

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

HEMOLİTİK ÜREMİK SENDROM TANILI HASTALARDAN İZOLE EDİLEN
SHİGA TOKSİN ÜRETEN *Escherichia coli* İZOLATLARININ O
SEROTİPLERİNİN VE TOKSİN VARYANTLARININ KLİNİK DURUMLA
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

DR. ELİF OKUMUŞ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

2021

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**HEMOLİTİK ÜREMİK SENDROM TANILI HASTALARDAN İZOLE EDİLEN
SHİGA TOKSİN ÜRETEN *Escherichia coli* İZOLATLARININ O
SEROTİPLERİNİN VE TOKSİN VARYANTLARININ KLİNİK DURUMLA
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

DR. ELİF OKUMUŞ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. AYNUR KARADENİZLİ

ETİK KURUL ONAY TARİHİ VE SIRA SAYISI: 03.04.2019-2019/111

2021

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	IV
Kısaltmalar Dizelgesi:	V
Çizelgeler dizelgesi.....	VII
Çizimler Dizelgesi	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Escherichia coli.....	3
2.1.1. Escherichia coli Türünün Genel Özellikleri ve Gruplandırılması	3
2.1.1.1. Kommensal <i>E. coli</i>	3
2.1.1.2. Ekstraintestinal <i>E. coli</i> (ExPEC)	4
2.1.1.3. İntestinal (Diyarejenik) <i>E. coli</i>	4
2.1.1.4. Enteropatojenik <i>E. coli</i> (EPEC).....	4
2.1.1.5. Enterotoksijenik <i>E. coli</i> (ETEC)	4
2.1.1.6. Enteroagregatif <i>E. coli</i> (EAEC)	5
2.1.1.7. Enteroinvaziv <i>E. coli</i> (EIEC).....	5
2.1.1.8. Diffüz aderan <i>E. coli</i> (DAEC)	5
2.1.1.9. Enterohemorajik <i>E. coli</i> (EHEC) / Shiga Toksin Üreten <i>E. coli</i> (STEC)...	5
2.2. Virulans Faktörleri	6
2.2.1. Shiga Toksin (<i>Stx</i>)	6
2.2.2. İntimin (<i>eae</i>).....	7
2.2.3. Enterohemolizin (<i>ehxA, e-hlyA</i>)	7
2.2.4. Katalaz Peroksidaz (<i>KatP</i>).....	7
2.2.5. Ekstraselüler Serin Proteaz (<i>EspP</i>)	8

2.2.6. <i>Cytolethal Distending Toksin-V (CDT- V)</i>	8
2.2.7. Subtilaz Toksin (<i>SubAB</i>).....	8
2.2.8. <i>STEC agglutine edici adezyon proteini (Saa)</i>	8
2.2.9. <i>Uzun Polar Fimbria (Lpf)</i>	8
2.3. STEC Enfeksiyonlarında Patogenez	8
2.4. STEC Enfeksiyonlarında Epidemiyoloji	12
2.5. Hemolitik Üremik Sendrom (HÜS).....	13
2.6. Hemolitik Üremik Sendromda Risk Faktörleri	14
2.6.1. Küçük yaş.....	14
2.6.2. İshal başlangıcı ile HÜS kliniğinin oluşumu arasındaki geçen süre.....	14
2.6.3. Lökositoz	14
2.6.4. Kanlı İshal Varlığı.....	14
2.6.5. Nörolojik tutulum.....	14
2.6.6. Oliguri/Anuri Varlığı.....	14
2.6.7. Makroalbuminüri varlığı.....	15
2.6.8. Hipertansiyon Gelişmesi.....	15
2.6.9. Transfüzyon İhtiyacı.....	15
2.6.10. Diyaliz İhtiyacı.....	15
2.6.11. Antibiyotik Kullanımı.....	15
2.7. STEC ‘O’ Serotipleri ve HÜS İlişkisi.....	16
2.8. STEC Toksin Varyantları ve HÜS İlişkisi.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Besiyeri ve Tamponların Hazırlanması	18
3.1.1. SMAC Agar	18
3.1.2. CT-SMAC Agar	18
3.1.3. EDTA (Ph: 8.0)	18

3.1.4. Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE)	18
3.2. Örneklerin Alınması ve Transportu	19
3.3. Kültür İşlemleri.....	19
3.4. DNA İzolasyonu	19
3.5. Stx1 ve Stx2 Gen Varlığının Araştırılması	19
3.6. O Serotiplerinin Belirlenmesi	21
3.7. Stx1 Varyantlarının Belirlenmesi.....	25
3.8. Stx2 Varyantlarının Belirlenmesi.....	27
3.9. Klinik verilerin toplanması	29
3.10. İstatistik	29
3.11. Etik Kurul Onayı	29
3.12. Proje Desteği:	29
4. BULGULAR	30
4.1. Hastaların Genel Özellikleri	30
4.2. İzolatların Genel Özellikleri.....	30
4.3. Hastaların Klinik Durumuna İlişkin Bilgiler	36
4.4. Serotiplendirme ve Toksin varyantlarının Klinik Verilerle İlişkisinin Araştırılması.....	37
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	58
7. ÖZET	59
8. ABSTRACT	61
9.EKLER	63
10. KAYNAKLAR.....	65

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince desteğini üzerimden eksik etmeyen, sayesinde birçok deneyim kazandığım; duruşu, azmi, liderliği ve sabrı ile örnek olan, tez çalışmamın her aşamasında tecrübe ve bilgisiyle bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Aynur Karadenizli'ye,

Eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, desteğini yanımda hissettiğim saygıdeğer hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fetiye Kolaylı'ya,

Uzmanlık eğitimim süresince karşılaştığım her zorlukta başvurduğum, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan saygıdeğer hocalarım; Prof. Dr. Fatma Budak, Prof. Dr. Sema Keçeli, Prof. Dr. Zeki Yumuk, Prof. Dr. Devrim Dünder, Prof. Dr. Murat Hökelek ve Dr. Öğr. Üyesi Erdener Balıkçı'ya,

Tez projemdeki desteği için Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, istatistiksel analizlerin yapılmasında desteklerinden dolayı Dr. Öğr. Üyesi Emel Azak'a ve deneylerimin gerçekleşmesinde bana destek olan Dr. Kim Stanford'a,

Hem yardımlarıyla hem de güzel dostluklarıyla bana destek olan sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Uzuner, Arş. Gör. Dr. Doğanhan Kadir Er, Uzm. Dr. Serpil Genç, Dr. Agim Osmani, Uzm. Dr. Fatma Zehra Duymaz, Uzm. Dr. Melike Kurt, Arş. Gör. Eda Özçelik, Arş. Gör. Dr. Melike Demir, Arş. Gör. Dr. Handan Gerez, Arş. Gör. Dr. Merve Yıldız, Arş. Gör. Dr. Yılmaz Pulcu, Arş. Gör. Dr. Özlem Güler'e ve laboratuvarlarımızda özveriyle çalışan tüm teknisyen arkadaşlarıma,

Üzerimde büyük emeği olan, bana çalışma sevgisini aşıl原因ayan canım annem Leyla Demirtaş'a, her zaman beni destekleyen sevgili babam Adnan Demirtaş'a, hayatıma ışık saçan sevgili kardeşlerim Muhammed Emin Demirtaş, Zeynep Demirtaş ve Rukiye Demirtaş'a,

Sevgisini, sabrını ve desteğini her zaman kalbimde hissettiğim yol arkadaşım Erhan Okumuş'a ve neşe kaynaklarım olan çocuklarım Ali Ensar Okumuş'a ve Betül Sare Okumuş'a çok teşekkür ederim.

Kısaltmalar Dizelgesi:

CDT	:Cytolethal Distending Toksin
CT-SMAC	:Cefixime Tellurite Sorbitol MacConkey
DAEC	:Diffüz Aderan <i>Escherichia coli</i>
DNA	:Deoksiribonükleikasit
eae	:İntimin
e-hly	:Enterohemolizin
EAEC	: Enteroaggregatif <i>Escherichia coli</i>
EDTA	:Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EHEC	:Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>
EIEC	:Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i>
EPEC	:Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>
EspP	: <i>Escherichia coli</i> secreted serine protease
ETEC	:Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	:Ekstraintestinal patojenik <i>Escherichia coli</i>
Gb	:Globotriaosylceramide
HK	:Hemorajik Kolit
HÜS	:Hemolitik Üremik Sendrom
KatP	:Katalaz-peroksidaz
LEE	:Locus of enterocyte effacement
Lpf	:Uzun Polar Fimbria

NaOH	:Sodyum Hidroksit
PZR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpoS	: RNA polimeraz, sigma S
rRNA	:Ribozomal Ribonükleik Asit
STEC	:Shiga toksin üreten <i>Escherichia coli</i>
Saa	:STEC aglutine edici adezyon proteini
SMAC	:Sorbitol MacConkey
Stx	:Shiga toksin
SubAB	:Subtilaz Toksin
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
Tir	:Transloke intimin receptorü
VTEC	:Verotoksijenik <i>Escherichia coli</i>
wzx	:O-antijen flippaz
wzy	:O-antijen polimeraz

