarak ST ve LT'in birarada saptandığı GM1-ELISA testi geliştirilmiş ve epidemiyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmıştır[25].

3.2. ST'nin gösterilmesi

ETEC suşlarının bir kısmı sadece ST oluşturduğundan bakterinin ST oluşturduğunun gösterilmesi gerekir. ST antijenik özellikte olmayan düşük molekül ağırlıklı bir peptittir. Tavşanın barsak lupunda sıvı toplanmasına neden olan ETEC toksinlerinden ST'nin etkisi LT'ye göre ısıya dayanıklı oluşu ve daha hızlı etkili oluşu ile ayrılabilir. İki farklı ST (ST-I ve ST-II) saptanmıştır. İnsandan izole edilen suşlarda daha çok ST-I bulunur. ST-I'in de iki varyantı (STh ve STp) tanımlanmıştır[19,20,25].

a. Bebek fare testi: ST-I saptanmasında en sık kullanılan yöntem bebek fare testidir ve bu test kültür süpernatantının fareye perkutan enjeksiyonundan sonra barsak sıvısının ölçülmesine dayanır[20].

b. İmmünolojik testler: Antijenik özellikte olmayan ST'nin bir protein taşıyıcıya bağlanmasıyla antikorlar elde edilince bu antikorlar RIA yönteminde kullanılmıştır. ST saptanmasında da bir diğer yöntem yarışmacı ELISA yöntemidir (Denka Seiken ve Oxoid). Her iki testin de meme emen fare testi ile uyumlu sonuçlar verdiği ve daha az deneyim gerektirdiği bildirilmiştir[20].

LT hasta kişilere göre sağlıklı kişilerden daha fazla izole edilidiğinden LT oluşturan ETEC'in patojen olarak öneminin göreceli olarak daha az olduğu, ya da ST oluşturan suşların daha şiddetli infeksiyona yol açtığı düşünülmektedir[25].

3.3.Moleküler yöntemler:

Son yıllarda ETEC'in ST ve LT'leri klonlanmış, sekanslanmış ve genetik kontrolü ve aktarılabilir plazmitleri tanımlanmıştır[25]. Ancak LT ve ST'nin saptanması bir ETEC izolatını tanımlamakla birlikte böyle suşların çoğunun hayvanlar için özgül kolonizasyon faktörlerinin olduğu ve böylece insan için patojen olmayabilecekleri de ileri sürülmektedir[20].

LT polinükleotid probların duyarlılıkları ve özgüllükleri yüksektir. LT saptanmasında radyoizotopla veya izotopik olmayan yöntemlerle işaretli problar kullanılmıştır. Enzimle (alkalin fosfataz) işaretli polinükleotid probların kullanıldığı koloni blot hibridazyonunun oldukça güvenilir olduğu bildirilmektedir. ST polinükleotid probların (olasılıkla genin küçük oluşu nedeniyle) düşük duyarlılık ve özgüllük sorunu vardır. Bu nedenle ST saptanması için genellikle daha duyarlı ve özgül oligonükleotid problar geliştirilmiştir. Son zamanlarda LT, ST ve STEC Stx'ini kodlayan genleri saptayan üçlü (trivalan) oligonükleotid bir prob önerilmiştir; ilk çalışmalarda bu probtan iyi sonuçlar alınmıştır. ETEC ile infekte kişiler dışkıları ile çok sayıda bakteri çıkardıklarından dışkı-blot hibridizasyonu da tanı için kullanılmaktadır[20].

ETEC tanısında PCR ile doğrudan dışkı örneği ya da izole edilen koloniyle çalışıldığında başarılı sonuçlar alınmıştır[25]. Daha sonra PCR yönteminin modifiye edilmesiyle tek reaksiyonda birden fazla hedef bölgenin çoğaltılabildiği (birden fazla sayıda primerin kullanıldığı) çoklu PCR yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemde LT ve ST oluşturan bakteriler yanında diğer ishal etkeni *E.coli'*ler de saptanabilmektedir[25].