Çizelgeler dizelgesi

1. Çizelge. Stx1 ve Stx2 genlerinin primer dizileri ve moleküler ağırlıkları.
2. Çizelge. Stx1 ve Stx2 genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı
3. Çizelge. Stx1 ve Stx2 genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR koşulları
4. Çizelge. O serotip ilişkili genler, primer dizileri ve moleküler ağırlıkları
5. Çizelge. O26, O103, O104, O111, O145, O157 genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı
6. Çizelge. O26, O103, O111, O145, O157 genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR koşulları
7. Çizelge. O45 ve O121 genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı
8. Çizelge. O45 ve O121 gen bölgelerinin belirlenmesinde kullanılan PZR koşulları
9. Çizelge. Stx1 varyant genleri, primer dizileri ve moleküler ağırlıkları
10. Çizelge. Stx1 varyantlarının belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı
11. Çizelge. Stx1 varyantlarının belirlenmesinde kullanılan PZR koşulları
12. Çizelge. Stx2 varyant genleri, primer dizileri ve moleküler ağırlıkları
13. Çizelge. Stx2 varyantlarının belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı
14. Çizelge. Stx2 varyantlarının belirlenmesinde kullanılan PZR koşulları
15. Çizelge. O Serotiplerinin Yıllara Göre Dağılımı
16. Çizelge. Stx varyantlarında makroalbuminüri varlığının dağılımı
17. Çizelge. Stx varyantlarında gastrointestinal şikayetlerin başlangıcıyla başvuru arasında geçen sürenin dağılımı
18. Çizelge. Stx varyantlarında hastanede yatış süresinin dağılımı
19. Çizelge. Kanlı ishal varlığında lökositöz ve transfüzyon ihtiyacının dağılımı
20. Çizelge. Kanlı ishalde ishal süresinin dağılımı
21. Çizelge: Hastane yatış süresinin makroalbuminüri, hipertansiyon, diyaliz ihtiyacı ve nörolojik komplikasyon varlığına bağlı dağılımı
22. Çizelge. Başvuru sonrası antibiyotik kullanımında diyaliz ihtiyacı ve nörolojik komplikasyonun dağılımı
23. Çizelge. Başvuru sonrası antibiyotik kullanımında ishal süresi ve hastanede yatış süresinin dağılımı

Çizimler Dizelgesi

1. Çizim. Shiga toksinin etki mekanizması
2. Çizim. Shiga toksinin enterositten kana geçiş yolları
3. Çizim. Stx PZR çalışmasının jel görüntüleri
4. Çizim. O103, O111, O145, O157, O26, O104 serotiplerinin PZR çalışmasının jel görüntüleri
5. Çizim. O121 ve O45 serotiplerinin PZR çalışmasının jel görüntüleri
6. Çizim: İzolatların O serotiplerinin dağılımı
7. Çizim: Stx1 varyantlarının PZR çalışmasının jel görüntüleri
8. Çizim. Stx2a PZR çalışmasının jel görüntüsü
9. Çizim. Stx2c PZR çalışmasının jel görüntüsü
10. Çizim. İzolatların toksin varyantlarının dağılımı
11. Çizim. Klinik Verilerin Dağılımı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Shiga toksin (Stx); 19. yüzyılda *Shigella dysenteriae*'nin neden olduğu dizanterinin bakteriyel kökenini ilk tespit eden Kiyoshi Shiga'nın ismiyle adlandırılmıştır. Bundan yaklaşık 80 yıl sonra aynı toksinin (Stx1) *Escherichia coli* (*E. coli*) izolatlarında da üretildiği tespit edilmiş. Bazı *E. coli* suşlarının daha sonra Stx1'e etki olarak benzer fakat biyolojik ve immünolojik açıdan farklı Stx2 toksinini ürettiği gösterilmiştir.¹ Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC) nonkomplike ishalden, Hemorajik Kolit (HK)'e, Hemolitik Üremik Sendrom (HÜS)'a kadar değişen farklı klinik durumlara yol açmaktadır. Çocukluk çağı HÜS'lerinin %90'ından STEC sorumludur.² HÜS, mikroanjiyopatik hemolitik anemi, trombositopeni, böbrek yetmezliği ile karakterize edilen bir hastalıktır. Shiga toksinin Vero hücreleri üzerindeki geri dönüşümsüz sitotoksik etki gösterdiği tespit edilerek STEC, HÜS'ten sorumlu ajan olarak tanımlanmıştır.³

STEC yabani ve evcil birçok hayvanın bağırsak mikrobiyotasında bulunur ve herhangi bir hastalık belirtisi olmaksızın bu hayvanlar dışkılarıyla ortama STEC bırakabilirler. STEC, hayvanların dışkılarıyla kontamine olan et, süt ve süt ürünleri ile bulaşabilmektedir. Toprakta ve yüzey sularında STEC bulunması oldukça yaygın olup, O157: H7 gibi bazı STEC suşları çevrede uzun süre kalabilmektedir. Fekal bulaş ya da bu kirli sularla kontaminasyon sonrası sebze ve meyve gibi gıdalarla da STEC bulaşı olabilmektedir. Dolayısıyla STEC bulaşında 3 temel yol; kontamine gıda, çevre ve hayvanlardan veya enfekte olmuş insanlardan direkt bulaştır.⁴

Shiga (Vero) toksinleri üreten 200'den fazla *E. coli* serotipi olmasına rağmen STEC'in birkaç serotipi insanlarda hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom gibi ciddi hastalıklarla ilişkilidir.⁵ O26, O45, O103, O111, O121, O145, O157 STEC serogrupları insanlarda dominant olarak görülen STEC'in "ilk yedi" serogruplarını temsil etmektedir.⁶ 2011 yılında Almanya'da meydana gelen salgında 4000'den fazla olgu tespit edilmiş ve 855'i HÜS tanısı almış ve 53 olgu ölümle sonuçlanmıştır. Bu salgına sebep olan STEC serotipi O104 olarak belirlenmiş ve O104 serotipinin de salgınlara sebep olabileceği belirlenmiştir.⁷ Bu serotiplere sahip STEC; Stx1 ve/veya Stx2 üretebilir ve '*Locus of enterocyte effacement* (LEE)' olarak isimlendirilen bir patojenisite adasına sahiptir. LEE,

bağırsakların bakteriyel kolonizasyon fonksiyonlarına ait ve bağırsak mukozasının tahrip edilmesine neden olan bazı genleri taşır ve böylece hastalık sürecine katkıda bulunur.⁴

STEC suşları stx1 ve/veya stx2 genlerine sahip olabilir ve bu genler kendi içerisinde çeşitli varyantlara sahiptir. Epidemiyolojik çalışmalar stx2 tarafından kodlanan Stx2 toksininin, stx1 tarafından kodlanan Stx1 toksinine göre daha ağır kliniklere sebep olduğunu göstermiştir.⁸ Primatlarda yapılan çalışmada Stx2'nin tek başına verilmesi HÜS kliniği oluştururken, aynı dozda Stx1 verilmesinde ise HÜS oluşmamıştır.⁹ Fare modellerinde ise Stx2, 100 kat daha güçlü tespit edilmiştir.¹⁰ Stx1'in in varyantları Stx1a, Stx1c ve Stx1d iken, Stx2'nin varyantları Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f ve Stx2g'dir. Stx2a, Stx2c ve Stx2d Hemolitik Üremik Sendrom gibi ağır klinik durumlarla ilişkili iken, Stx2b ve Stx2e ishal vb. hafif klinik durumlar veya fekal taşıyıcılıkla ilişkilidir.¹¹ HÜS hastalarından izole edilen STEC'lerde en sık rastlanan toksin genotipi stx2'dir. Hastanın 18 aydan küçük olması, anüri varlığı, anemi varlığı, transfüzyon ihtiyacı, makroalbuminüri, diyaliz ihtiyacı, nörolojik tutulumun olması, hipertansiyon gelişmesi gibi durumlar STEC kaynaklı HÜS için kötü prognostik faktörlerdir.^{12,13} O26, O103, O111 ve O145 serotipleri ile yapılan çalışmada, HÜS ve hemorajik kolitin kötü prognozu ve Stx2 geninin varlığı arasında güçlü istatistiksel ilişki gösterilmiştir.¹⁴

STEC enfeksiyonları ülkemizde bildirilmesi zorunlu hastalık grubundadır. STEC'in serotipler ve toksin profillerinin belirlenmesi, hastalığa neden olma potansiyellerini tahmin etmek ve epidemiyolojik değişiklikleri öngörmek için büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın amacı 2012-2019 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji-2 Laboratuvarı'nda tespit edilen STEC izolatlarının O serotip ve Stx gen profilinin belirlenmesi, bu profilin hastanın klinik profiliyle ilişkisinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Escherichia coli

2.1.1. Escherichia coli Türünün Genel Özellikleri ve Gruplandırılması

Escherichia cinsi bakteriler, *Proteobacteria* filumuna, *Gammoproteobacteria* sınıfına, *Enterobacteriales* takımına, *Enterobacteriaceae* ailesine aittir. *Escherichia coli* (*E. coli*) hem insan bağırsak mikrobiyotasında en sık bulunan fakültatif anaerob olup hem de enterobakteriyel aile içinde en sık karşılaşılan patojen bakteridir. *E. coli*, gram negatif, çoğunlukla hareketli, sporsuz, laktozu fermente eden, katalaz pozitif, oksidaz negatif bir bakteridir.¹⁵

E. coli bağırsak mikrobiyotasında bulunan kommensal bir organizma olmasına rağmen, bazı *E. coli* türleri virülans genler kazanarak hastalıklara yol açabilmektedir. Bu virülans genleri, virülans faktörlerinin yeni kombinasyonlarını oluşturmak için farklı suşlarda mobilize edilebilecek genetik elementler üzerinde veya önceden mobil olan, ancak genomda sabit hale gelmiş olan genetik elementler üzerine kodlanır. Virülans genlerinin çeşitli kombinasyonları ile *E. coli* patotipleri oluşmaktadır.¹⁶

İnsanlar için biyolojik önemi olan *E. coli* türleri hem genetik hem klinik faktörler göz önüne alındığında 3 gruba ayrılır. Kommensal *E. coli*, Ekstraintestinal *E. coli* (ExPEC) ve İntestinal (Diyarejenik) *E. coli*.¹⁷

2.1.1.1. Kommensal *E. coli*

E. coli yenidoğanların bağırsaklarında oluşan ilk bakteri türleri arasındadır.¹⁸ Her ne kadar bağırsaklarda anerobik bakteri sayısı *E. coli*'den fazla olsa da, *E. coli* gastrointestinal mikrobiyotanın baskın fakültatif anaerob elemanı olup, enfeksiyon oluşturmadan bağırsaklarda yaşarlar. Kommensal *E. coli* suşları bağırsaklarda özellikle çekum olmak üzere kolonda yer alır. Bakteriosin üretimi ve benzeri mekanizmalarla kommensal *E. coli* suşları patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu önleyerek konağı korur. Çeşitli virülans genlerinin kazanımıyla patojenik bir suş haline gelebilirler.¹⁹

2.1.1.2. Ekstraintestinal *E. coli* (ExPEC)

E. coli üriner sistem enfeksiyonları, menenjit, pnömoni, osteomyelit, kolesistit, kolanjit, peritonit, selülit, enfeksiyöz artrit gibi enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Enfeksiyonları hastane kaynaklı veya toplum kökenli olabilmektedir. ExPEC enfeksiyonlarının birçoğu, erken yaş (neonatal), yaşlılık, kemoterapi veya HIV gibi bağışıklık sistemini zayıflatan durumlardan kaynaklanan immün yetmezlik ile ilişkilidir. Yoğun antibiyotik direnciyle birlikte önemi hızla artmaktadır.²⁰

2.1.1.3. İntestinal (Diyarejenik) *E. coli*

İntestinal *E. coli* türleri enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), diffüz aderan *E. coli* (DAEC) ve enterohemorajik *E. coli* (EHEC) olmak üzere altı temel kategoriye ayrılmıştır.¹⁶

2.1.1.4. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)

EPEC tanımlanan ilk *E. coli* patotipidir. 1945'te İngiltere'de bebeklerde ishal salgınlarına neden olması ile tanınmıştır. Gelişmiş ülkelerde EPEC'e bağlı ishal salgınları büyük ölçüde kaybolmuş olsa da, gelişmekte olan ülkelerde EPEC ishale bağlı bebek ölümlerinin sebepleri arasında yer almaktadır.²¹

EPEC enfeksiyonlarında klasik histopatoloji bağlanma/silme (attaching/effacing) bulgusu olarak bilinir. Bakteri intestinal epitel hücrelerine sıkıca bağlanarak hücre iskeletinde değişikliğe neden olarak, mikrovillus yapılarının yok olmasına neden olur. EPEC bu patogeneze pili ve intimin gibi virülans faktörleri ile sebep olmaktadır. Hastalarda sulu ishale neden olmaktadır.¹⁶

2.1.1.5. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)

ETEC hafif, kendini sınırlayan ishalden, şiddetli ishale kadar değişebilen kliniğe yol açan bir sulu ishal etkenidir. Bu mikroorganizma gelişmekte olan ülkelerdeki çocuk ishallerinin ve bu ülkelere seyahat edenlerdeki turist diyaresinin temel sebebidir.²¹

ETEC ince bağırsak mukozasının yüzeyini kolonize eder ve intestinal sekresyona yol açan enterotoksinleri salgılar. ETEC'e ait virulans faktörler çok sayıda fimbriyal adezinler, ısıya duyarlı ve dirençli toksinleridir.¹⁶

2.1.1.6. Enteroagregatif *E. coli* (EAEC)

EAEC, hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerdeki çocuk ve yetişkinlerde persistan ishalin nedeni olarak giderek daha fazla tanınmakta ve dünya genelinde çeşitli salgınlara nedeni olarak tanımlanmaktadır. EAEC, stabil ve labil toksin salgılamaması ve HEP-2 hücrelerine otoagregatif olarak bağlanıp, 'tuğla yığını' benzeri adezyon paterni göstermesi ile bilinmektedir.²¹

EAEC enfeksiyonlarında temel strateji intestinal mukozanın kolonizasyonu ve enterotoksin ve sitotoksinlerin salınımıdır.²² EAEC virülansını çeşitli toksinlere ve agregasyonu sağlayan fimbriyal yapıya sahip olması sağlar.¹⁶

2.1.1.7. Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC)

EIEC, biyokimyasal, genetik ve patojenik olarak *Shigella* türleri ile yakından ilişkilidir. Bir çok çalışmaya göre taksonomik olarak çok benzer olmalarına rağmen, klinik olarak farklılıkları ile bu isimlendirme yerini korumaktadır.^{23,24} *Shigella* türleri insanlarda ateş, karın ağrısı, kanlı ishale giden bir dizanteri tablosuna yol açarken; EIEC çoğu zaman inflamatuvar kolit, sulu ishale, nadiren dizanteriye sebep olmaktadır.²¹

EIEC'de temel patogenezi hücre içine girme ve hücreden hücreye geçiştir. Bunu sağlayan temel virulans özelliği ise Tip-3 sekresyon sistemidir.¹⁶

2.1.1.8. Diffüz aderan *E. coli* (DAEC)

DAEC, Hep-2 hücre tabakalarına diffüz olarak yapışma özelliği ile bilinmektedir. DAEC izolatlarının %75'i F1845 ve benzeri adezyon proteini salgırlar. Yapıştıkları hücre etrafında hücresel uzantılara sebep olarak sitopatik etki oluştururlar. Yapılan çalışmalarda 12 ay üzerindeki çocuklarda ishale sebep olduğu bildirilmiştir.¹⁶

2.1.1.9. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) / Shiga Toksin Üreten *E. coli* (STEC)

EHEC, Shiga toksin veya Vero hücreleri üzerindeki sitopatik etkisi nedeniyle Vero toksin isimli toksin üreten bakteri grubudur. Bu nedenle Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC)

veya Verotoksijenik *E. coli* (VTEC) olarak isimlendirilir.¹⁶ Shiga Toksin taşıyan *E. coli* izolatları kanlı ishal ve birçok sekele sebep olarak hemorajik kolit ve trombositopeni, anemi, böbrek yetmezliği ile karakterize Hemolitik Üremik Sendrom (HÜS)' e sebep olabilir.²

2.2. Virulans Faktörleri

2.2.1. Shiga Toksin (*Stx*)

EHEC izolatlarının temel virülans faktörü Shiga toksindir. Shiga toksin; 19. yüzyılda *Shigella dysenteriae*'nin neden olduğu dizanterinin bakteriyel kökenini ilk tespit eden Kiyoshi Shiga'nın ismiyle adlandırılmıştır. Bundan yaklaşık 80 yıl sonra aynı toksinin (*Stx1*) *E. coli* izolatlarında da üretildiği tespit edilmiş. Bazı *E. coli* suşlarının daha sonra *Stx1*'e etki olarak benzer fakat biyolojik ve immünolojik açıdan farklı *Stx2* toksinini ürettiği gösterilmiştir. *Stx1* ve *Stx2* ökaryotik hücrelerde protein sentezini inhibe edebilen yaklaşık 70 kDa ağırlığındaki proteinlerdir. 60S ribozomun 28S rRNA biriminden adenini çıkartarak protein sentezini inhibe ederler. *Stx* bir AB5 protein toksindir. A alt ünitesi enzimatik aktif kısmı olup, B alt ünitesi reseptöre bağlanmada işlev görür. Toksinin N-glikozidaz aktivitesi A alt ünitesi tarafından gerçekleştirilirken, B alt ünitesi ise toksinin globotriaosylceramide (Gb3) reseptörlerine bağlanmasında işlev görür.¹ Gb3 reseptörü yoğun olarak böbrek glomerüllerinde, proximal tübülde, beyin, karaciğer ve pankreasta bulunur. Toksin primer olarak böbreği etkilemektedir. Ayrıca, yapılan son çalışmalarda bağırsak epitelinde *Stx*'lerin bağlanmasını sağlayan Gb4 ve daha az sayıda Gb3 reseptörü bulunmaktadır.^{25,26}

Stx1 ve *Stx2* lambdoid fajlar olup kromozoma yerleşmişlerdir. Fajlar; gen kopya sayılarının amplifikasyonu ile *Stx* üretimini, faj gen promotorlarının aktivitesini ve *Stx* salınımını düzenlemektedir. Bu genler doğrudan kalıtımla aktarılabilirdiği gibi, faj yoluyla horizontal olarak da aktarılabilir.²⁷ *Stx1*, *Shigella dysenteriae* toksiniyle neredeyse aynıdır; tek bir amino asitle farklılık gösterir.²⁸

STEC suşları *Stx1* ve/veya *Stx2* genlerine sahip olabilir ve bu genler kendi içerisinde çeşitli varyantlara sahiptir. *Stx1*'in in varyantları *Stx1a*, *Stx1c* ve *Stx1d* iken, *Stx2*'nin varyantları *Stx2a*, *Stx2b*, *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e*, *Stx2f* ve *Stx2g*'dir. Varyantlar arasında bazı aminoasit değişiklikleri vardır.^{29,30} *Stx2*'nin *Stx1*'e göre daha ağır kliniklere sebep olduğu

bilinmektedir. Stx2a, Stx2c ve Stx2d Hemolitik Üremik Sendrom gibi ağır klinik durumlarla ilişkili iken, Stx1 varyantları ve Stx2b ve Stx2e ishal ve benzeri hafif klinik durumlar veya fekal taşıyıcılıkla ilişkilidir.¹¹

2.2.2. İntimin (*eae*)