ETEC infeksiyonlarının tanısı için seçilecek yöntem laboratuvarın olanaklarına göre değişebilir. Burada anımsanması gereken bir nokta plazmitte kodlanan virulans genlerinin kolaylıkla kaybolabileceği veya regülatör genlerinin kaybolmasına bağlı olarak sessiz kalabileceğidir. Bunun yanında bazen mevcut genlerdeki mutasyonlar nedeniyle ETEC kolonizasyon faktörleri bakteri yüzeyinde oluşmayabilir; fenotipik yöntemlerle saptanamayan bu faktörler sadece moleküler yöntemlerle saptanabilmektedir. Ne yazık ki geliştirilen bunca tekniğe rağmen her laboratuvarda kolaylıkla uygulanabilecek bir yöntem henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle gelişmekte olan ülkelerde ishal etkenleri ile çalışan rutin laboratuvarlar ETEC (ve diğer patotiplerin) tanısını koyamamakta, bu bakteriler ancak araştırma veya referans laboratuvarlarında araştırılabilmektedir. Tanıda gözönüne alınması gereken diğer noktalardan biri, ETEC'in belirtisiz çocuklardan izolasyon oranının % 0-20 arasında olması, diğeri ETEC infeksiyonlarında birden fazla etkenin eşlik ettiği (miks) infeksiyon oranının yaygın (% 40'a kadar çıkabilmektedir) olmasıdır[25].

EİEC İNFEKSİYONLARININ TANISI

EİEC suşlarının *Shigella* türlerinden ve diğer *E.coli* suşlarından ayırt edilmesi zordur. EİEC suşlarının çoğu *Shigella*'lar gibi laktozu kullanmaz ve lizini dekarboksile etmez[2]. Genellikle identifikasyon için önce bakterinin *E.coli* olduğunun saptanması aynı zamanda *Shigella*'nın genotipik ve fenotipik özellikleri yönünden de incelenmesi gerekir[2,5,20].

EİEC ve *Shigella* için geleneksel fenotipik test Sereny testidir. Epitel hücrelere invazyon yapabilme özelliğinde olan bu bakteriler kobayda keratokonjunktivite neden olurlar. Tanıda ayrıca tek tabakalı HEp-2 veya HeLa hücre kültürlerinde hücre içi bakterilerin varlığı araştırılabilir[19,20].

İnvazyon özelliği ile ilgili genlerin saptanmasına yönelik nükleik asit temelli yöntemler çoğunlukla araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Bakterinin invaziv oluşu ile ilişkili 120-140 MDa'lık büyük plazmiti (pINV plazmiti) plazmit DNA elektroforezi ile saptanabilir. EİEC'nin invaziv özelliği *Shigella* suşlarının da bir özelliği olduğundan bu yöntemler aynı zamanda *Shigella*'yı da saptayan yöntemlerdir[19].

EİEC ve *Shigella* için iki polinükleotid prob tanımlanmıştır. Bunlardan ilki olan pMR17 probu *Shigella flexneri* serotip 5'in pInv bölgesinden elde edilen 17 kb'lik *Eco*R1 fragmentidir. Diğeri, *ial* ise EİEC suşunun pInv bölgesinden elde edilen 2.5 kb'lik *Hind*III fragmentidir. Her iki prob da virulan EİEC suşları için hemen hemen % 100 duyarlı ve özgül bulunmuştur. *ial* geni sekanlarına göre oluşturulan 21 bazlık bir oligonükleotid, polinükleotid probla aynı duyarlık ve özgüllükte bulunmuştur. Ancak, EİEC suşlarının in-vitro pasajlar veya suşun saklanması sırasında pINV plazmitini kaybedebileceği ve bu nedenle suşların dışkıdan elde edilir edilmez incelenmesi gerektiği bildirilmektedir[20]. Son zamanlarda PCR ile yapılan araştırmalarda EİEC ve *Shigella*'nın Inv plazmitinde bulunan invaz-

yonla ilişkili *ipa* veya *ipaH* genlerinin saptanmasına yönelik primerler gündeme gelmiştir[9,19]. *Ial, ipa* veya *ipaH* primerleri, EİEC suşlarının identifikasyonunda, diğer *E.coli* patotipleri ile birlikte çoklu PCR sistemi içinde sıklıkla kullanılmaktadır[1,9,24,31]. Ayrıca, dışkı örneklerinde *ipaC* antijenini saptayan monoklonal antikorların kullanıldığı bir ELIZA yöntemi ve i*paC* genine yönelik koloni blot yöntemleri geliştirilmiştir. Uygulaması kolay olan bu yöntemlerin tarama amacıyla kullanılabileceği bildirilmektedir[22,29].

EAEC İNFEKSİYONLARININ TANISI

EAEC suşları enterotoksin (LT veya ST) oluşturmayan ve HEp-2 hücrelerinde agregatif aderans (AA) paterni gösteren *E.coli* suşları olarak tanımlanmıştır[20]. Bu gün bu patotipe özgü virulans faktörleri üzerinde yoğun olarak çalışılmakla birlikte EAEC'nin hangi yolla persistan ishale yol açtığı henüz tam olarak bilinmemektedir[32]. Bu nedenle tanı yöntemleri de bakterinin bugün bilinen virulans özelliklerine dayanılarak geliştirilmiştir.

1.Serotiplendirme:

EAEC suşların çoğu agregatif özelliklerine bağlı olarak genellikle otoaglütinasyon verirler; bu tip, tiplendirilemeyen veya O antijeni bulunmayan R (rough) tipi suşlar fenotipik yöntemlerle tanımlanamamaktadırlar[11,32]. Ayrıca EAEC grubu oldukça heterojen bir gruptur[5]. Bir çalışmada 143 EAEC suşunun 93'ünün serotiplendirilebildiği ve serotiplendirilen 93 suşun 47 farklı serotipte olduğu saptanmıştır[11]. Bu nedenlerle serotiplendirme yönteminin EAEC tanısında fazla önemi yoktur[32].

2.Hücre kültüründe aderans fenotipinin gösterilmesi

EAEC tanısında altın standart yöntem *E.coli*'nin dışkıdan izolasyonu ve hücre kültüründe AA paterninin gösterilmesidir. Bu amaçla HEp-2 hücreleri kullanılır; hücrelere tuğla yığını şekilde tutunan bakteri kümelerinin görülmesi EAEC suşları için çok tipiktir[20,32]. HEp-2 hücre kültürüne bir alternatif olarak, geleneksel yöntemle kıyaslandığında % 98 duyarlılık ve % 100 özgüllüğe sahip formalinle fikse edilmiş HEp-2 hücreleri de kullanılabilir[10].

EAEC identifikasyonunda hücre aderans testinin yerine geçecek daha basit yöntemler tarif edilmiştir[19]. Bu yöntemler arasında polistren üzerinde biyofilm tabakası ve sıvı besiyerinin yüzeyinde ince bir zar (pelikül) oluşumunun aranması sayılabilir.

3.Moleküler yöntemler

EAEC suşlarının çoğunda agregatif aderansla ilgili ve çeşitli virulans genlerini taşıyan yüksek molekül ağırlıklı bir plazmit (pAA) bulunur. Bu plazmitte enteroagregatif ısıya dirençli toksin-1 (EAST-1) geni *(astA)* ve ayrıca AAF/I, AAF/II ve AAF/III'ü kodlayan genler bulunur. HEp-2 hücrelerine tipik aderans gösteren suşlardan yüksek molekül ağırlıklı plazmiti bulunanların "tipik EAEC suşları", buna karşın plazmiti bulunmayan suşların "atipik EAEC suşları" olduğu kabul edilmiştir[32]. EAEC plazmitinde ayrıca antiagregasyon protein transporter geni *(aat)* ve diğer farklı genler de bulunur. Patojen EAEC tanısında moleküler bir yöntemle identifikasyon yapabilmek amacıyla bu ve diğer kimi genlerin hedef seçildiği çeşitli moleküler yöntemler tarif edilmiştir[32].