STEC suşları Locus of enterocyte effacement (LEE) olarak isimlendirilen genomik bir patojenisite adasına sahiptir. LEE, konak hücreye efektör molekülleri ileten ve konakçı hücrenin iskelet yapısını bozan bir tip III salgılama sistemini kodlar ve bu sistemle bağırsak mukozasının tahrip edilmesine neden olarak hastalık sürecine katkıda bulunur. LEE ayrıca epitelyal hücrelere bağlanmayı sağlayan intimin (*eae*) proteinini kodlar. İntimin LEE pozitif STEC suşlarında diagnostik bir marker olarak kullanılan önemli bir virulans faktörüdür, bağırsak epiteline yapışmadan sorumludur.³¹

İntimin histopatolojik olarak 'bağlanma/yapışma' lezyonları olarak bilinen yapıdan sorumludur.²⁵ HÜS, HK gibi durumlar ile intimin varlığı ilişkilidir.³² İntimin, Tir (translocated intimin receptor) reseptörleri aracılığı ile intestinal mukozaya tutunmayı sağlar. Tir protein, konak hücre sitoplazmasında bulunan N- ve C-terminal alanlarını kullanarak konak hücre iskeleti ve sinyal bileşenleri ile etkileşime girebilir.³³

2.2.3. Enterohemolizin (*ehxA*, *e-hlyA*)

Plazmid üzerinde bulunan enterohemolizin (*ehxA*) geni HÜS ve ciddi ishallerle ilişkili bulunmuştur.^{34,35} Enterohemolizin varlığı Stx varlığı ile korele olup, *ehxA* STEC izolatlarının saptanmasında epidemiyolojik belirteç olarak görülmektedir.³⁶

Bakteriyofaj ile ilişkili enterohemolizin (*e-hlyA*) genetik olarak plazmid ile taşınan *ehxA* ile ilişkili değildir. Yapılan çalışmalarda *e-hlyA* direkt bir hemolizin salgılamayıp, bakteri hücrelerinin erimesine sebep olarak sessiz bir hemolizin salınımına neden olduğu bildirilmiştir. Cytolysin-A olarak bilinen bu sessiz hemolizin eritrositlerde por oluşturur.³⁷ Bu toksinin *E. coli* O157:H7 ve EPEC suşlarında varlığı bildirilmiştir.^{38,39}

2.2.4. Katalaz Peroksidaz (*KatP*)

KatP gen bölgesi plazmid üzerinde kodlanmaktadır. Bakteriyi peroksidaz aracılı oksidatif hasardan korur. Özellikle O157 STEC izolatlarında tespit edilmiştir.⁴⁰

2.2.5. Ekstraselüler Serin Proteaz (*EspP*)

EspP, plazmid üzerinde kodlanmaktadır. *Enterobacteriaceae* ailesinin serin proteaz autotransporter enzimlerinden biridir. Hem O157 hem de non-O157 STEC serotiplerinde tespit edilmiştir. İnsan koagülasyon faktör-V'i üzerinde proteolitik aktivite göstererek STEC'e bağlı kanlı ishal patogenezinde rol aldığı düşünülmektedir.⁴¹

2.2.6. Cytolethal Distending Toksin-V (*CDT- V*)

Cytolethal distending toxin; eae olmayan suşlarda endotel hasarından sorumlu tutulmuştur. Endotelde proliferasyon inhibisyonuna, hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda hem O157 suşlarında hem de non-O157 STEC izolatlarında bu toksine rastlanmıştır.⁴²

2.2.7. Subtilaz Toksin (*SubAB*)

Subtilaz toksin 35 kD ağırlığında, ölümcül bir AB5 toksindir. Plazmid üzerinde kodlanmaktadır. STEC izolatlarında nadir tespit edilen virulans faktörlerinden biridir. insanlardaki ciddi STEC enfeksiyonlarında izole edilmiş olup, vasküler hasar, tromboz ve nekroz ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir.⁴³

2.2.8. STEC agglutine edici adezyon proteini (*Saa*)

Dış membran proteinidir. Otoagglutinasyon adhezin özelliği vardır. Bazı STEC suşlarında tespit edilmiştir. LEE pozitif suşlarda görülmediği bilinmektedir.⁴⁴

2.2.9. Uzun Polar Fimbria (*Lpf*)

Yapılan çalışmalarda *Lpf* proteininin bağırsak mukozasına adezyon ve kolonizasyonda rol aldığı görülmüştür.⁴⁵

2.3. STEC Enfeksiyonlarında Patogenez

STEC enfeksiyonlarının patogenezinde ve hayatı tehdit eden sekellerinin oluşmasında en büyük neden güçlü bir Stx üretimidir. Bunun yanında patogenez bakteri ve konak faktörler arasındaki bir dizi karmaşık etkileşimleri içeren çok aşamalı bir süreçtir.

STEC enfeksiyonlarında doz oldukça düşük olup ortalama 100 bakteri yeterlidir.⁴⁶ Oral olarak alınan STEC midenin asidik ortamına dayanabilir ve bağırsağa ulaşır. Düşük Ph ortamı ile alınan STEC suşlarının asidik ortama toleransının daha yüksek olduğu bilinmektedir. Ayrıca STEC suşlarının sahip olduğu Sigma faktör (rpoS) Ph>2.5 olan ortamlarda stasyonier fazda *E. coli*'nin daha uzun kalmasını sağlayabilmektedir.⁴⁷

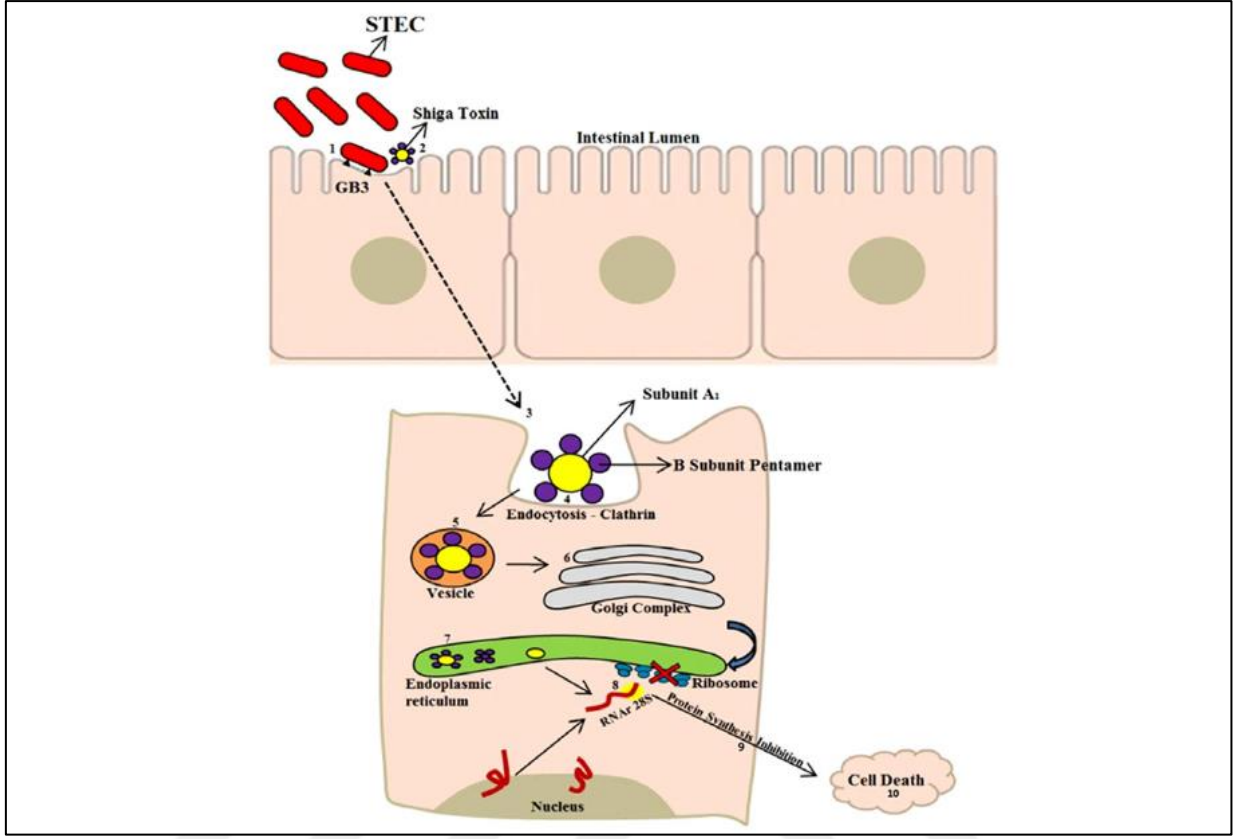
Mide asidinden geçen STEC izolatları etkisini kolona adhere olarak göstermektedir. Bazı izolatlar diffüz olarak adhere olurken, bazıları mikrokoloniler şeklinde adhere olmaktadır.⁴⁸

STEC'in patojenitesinde rol alan temel genler LEE isimli patojenisite adasında yer almaktadır. LEE patojenisite adasında, LEE-1 ile LEE-5 olarak adlandırılan 5 operona bölünmüş 41 gen vardır. LEE 1,2 ve 3 bölgeleri bakteriyel proteinlerin enterosit içine girişini sağlayan Tip 3 sekresyon sistemini kodlamaktadır. LEE-4 bölgesinde EspADB gibi tutunma ile ilgili, LEE-5 bölgesinde ise tir, eae gibi yapışma/bağlanma ile ilgili gen bölgeleri kodlanmaktadır. Bu bağlanma sonucunda enterositlerin yüzeyindeki mikrovillusler hasar görerek histopatolojik değişiklikler meydana gelir.⁴⁹

Enterosit ile bakteri teması sonucu Tip 3 sekresyon sistemi devreye girerek bakteri ve konak hücre arasında bir köprü görevi görüp, birçok sitotoksik proteinin enterosite geçişini sağlar. İntimin ve tir arasındaki kalıcı bağlanma hücre iskeletinde değişikliklere neden olur.⁵⁰ LEE açısından negatif olan STEC izolatları ise bağlanmada saa geni ile kodlanan adezyon proteinini kullanmaktadır.⁴⁴

STEC'in enterosite bağlanmasıyla birlikte Stx1 ve/veya Stx2 salınımı başlar. Stx2 toksini daha ciddi hastalıklarla ilişkilidir. Toksinin B ünitesi Gb3 reseptörlerine bağlanırken, A ünitesi protein sentezinin inhibisyonunu sağlayarak toksik etki oluşturur. Bu ünitesinin N-glikozidaz aktivitesi sayesinde mRNA'nın 28S birimine etki ederek protein sentezini inhibe eder (1. Çizim).^{51,52}

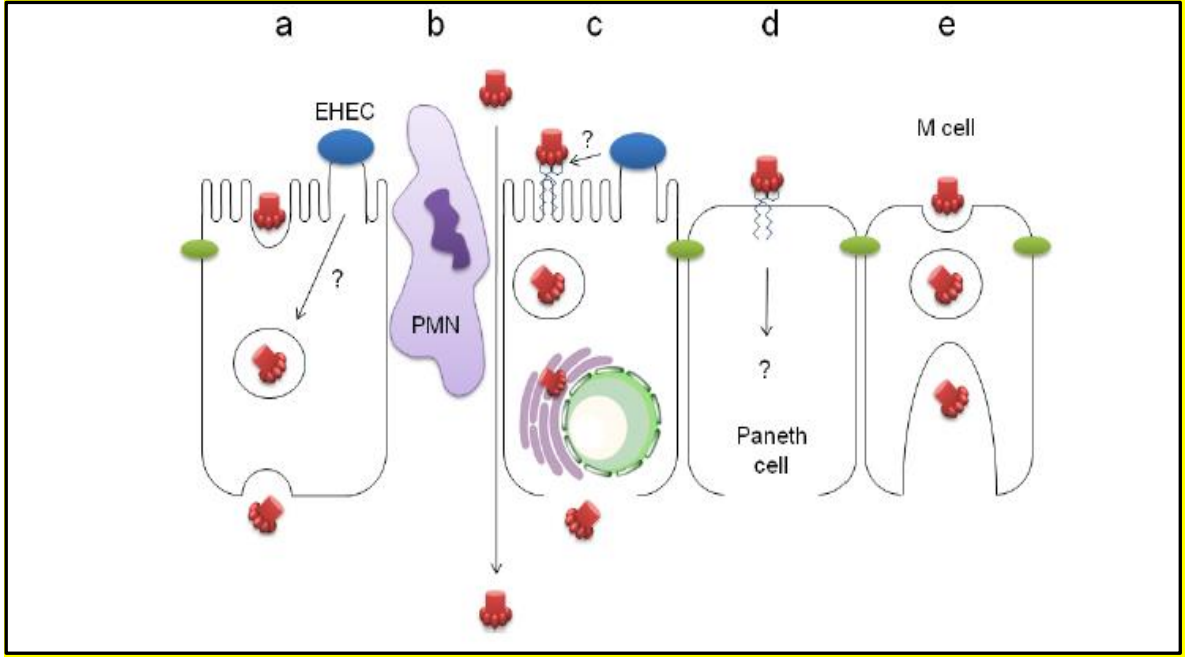
1. Çizim. Shiga toksinin etki mekanizması⁵²



1. Bakterinin Gb3 reseptörüne bağlanması 2.Stx salgılanması 3.Stx'in taşınması 4.Toksinin hücreye endositozu 5. Klatrin kaplı vezikül oluşumu 6.Stx'in Golgi kompleksine taşınması 7. Vezikülün açılıp A ve B ünitelerinin ayrılması 8. A ünitesinin N-glikozidaz aktivitesiyle 28S RNA üzerindeki adenin modifiye edici etkisi. 9. Protein sentezinin inhibisyonu 10.Hücre ölümü

STEC enfeksiyonlarının sistemik komplikasyonları Stx ile ilişkilidir. Stx kan yoluyla böbrek, merkezi sinir sistemi gibi organlara ulaşır. Yapılan çalışmalarda kanda serbest Stx'e rastlanmamış olup, Stx' in nötrofillere bağlı taşındığı tespit edilmiştir. Stx'in enterositten kana geçişinde birkaç olası yol tespit edilmiştir. Bunlar; enfeksiyonun indüklediği Gb3 bağımsız transitoz, nötrofil transmigrasyonu sırasında paraselüler transport, enfeksiyonun Gb3 reseptör oluşumunu indüklemesiyle retrograd transport ve hücre ölümü ile Stx salınımı, Paneth hücrelerinden Gb3 bağımlı translokasyon, M hücreleriyle transitozdur (2. Çizim).⁵³

2. Çizim. Shiga toksinin enterositten kana geçiş yolları⁵³



a.Enfeksiyonun indüklediği Gb3 bağımsız transitoz b.Nötrofil transmigrasyonu sırasında paraselüler transport c.Enfeksiyonun Gb3 reseptör oluşumunu indüklemesiyle retrograd transport ve hücre ölümü ile Stx salınımı d.Paneth hücrelerinden Gb3 bağımlı translokasyon e.M hücreleriyle transitoz

Toksinin oluşturduğu endotel hasarı sonucu hücrede şişme, trombüs oluşumu, bazal membran hasarı, kapiller kan akımında azalma gerçekleşir. Bu durum Gb3 reseptörünü bulunduran böbrek glomerüllerini ve merkezi sinir sistemini etkiler.⁵³ Beyin ve renal glomerüllerdeki mikrovasküler endotel hücrelerde apoptoza yol açar. Stx hasarın sonucu birçok sitokin salınır, koagülasyon kaskadı aktifleşir, trombositopeni görülür, kapillerlerde tromboz gerçekleşir ve sistemik bulgular oluşur. Kapillerden geçen eritrositlerin parçalanmasıyla fragmente eritrositler (miğfer hücresi) gözükür ve hastada nonimmün mikroanjiyopatik hemolitik anemi tablosu oluşur. Böbreklerde yer alan podositlerin hasarı ile proteinüri oluşur. Hem glomerüllerde hem tubüllerde apoptoz sonucu böbrek yetmezliği gerçekleşir. Sonuçta, anemi, trombositopeni ve böbrek yetmezliği ile karakterize HÜS meydana gelir. Ayrıca Stx beyinde de hücre ölümü ve mikrovasküler tromboza neden olabilir. Bunun sonucunda letarji, huzursuzluk, nöbet gibi nörolojik komplikasyonlar gerçekleşir.⁵⁴

2.4. STEC Enfeksiyonlarında Epidemiyoloji

Gıda kaynaklı enfeksiyonlar küresel bir halk sağlığı sorunudur.⁵⁵ STEC ciddi hastalıklara sebep olması nedeniyle gıda kaynaklı enfeksiyonlar arasında olup, önem taşımaktadır. STEC enfeksiyonları; basit ishal, HK, HÜS, son dönem böbrek yetmezliği, ve ölüme yol açabilmektedir.⁵⁶ Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre STEC enfeksiyonlarının yıllık insidansı 2.8 milyon vakadır.⁵⁷

STEC enfeksiyonu her yaş grubunda görülebilir. Enfeksiyonların üçte biri 20-59 yaş arası yetişkinlerde görülürken, büyük kısmı 5 yaşından küçük çocuklar ve 60 yaş üzerindeki bireylerde görülmektedir.⁵⁸ O157 ve non-O157 serotipleri için ortalama yaş benzerdir.⁵⁹

STEC enfeksiyonlarında az pişirilmiş etlerin tüketilmesi temel bulaş yolu olarak bilinmektedir. Özellikle sığırlarda STEC taşıyıcı olarak bulunmakta ve hayvan dışkı ile çevreye yayılabilmektedir. STEC enfekte olmuş bir hayvan, hayvan dışkısı, kontamine olmuş bir gıda veya su yoluyla primer olarak ya da enfekte kişiden sekonder olarak bir başkasına bulaşabilir.⁶⁰ Enfekte kişiler ortalama 10-14 gün STEC taşıyıcısı olup, bulaş kaynağı olabilmektedir. Bazı vakalarda bu süre daha uzun sürebilmektedir ve bireyler asemptomatik olarak dışkılarında STEC taşıyarak çevresindekilere veya ev halkına STEC bulaştırabilmektedir.⁶¹

STEC enfeksiyonlarının çoğu sporadik vaka olmasına rağmen STEC'e bağlı salgınlar da görülmektedir. 2011 yılında Almanya'da görülen STEC O104:H4'e bağlı salgın son yıllarda STEC'e bağlı gerçekleşen salgınlar arasında en çarpıcı örnektir. Mayıs ve Haziran ayları arasında, 55 gün içinde 3816 hasta O104:H4 gastroenterit tanısı almış ve 54'ü ölümlerle sonuçlanmıştır.⁶²

STEC enfeksiyonlarında inkübasyon süresi 3-4 gündür. Hastalar karın ağrısı, sulu ishal, kanlı ishal, ateş gibi şikayetlerle başvurmaktadır. Semptomatik hastaların %23- 47' sinde hastaneye yatış gerekmektedir. Ortalama hastanede yatış süresi 6-14 gündür. Hastaların çoğu komplike olmayan ishal ile bir hafta içinde iyileşirken, hemorajik kolitli hastaların %6-25'inde anemi, trombositopeni ve böbrek yetmezliği ile karakterize olan HÜS oluşur. Bu oran çocuklarda daha yüksek olup, enfekte çocukların üçte ikisinde HÜS tablosu gelişir.³⁰