İlk olarak özgül bir DNA probu (AA veya CVD432 probu) tanımlanmış ve çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır[3,10,19,32]. Daha sonra EAEC için PCR yöntemi geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır[32]. Son veriler AA probunun, virulans geni olduğu düşünülen anti-agregasyon protein transporter *(aat)* genine karşılık geldiğini göstermektedir[19]. Jenkins ve ark.[11]'nın, EAEC suşlarını tanımlayabilmek için farklı problar kullandıkları çalışmalarında HEp-2 pozitif suşların çoğunun *aat* pozitif olduğu saptanmıştır. 143 EAEC suşunun 128'inde (% 90) *aat* geni pozitif bulunmuş, bununla birlikte HEp-2 hücre kültürü ile saptanan EAEC suşlarının % 10'u PCR'la negatif sonuç vermiştir[11]. Daha sonra dışkı kültürlerinden izole edilen tipik ve atipik EAEC suşlarını tanımlayabilmek amacıyla *aat* genine ilave olarak pheU patojenite adasında bulunan kromozomal bir gene *(aai)* veya EAST genine *(astA)* özgü farklı primerlerin kullanıldığı çoklu PCR yöntemi tarif

edilmiştir[12]. Bu genlerin tek başına EAEC'yi tanımlayıcı özellikte olmadığı, buna rağmen birden fazla primerin kullanılmasıyla pozitiflik oranının arttığı ileri sürülmüştür[12].

EAEC grubunda agregatif aderansla ilgili genlerdeki heterojenlik nedeniyle tanıda tek bir hedef genin seçilememesi moleküler yöntemlerle bu bakterilerin genotipik identifikasyonu güçleştirmektedir[10,11,32]. Son çalışmalarda *aatA* geni ve diğer kimi virulans faktörlerinin AggR kontrolü altında olduğu ve bu nedenle tipik EAEC suşlarında belirleyici olarak kabul edilen *aggR* geninin tanıda kullanılabilecek daha güvenilir bir hedef olduğu bildirilmiştir[7,19]. Bugün için HEp-2 hücre kültürü ve henüz hiçbiri % 100 özgül bulunmayan CVD432 probu ve/veya çoklu PCR yöntemleri tanı için kullanılmakla birlikte gittikçe artan oranda izole edilmeye başlayan bu patotipin tanısında daha duyarlı, özgül ve pratik yöntemlerin geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir[9,32].

DAEC İNFEKSİYONLARININ TANISI

Kimi yazarlarca potansiyel patojen olarak kabul edilen, bir çok çalışmada sağlıklı kontrollerde de saptanan ve bu nedenle patojenliği hâlâ tartışmalı olan DAEC suşları (önceki adı HEp-2 aderan *E.coli*) HEp-2 aderans testinde hücre yüzeyini tamamen kaplayan diffüz (yaygın) aderans (DA) paterni göstermeleriyle tanınırlar[6,19,20,26]. DAEC identifikasyonu için çeşitli DNA probları ve PCR testleri önerilmiştir[19].

Hem üropatojen hem de ishal etkeni *E.coli*'lerle ilgili olarak *daa* operonu ve *afa* gen kümeleri tanımlanmıştır. *daa* operonunda bulunan genlerin diffüz aderansla ilgili bir fimbriya adezini olan F1845'i (Dr hemaglütinin ile ilişkili bir fimbriya adezini), *afa* genlerinin ise fimbriya dışındaki adezinleri kodladığı bildirilmektedir[6,20]. DAEC'nin *daaC* geninden türetilen 700 baz çiftlik polinükleotid bir fragment, DNA probu (pSML852 ya da F1845 probu) olarak kullanılmaktadır[3,6,20,26]. Çalışmalardan farklı sonuçlar alınmakla birlikte DAEC suşlarının yaklaşık % 75'inin F1845 gen probu ile pozitif sonuç verdiği bildirilmektedir. Ancak F1845 ile Dr ailesinden diğer adezinlerin genetik ilişkisi nedeniyle bu prob ile yalancı pozitif sonuç alınabilmektedir[20]. Dışkı örneklerinden izole edilen ishal etkeni *E.coli* patotiplerinin tanısında çoklu PCR yöntemi ile yapılan bir çalışmada DAEC tanısında *daaE* geninin amplifikasyonu için kullanılan bir primerle başarılı sonuç alındığı[31], yine çoklu PCR yönteminin kullanıldığı son bir çalışmada daha korunmuş bir gen olan *daaD* genine yönelik primerler ile % 100 özgül, % 99 duyarlı sonuç alınabildiği bildirilmiştir[7]. Bu bakterilerin gerçek virulans faktörleri tanımlandıkça tanı yöntemleri de gelişecektir.

KAYNAKLAR

1. Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC: Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic Escherichia coli and Shigella spp, J Clin Microbiol 2004;42(12):5849-53.
2. Cheasty T, Smith HR: Escherichia, "Borriello SP, Murray PR, Funke G (eds): Topley&Wilson's Microbiolgy and Microbial Infections, 10. baskı" kitabında s. 1360-85, Hodder Arnold, ASM Press, London (2005).
3. Cohen MB, Nataro JP, Bernstein DI, Hawkins J, Roberts N, Staat MA: Prevalence of diarrheagenic Escherichia coli in acute childhood enteritis: a prospective controlled study, J Pediatr 2005;146(1):54-61.
4. Coia JE: Nosocomial and laboratory-acquired infection with Escherichia coli O157, J Hosp Infect 1998;40(2):107-13.
5. Donnenberg MS: Enteobacteriaceae, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 6. baskı" kitabında s.2567-86, Churchill Livingstone, Philadelphia (2005).
6. Forestier C, Meyer M, Favre-Bonte S et al: Enteroadherent Escherichia coli and diarrhea in children: a prospective case-control study, J Clin Microbiol 1996;34(12):2897-903.
7. Guion CE, Ochoa TJ, Walker CM, Barletta F, Cleary TG: Diagnosis of the diarrheagenic Escherichia coli using melting curve analysis of a real-time multiplex polymerase chain reaction, J Clin Microbiol 2008 (Baskıda).
8. Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW: Identification of enteropathogenic Escherichia coli by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene, J Clin Microbiol 1995;33(5):1375-7.