2.5. Hemolitik Üremik Sendrom (HÜS)

HÜS; mikroanjiyopatik hemolitik anemi, trombositopeni akut böbrek hasarı ile karakterizedir. En sık 5 yaşından küçük çocukları etkilemektedir. Çocuklarda HÜS vakalarının %85-90'ı STEC ilişkilidir. Kalan vakalar ise kompleman aktivasyon yolağındaki kalıtımsal ya da kazanılmış bozukluklara bağlı olup atipik HÜS olarak adlandırılır.⁶³

STEC ilişkili HÜS ile hastaneye yatırılan çocukların kliniği; basit müdahalelerle tedavi edilebilen durumlardan, multiorgan yetmezliği ve yoğun bakım ihtiyacı gibi kritik durumlara kadar geniş bir spektrum göstermektedir. HÜS'te renal replasman tedavisine sık olarak ihtiyaç duyulmaktadır. HÜS'ün mortalitesi %3-5'tir.⁶⁴

STEC ilişkili HÜS tanısı kriterleri; ishal sonrası 21 gün içinde HÜS tanısı almak, anemi varlığı (Hemoglobin ve hematokrit değerlerinin değerleri yaşa bağlı olarak beklenen değerlerin altında olması), trombositopeni (platelet $<150 \times 10^3/\mu\text{l}$), azotemi (13 yaşından küçüklerde Serum Kreatinin $> 1,0 \text{ mg/dL}$, 13 yaşından büyüklerde Serum Kreatinin $> 1,5 \text{ mg/dL}$ olması) ve parçalı eritrositlerin olmasıdır. Tüm kriterlerin kapsanması kesin vaka, son kriterin olmaması olası vakayı bildirir.⁶⁴

STEC bulaşı sonrası 15 gün içinde hastalarda karın ağrısı, ishal bulantı, kusma gibi şikayetler oluşmaktadır. HÜS kliniği hızlı bir şekilde gelişir ve mikroanjiyopatik hemolitik anemi, trombositopeni, akut böbrek hasarı tablosu oluşur. Merkezi sinir sistemi tutulumu, rektal prolapsus, bağırsak stenozu, akut pankreatit gibi diğer organ tutulumları da tabloya eşlik edebilir. Hastaların %10'u son evre böbrek hastalığına ilerlemektedir. Bazı hastalarda tedavi sonrası kalıcı böbrek hasarı, kronik böbrek yetmezliği görülebilmektedir.⁶⁵

HÜS nörolojik komplikasyonlara, diyaliz ihtiyacına, ciddi akut böbrek hasarına, yoğun bakım ihtiyacına neden olabilir. Böyle ciddi bir hastalığın gidişatını tahmin edip önlem alabilmek, hastayı ve yakınlarını bilgilendirebilmek için bazı haber vericilerin varlığı yardımcı olacaktır.^{64,66}

2.6. Hemolitik Üremik Sendromda Risk Faktörleri

2.6.1. Küçük yaş

HÜS sıklıkta 5 yaş altındaki çocuklarda ağır seyretmektedir. Bebeklik döneminde HÜS kliniği daha ağır olmaktadır. Mody ve ark.⁶⁴'nın STEC ilişkili 770 hasta ile yaptığı çalışmada küçük yaşın HÜS'e bağlı ölümler için risk olduğu bildirilmiştir.

2.6.2. İshal başlangıcı ile HÜS kliniğinin oluşumu arasındaki geçen süre

Mody ve ark.⁶⁴'nın STEC ilişkili 770 hasta ile yaptığı çalışmada İshal başlangıcı ile HÜS kliniğinin oluşumu arasındaki geçen sürenin HÜS kliniğini etkilediği, kısa sürede HÜS tablosu oluştuğunda ölüm oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

2.6.3. Lökositoz

Mody ve ark.⁶⁴'nın STEC ilişkili 770 hasta ile yaptığı çalışmada lökositoz varlığı mortalite için risk olarak saptanmıştır.⁶⁴

2.6.4. Kanlı İshal Varlığı

STEC enfeksiyonlarında kanlı veya sulu ishal olabilir. STEC ilişkili HÜS vakalarında daha çok kanlı ishal görülmektedir. Mody ve ark.⁶⁴'nın STEC ilişkili 770 hasta ile yapılan çalışmada kanlı ishal varlığı erken haber verici model olarak değerlendirilmediği halde, kanlı ishali olmayan çocukların hiçbiri ölmemiştir. Ayrıca kanlı ishali olmayan çocuklarda kandaki lökosit sayısı daha düşük saptanmıştır ($\sim 14.9 \times 10^9/L$).⁶⁴

2.6.5. Nörolojik tutulum

Yapılan çalışmalarda Santral sinir sistemi tutulumu STEC ilişkili HÜS ölümlerinde en sık katkıda bulunan faktör olarak görülmüş olup, kötü prognostik belirteç olduğu bildirilmiştir.^{64,66}

2.6.6. Oligüri/Anüri Varlığı

Oakes ve ark.⁶⁶'nın STEC ilişkili HÜS nedeniyle incelediği 17 ölüm vakasının sonucunda oligüri/anüri varlığı fatal HÜS için erken haber verici olduğu bildirilmiştir.

2.6.7. Makroalbuminüri varlığı

İdrarda günlük 300 mg üzerinde protein atılımına aşikâr proteinüri veya makroalbuminüri denir. Hemolitik üremik sendrom geçiren hastalarda aşikâr proteinüri varlığı geç dönem renal komplikasyonlar için bir risk faktörü olarak belirlenmiştir.⁶⁷

2.6.8. Hipertansiyon Gelişmesi

Yapılan çalışmalara göre STEC ilişkili HÜS sırasında hipertansiyon gelişmesi kötü prognozla ilişkilendirilmiştir.

2.6.9. Transfüzyon İhtiyacı

HÜS'lü hastalarda gelişen mikroanjiyopatik hemolitik anemi sonucunda hemoglobin değeri düşmektedir. Bazı hastalarda transfüzyon ihtiyacı olmaktadır. Yapılan çalışmalarda transfüzyon ihtiyacının olması, özellikle bu ihtiyacın uzun süreli olması kötü prognoz belirteci olarak kabul edilmiştir.⁶⁸

2.6.10. Diyaliz İhtiyacı

HÜS'lü hastalarda böbrek fonksiyonlarının etkilenmesi sonucunda akut böbrek hasarı çok ciddi bir hal alıp diyaliz ihtiyacı doğmaktadır. Yapılan çalışmalarda diyaliz ihtiyacı olan hastalarda ölüm oranları daha fazla bulunmuş ve bu durumda hastalığın prognozu daha kötü olarak saptanmıştır.⁶⁹

2.6.11. Antibiyotik Kullanımı

STEC enfeksiyonlarının başlangıcında ishal, karın ağrısı, bulantı, kusma gibi gastrointestinal sistem bulguları olmaktadır. HÜS tablosu oluşmadan önce hastalar bu nedenlerle antibiyotik kullanabilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda antibiyotik kullanımı ile STEC nedeniyle HÜS gelişme riskinin arttığı bildirilmiştir. Ancak HÜS prognozunu nasıl etkilediği henüz netleşmemiştir.⁷⁰

STEC enfeksiyonlarında antibiyotik kullanımının zararlı etkileri Stx üretiminin veya salgılanmasının artması gibi bazı sekonder mekanizmalar nedeniyledir. Özellikle antibiyotik dirençli STEC suşlarının bağırsak florasını bozup, STEC için uygun bir ortam oluşturması; antibiyotiklerin hücre duvarına hasarı sonucu salınan toksin miktarının

artması; antibiyotiklerin Stx üreten genleri indüklemesi, DNA hasarı sonucu bakterilerde oluşan SOS cevabı sonrası bazı genlerin indüklenmesi bu sekonder mekanizmalara örnek verilebilir.⁷¹

2.7. STEC 'O' Serotipleri ve HÜS İlişkisi

O antijeni farklı şeker ve şeker bağları içermesi nedeniyle hücre yüzeyinin en değişken yapılarından biridir. Bu antijenik değişiklik bakterinin immün sistemden kaçışını kolaylaştırır. O antijeninin sentezinde 2 *housekeeping* gen kümesi rol oynar: galF ve gnd. Bu genler 3 gruba ayrılmaktadır: şeker biyosentez genleri, şeker transfer genleri ve flippaz (wzx) ve polimerazı (wzy) içeren O antijen işleme genleri. wxz ve wzy gen bölgeleri O antijenine spesifik olduğu için bu bölgeler O seriotip belirlemek için PZR yönteminde kullanılan gen bölgeleridir.⁷²

STEC izolatları yüzey lipopolisakariti olan O antijeni ve flagella proteini olan H proteinine göre serotiplere ayrılır. İnsanda hastalığa sebep olabilen 70'den fazla STEC serotipi tanımlanmıştır.⁷³ Fakat STEC' in birkaç serotipi insanlarda hemorajik kolit ve HÜS gibi ciddi hastalıklarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. O26, O45, O103, O111, O121, O145, O157 serogruplarına ait STEC, insanlarda dominant olarak görülen STEC'in "ilk yedi" serogruplarını temsil etmektedir ve HÜS ile ilişkili olduğu bilinmektedir.^{74,75}

Önceleri STEC O157:H7 serotipi HÜS'lü hastalarda en sık görülen serotip olarak bilinirken, son yıllarda non- O157 olarak bilinen STEC izolatları daha sık görülmekte ve zamanla artmaktadır.⁷⁶ Hem O157 hem de non- O157 grubu STEC izolatları şiddetli hatta ölümcül HÜS'e neden olduğu bilinmektedir.⁷⁷