9. Hien BT, Scheutz F, Cam PD et al: Diarrheagenic Escherichia coli and Shigella strains isolated from children in a hospital case-control study in Hanoi, Vietnam, J Clin Microbiol 2008;46(3):996-1004.
10. Huang DB, Mohanty A, DuPont HL, Okhuysen PC, Chiang T: A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative Escherichia coli, J Med Microbiol 2006;55(Pt 10):1303-11.
11. Jenkins C, Chart H, Willshaw GA, Cheasty T, Smith HR: Genotyping of enteroaggregative Escherichia coli and identification of target genes for the detection of both typical and atypical strains, Diagn Microbiol Infect Dis 2006;55(1):13-9.
12. Jenkins C, Tembo M, Chart H T et al: Detection of enteroaggregative Escherichia coli in faecal samples from patients in the community with diarrhoea, J Med Microbiol 2006;55(Pt 11):1493-7.
13. Kaplan SL, Keusch GT: Diarrhea-and dysentery-causing Escherichia coli "Feigin RD, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan SL (eds): Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 5. baskı" kitabında s.1431-49, Saunders, Philadelphia (2004).
14. Karch H, Janetzki-Mittmann C, Aleksic S, Datz M: Isolation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture, J Clin Microbiol 1996;34(3):516-9.
15. Karmali MA, Petric M, Bielaszewska M: Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in Escherichia coli, J Clin Microbiol 1999;37(2):396-9.
16. Kehl KS, Havens P, Behnke CE, Acheson DW: Evaluation of the premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli, J Clin Microbiol 1997;35(8):2051-4.
17. Kehl SC: Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic Escherichia coli infections, J Clin Microbiol 2002;40(8):2711-5.
18. Mackenzie AM, Lebel P, Orrbine E et al: Sensitivities and specificities of premier E.coli O157 and premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of infection with verotxin (Shiga-like toxin)-producing Escherichia coli. The SYNSORB Pk Study investigators, J Clin Microbiol 1998;36(6):1608-11.
19. Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Strockbine NA: Escherichia, Shigella, and Salmonella, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds): Manual of Clinical Microbiology, 9th baskı" kitabında s.670-87, ASM Press, Washington (2007).
20. Nataro JP, Kaper JB: Diarrheagenic Escherichia coli, Clin Microbiol Rev 1998;11(1):142-201.
21. Novicki TJ, Daly JA, Mottice SL, Carroll KC: Comparison of sorbitol MacConkey agar and a two-step method which utilizes enzyme-linked immunosorbent assay toxin testing and a chromogenic agar to detect and isolate enterohemorrhagic Escherichia coli, J Clin Microbiol 2000;38(2):547-51.
22. Pal T, Al-Sweih NA, Herpay M, Chugh TD: Identification of enteroinvasive Escherichia coli and Shigella strains in pediatric patients by an IpaC-specific enzyme-linked immunosorbent assay, J Clin Microbiol 1997;35(7):1757-60.
23. Paton JC, Paton AW: Methods for detection of STEC in humans, "Philpott D, Ebel F (eds): E.coli Shiga Toxin Methods and Protocols" kitabında s.9-26, Humana Press, Totowa, New Jersey (2003).
24. Persson S, Olsen KE, Scheutz F, Krogfelt KA, Gerner-Smidt P: A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic Escherichia coli in the routine diagnostic laboratory, Clin Microbiol Infect 2007;13(5):516-24.
25. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB: Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention, Clin Microbiol Rev 2005;18(3):465-83.
26. Scaletsky IC, Fabbricotti SH, Carvalho RL et al: Diffusely adherent Escherichia coli as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study, J Clin Microbiol 2002;40(2):645-8.
27. Slutsker L, Ries AA, Greene KD, Wells JG, Hutwagener L, Griffin PM: Escherichia coli O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features, Ann Intern Med 1997;126(7):505-13.
28. Smith HR, Scotland SM: Isolation and identification methods for Escherichia coli 0157 and other Vero cytotoxin producing strains, J Clin Pathol 1993;46(1):10-7.
29. Szakál DD, Schneider G, Pál T: A colony blot immune assay to identify enteroinvasive Escherichia coli and Shigella in stool samples, Diagn Microbiol Infect Dis 2003;45(3):165-71.
30. Tarr PI, Neill MA, Clausen CR, Watkins SL, Christie DL, Hickman RO: Escherichia coli O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology, J Infect Dis 1990;162(2):553-6.
31. Vidal M, Kruger E, Durán C et al: Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic Escherichia coli asso-

ciated with enteric infections, J Clin Microbiol 2005;43(10):5362-5.
32. Weintraub A: Enteroaggregative Escherichia coli: epidemiology, virulence and detection, J Med Microbiol 2007;56(Pt 1):4-8.
33. Wolf MK: Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic Escherichia coli, Clin Microbiol Rev 1997;10(4):569-84.