Non-O157 ilişkili STEC enfeksiyonları dünya genelinde artmaktadır ve çeşitli salgınlara neden olabilmektedir. STEC enfeksiyonlarının %20- 50'sinin non-O157 grubuna ait olduğu tahmin edilmektedir. Fakat dağılım ülkelere göre değişmektedir. Non-O157 suşları rutin olarak laboratuvarında taranmadığı için net oran belirtmekte güçlük yaşanmaktadır.⁷⁸

Farklı O serotiplerinin patolojik potansiyellerin de farklı olduğu aşikâr, fakat henüz netlik kazanmamıştır. O serotiplerinin hastalığın kliniğine etkisi hala tartışmalıdır.⁷⁷

2.8. STEC Toksin Varyantları ve HÜS İlişkisi

Shiga toksin STEC'in en önemli virulans faktörü olup 2 ana gruba ayrılır: Shiga toksin 1 (Stx1) ve Shiga toksin 2 (Stx2) Tüm STEC izolatları Stx1 ve/veya Stx2 toksinlerine sahiptir. Epidemiyolojik çalışmalar Stx2'nin Stx1'e göre daha ağır kliniklere sebep olduğunu göstermiştir.⁸

Stearns-Kurosawa ve ark.⁹'nin primatlar üzerinde yaptığı çalışmada primatlarda Stx2'nin tek başına varlığı HÜS kliniği oluştururken, aynı dozda Stx1 varlığında ise HÜS oluşmamıştır. Fare modellerinde ise Stx2'nin Stx1'e göre 100 kat daha potent olduğu belirlenmiştir.¹⁰

Stx1 ve Stx2 genleri çeşitli varyantlara sahiptir. Stx1'in in varyantları Stx1a, Stx1c ve Stx1d iken, Stx2'nin varyantları Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f ve Stx2g'dir. Stx subtipleri arasında sadece birkaç aminoasit değişikliği mevcut, fakat bu küçük değişiklik patolojik potansiyeli değiştirebilmektedir. Stx2 DNA homolojileri incelendiğinde Stx2a, Stx2c ve Stx2d birbirine daha benzer iken, Stx2b, Stx2e, Stx2f ve Stx2g'nin daha az ilişkili olduğu saptanmıştır. Stx2a, Stx2c ve Stx2d Hemolitik Üremik Sendrom gibi ağır klinik durumlarla ilişkili iken, Stx2b ve Stx2e insanlarda hastalıkla ilişkilendirilmemiştir. Bazı çalışmalarda Stx2b ve Stx2e insanlarda hafif klinik durumlarla veya fekal taşıyıcılıkla ilişkilendirilmiştir. Stx2e'nin yenidoğan domuzlarda ölümcül ödeme sebep olduğu görülmüştür.^{1,11}

Stx2a ve Stx2b'nin B subuniti arasında dokuz aminoasit değişikliği vardır ve 2C terminal aminoasidinin yokluğu mevcuttur. Bu değişiklikler farklı reseptöre bağlanmalarına sebep olur. Stx2e, diğer Stx subtiplerinin bağlandığı Gb3 reseptörü yerine Gb4 reseptörüne bağlanmayı tercih eder.¹¹

Yalnızca Stx1 gen taşıyıcılığı daha hafif klinik durumlarda olup O26, O111, O103 izolatlarıyla daha çok ilişkilendirilmiştir. Bazı O26 ve O103 izolatlarının Stx2 de taşıdığı görülmüştür.⁷⁹

STEC'in toksin varyantını ve O serotipini belirleyebilmek epidemiyolojik çalışmalara katkıda bulunmak ve hastalık potansiyelini belirleyebilmek için büyük önem taşımaktadır.⁸⁰

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Besiyeri ve Tamponların Hazırlanması

3.1.1. SMAC Agar

SMAC agar (Conda, İspanya) toz besiyeri, üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. 121 °C'de 1 atm basınç altında 25 dakika steril edilmiş, 45 °C'a soğutulduktan sonra 90mm'lik petri kaplarına 25'er ml dökülüp katılaşmaya bırakılmıştır. Hazırlanan besiyerleri kullanım zamanına kadar +4° C'de saklanmıştır.

3.1.2. CT-SMAC Agar

SMAC agar (Conda, İspanya) toz besiyeri, üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. 121 °C'de 1 atm basınç altında 25 dakika steril edilmiş, 45 °C'e soğutulduktan sonra besiyeri içerisine Cefiksim (0,05 mg/l) ve Potasyum Tellürit (2.5 mg/l) eklenerek 90mm'lik petri kaplarına 25'er ml dökülüp katılaşmaya bırakılmıştır. Hazırlanan besiyerleri kullanım zamanına kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3.1.3. EDTA (Ph: 8.0)

Beş yüz mililitre 0,5 M EDTA çözeltisi hazırlamak için; 73.06 g EDTA tartılıp 450 ml distile su içerisinde, manyetik karıştırıcıda 65 °C'de sodyum hidroksit (NaOH) eklenerek çözülmesi sağlanmıştır. NaOH eklenmesi pH 8.0 olduğunda durdurulup, son hacim 500 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanmış ve 121 °C'de 1 atm basınç altında 25 dakika steril edilmiştir.

3.1.4. Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE)

Bir litre 50X TAE tamponu hazırlamak için; 242 g Tris Base tartılıp, 750 ml distile suda çözülmesi sağlanmıştır. Üzerine 0,5 M EDTA'dan 100 ml ve glisial asetik asitten 57,1 ml eklenip bir litreye tamamlanmıştır. Kullanmadan önce 1/50 (1X) oranında seyreltilmiştir.

3.2. Örneklerin Alınması ve Transportu

HÜS şüpheli hastalardan perianal sürüntü ve dışkı örnekleri alınmıştır. Perianal sürüntü örnekleri Stuart medium içerisinde, dışkı örnekleri steril dışkı kapları ile laboratuvara ulaştırılmıştır.

3.3. Kültür İşlemleri

Gelen örneklerden Sorbitollü MacConcey (SMAC) ve Sefiksim ve Potasyum Tellurit içeren Sorbitollü MacConcey (CT-SMAC) agara azaltma ekimi yapılmıştır. Örnekler 37 °C etüvde 24 saat inkübe edilmiş olup, üreme olmayan örneklerin inkübasyonu 48 saate uzatılmıştır.

3.4. DNA İzolasyonu

Besiyerinde üreyen koloniler üzerine steril enjektör yardımıyla 1 ml steril distile su birkaç kez püskürtülüp çekilerek, steril ependorfa aktarılmıştır. Vorteksleme yapıp, 95 °C termal blokta 15 dk inkübe edilmiştir. Örnekler oda ısısına geldikten sonra, 13.000 x g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Supernatant steril yeni bir ependorfa aktarılarak izole DNA olarak kullanılmıştır.

3.5. Stx1 ve Stx2 Gen Varlığının Araştırılması

Stx1 ve Stx2 genleri konvensiyonel PZR yöntemi ile tespit edilmiştir. Primerler için Cebula ve ark.⁸¹'nin çalışması referans alınmıştır. Primer dizileri 1. Çizelgede gösterilmiştir.

1. Çizelge. Stx1 ve Stx2 genlerinin primer dizileri ve moleküler ağırlıkları.

Primer Çifti	Primer Dizisi (5' - 3')	Moleküler Ağırlık (baz çifti)
<i>Stx1- F</i>	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	348 bç
<i>Stx1- R</i>	CACCAGACAATGTAACCGCTG	
<i>Stx2 - F</i>	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG	584 bç
<i>Stx2 - R</i>	CGGTCATCGTATACACAGGAGC	

Stx1 ve Stx2 gen bölgelerinin PZR reaksiyonu için hazırlanan karışımlar 2. Çizelge’de gösterildiği gibidir.

2. Çizelge. Stx1 ve Stx2 genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı

Reaktifler	Bir örnek için
Buffer 10x	1x (2.5 µl)
MgCl ₂	3 mM (3 µl)
Primer	2 µl (Stok konsantrasyonu 2,5 µM)
dNTP	250 µM (0.25 µl)
HotStart Taq Polimeraz	3.75 U (0.31 µl)
Steril Saf Su	14,94 µl
Kalıp DNA	2 µl
Toplam	25 µl

Reaksiyon döngüleri Cebula ve ark.⁸¹’nin çalışmasından optimize edilerek belirlenmiştir. PZR, 3. Çizelge’de belirtilen koşullarda iCycler (BioRad, ABD) marka *thermal cycler*’da gerçekleştirilmiştir.

3. Çizelge. Stx1 ve Stx2 genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR koşulları

Aktivasyon	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	95 °C	1 dk	
Primer bağlanması	61 °C	1 dk	30 döngü
Uzama	72 °C	1 dk	
Son uzama	72 °C	10 dk	
Sınırsız bekletme	4 °C		

PZR ürünlerinin görüntülenmesi için yatay jel elektroforez sistemi kullanılmıştır. Elektrik akımının iletimi için TAE tamponu kullanılmıştır. TAE tamponu içerisinde %1,5'luk agaroz jel hazırlanmıştır. Temiz bir beher içerisinde 10 ml 1X TAE tamponu içerisine 0,45 g agaroz (Conda, İspanya) koyulup total hacim 1X TAE tamponu ile 30 ml'ye tamamlanmıştır. Mikrodalga fırında agaroz eriyinceye kadar ısıtılıp, jelin sıcaklığı yaklaşık 50–55 °C'ye düştüğünde, son konsantrasyon 1 µg/ml olacak şekilde 10 mg/ml'lik stok etidyum bromür solüsyonu eklenmiştir. Taraklar elektroforez yatağına yerleştirildikten sonra içerisine jel dökülmüş ve yaklaşık 20-30 dakika polimerize olması beklenmiştir.

Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarılarak, elektroforez yatağı ile birlikte tanka (Thermo Scientific, ABD) yerleştirilmiştir. Jelin üzeri kapanacak şekilde 1X TAE tamponu eklenmiştir. Jeller arasında karşılaştırma yapabilmek için ilk kuyucuğa 5 µl *GeneRuler 50 bp DNA Ladder* (Thermo Scientific, ABD), diğer kuyucuklara ise örneklere ait PZR ürünlerinden 5 µl yüklenmiştir. Elektroforez tankında 90 V, 400 A, 45 dakika yürütülen örnekler, jel görüntüleme sisteminde değerlendirilmiştir.

3.6. O Serotiplerinin Belirlenmesi

Konvensiyonel PZR O26, O45, O103, O104, O111, O121, O145, O157 gen bölgeleri konvensiyonel PZR amplifikasyon yöntemi ile tespit edilmiştir. O26, O45, O121, O103, O111, O145, O157 primerleri için Paddock ve ark.⁸²'nin çalışması referans alınmıştır. O104 primeri için Zhang ve ark.⁸³'nin çalışması referans alınmıştır. Primer dizileri 4. Çizelgede gösterilmiştir.

4. Çizelge. O serotip ilişkili genler, primer dizileri ve moleküler ağırlıkları

Primer Çifti	Primer Dizisi (5'-3')	Moleküler Ağırlık (baz çifti)	Referans
<i>O26- F</i>	GGGGGTGGGTACTATATTGG	241 bç	Paddock ve ark. ⁸³
<i>O26- R</i>	AGCGCCTATTTTCAGCAAAGA		
<i>O45 - F</i>	GGGCTGTCCAGACAGTTCAT	890 bç	Paddock ve ark. ⁸³
<i>O45 -R</i>	TGTACTIONCACCAATGCACCT		
<i>O103- F</i>	TAAGTACGGGGGTGCTTTTT	716 bç	Paddock ve ark. ⁸³
<i>O103- R</i>	AAGCTCCCGAGCACGTATAA		
<i>O104 - F</i>	GGTTATGTTCTTGTCTTTGC	154 bç	Zhang ve ark. ⁸⁴
<i>O104- R</i>	CTAATACTTGTCTGATACGG		
<i>O111 - F</i>	CAAGAGTGCTCTGGGCTTCT	451 bç	Paddock ve ark. ⁸³
<i>O111- R</i>	AACGCAAGACAAGGCAAAAC		
<i>O121- F</i>	TCATTAGCGGTAGCGAAAGG	587 bç	Paddock ve ark. ⁸³
<i>O121- R</i>	TTCTGCATCACCAGTCCAGA		
<i>O145 - F</i>	TGCTCGACTTTTACCATCAAC	374 bç	Paddock ve ark. ⁸³
<i>O145 - R</i>	AACCAACACCATAACACCTTGTCTT		
<i>O157 - F</i>	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC	296 bç	Paddock ve ark. ⁸³
<i>O157 - R</i>	TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG		

O26, O103, O104, O111, O145, O157 gen bölgelerinin PZR reaksiyonu için hazırlanan karışım Paddock ve ark.⁸²'nin çalışmasından optimize edilerek hazırlanmıştır. PZR karışımında ticari olarak satın alınan Hot Start Green Master Mix (Promega M5122 GoTaq®, ABD) kullanılmıştır. 100 µM stok 6 çift primerden eşit hacimde alınarak 8.33 µM'lık primer karışımı elde edilmiştir. Bu karışımdan 0.86 µl alınarak her bir primerin yoğunluğu 0.36 µM olarak PZR karışımında kullanılmıştır. O26, O103, O104, O111, O145, O157 gen bölgelerinin PZR reaksiyonu için hazırlanan karışımı 5. Çizelgede gösterildiği gibidir.

5. Çizelge. O26, O103, O104, O111, O145, O157 genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı

Reaktifler	Bir örnek için
Hot Start Green Master karışımı	10 µl
Primer (6 çift)	0.86 µl (Stok konsantrasyonu: 8,33 µM)
Steril Saf Su	5.14 µl
Kalıp DNA	4 µl
Toplam	20 µl

Reaksiyon döngüleri Paddock ve ark.⁸²'nin çalışmasından optimize edilerek belirlenmiştir. PZR, 6 . Çizelge'de belirtilen koşullarda iCycler (BioRad, ABD) marka thermal cycler'da gerçekleştirilmiştir.

6. Çizelge. O26, O103, O111, O145, O157 genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR koşulları

Aktivasyon	95 °C	10 dk	
Denatürasyon	95 °C	1 dk	
Primer bağlanması	49 °C	1 dk	35 döngü
Uzama	72 °C	1 dk	
Son uzama	72 °C	10 dk	
Sınırsız bekletme	4 °C		

O45 ve O121 gen bölgelerinin PZR reaksiyonu için hazırlanan karışım Paddock ve ark.⁸²'nin çalışmasından optimize edilerek hazırlanmıştır. PZR karışımında ticari olarak satın alınan Hot Start Green Master Mix (Promega M5122 GoTaq®, ABD) kullanılmıştır. 100 µM olan primer stokları distile su ile sulandırılarak 10 µM'lık primer konsantrasyonu hazırlanmıştır. Her bir primerden eşit hacimde alınarak 2.5 µM konsantrasyonunda O45 ve O121 primer karışımı oluşturulmuştur. Bu karışımdan 2.88 µl alınarak her bir primerin yoğunluğu 0.36 µM olarak PZR karışımında kullanılmıştır. O45 ve O121 gen bölgelerinin PZR reaksiyonu için hazırlanan PZR karışımı 7. Çizelgede gösterildiği gibidir.

O serotiplendirme için kullanılan pozitif kontrol DNA'lar Dr. Kim Stanford (Alberta Agriculture and Forestry, Agriculture Centre, Lethbridge, AB T1J 4V6, Canada) tarafından hediye edilmiştir.

7. Çizelge. O45 ve O121 genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı

Reaktifler	Bir örnek için
Hot Start Green Master karışımı	10 µl
Primer (2 çift)	2,88 µl (Stok konsantrasyonu: 2,5 µM)
Steril Saf Su	4.12 µl
Kalıp DNA	3 µl
Toplam	20 µl

Reaksiyon döngüleri Paddock ve ark.⁸²'nin çalışmasından optimize edilerek belirlenmiştir. PZR, 8 . Çizelge'de belirtilen koşullarda iCycler (BioRad, ABD) marka thermal cycler'da gerçekleştirilmiştir.

8. Çizelge. O45 ve O121 gen bölgelerinin belirlenmesinde kullanılan PZR koşulları

Aktivasyon	95 °C	10 dk	
Denatürasyon	95 °C	1 dk	
Primer bağlanması	62.9 °C	1 dk	35 döngü
Uzama	72 °C	1 dk	
Son uzama	72 °C	10 dk	
Sınırsız bekletme	4 °C		

PZR ürünleri daha önce tarif edildiği gibi yatay jel elektroforez sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

3.7. Stx1 Varyantlarının Belirlenmesi

Stx1a, Stx1c ve Stx1d gen bölgeleri konvensiyonel PZR amplifikasyon yöntemi ile tespit edilmiştir. Stx1 varyantlarının primerleri için Scheutz ve ark.²⁹'nin çalışması referans alınmıştır. Primer dizileri 9. Çizelgede gösterilmiştir.

9. Çizelge. Stx1 varyant genleri, primer dizileri ve moleküler ağırlıkları

Primer Çifti	Primer Dizisi (5'- 3')	Moleküler Ağırlık (baz çifti)	Referans
<i>Stx1a - F</i>	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT		
<i>Stx1a- R</i>	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG	478 bç	Scheutz ve ark. ²⁹
<i>Stx1c - F</i>	CCTTCCTGGTACAACACTGCGGTT		
<i>Stx1c -R</i>	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA	252 bç	Scheutz ve ark. ²⁹
<i>Stx1d - F</i>	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTAC C		
<i>Stx1d - R</i>	CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA	203 bç	Scheutz ve ark. ²⁹

Stx1a, Stx1c ve Stx1d gen bölgelerinin PZR reaksiyonu için hazırlanan karışım Scheutz ve ark.²⁹'nin çalışmasından optimize edilerek hazırlanmıştır. PZR karışımında ticari olarak

satın alınan Hot Start Green Master Mix (Promega M5122 GoTaq®, ABD) kullanılmıştır. 100 µM olan primer stokları distile su ile sulandırılarak 5 µM'lık primer konsantrasyonu hazırlanmıştır. Stx1c (Primer 1) ve Stx1d (Primer 2) primerlerinden 1'er µl, Stx1a primerlerinden (Primer 3) 2'şer µl alınarak; Stx1c ve Stx1d'nin son konsantrasyonu 0.2 µM, Stx1a primerlerinin son konsantrasyonu 0.4 µM olacak şekilde PZR karışımı hazırlanmıştır. Stx1a, Stx1c ve Stx1d gen bölgelerinin PZR reaksiyonu için hazırlanan PZR karışımı 10. Çizelge'de gösterildiği gibidir.

10. Çizelge. Stx1 varyantlarının belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı

Reaktifler	Bir örnek için
Hot Start Green Master karışımı	12 µl
Primer 1	2 µl (Stok konsantrasyonu: 5 µM)
Primer 2	2 µl (Stok konsantrasyonu: 5 µM)
Primer 3	4 µl (Stok konsantrasyonu: 5 µM)
Kalıp DNA	5 µl
Toplam	25 µl

Reaksiyon döngüleri Scheutz ve ark.²⁹'nın çalışmasından optimize edilerek belirlenmiştir. PZR, 11 . Çizelgede belirtilen koşullarda iCycler (BioRad, ABD) marka thermal cycler'da gerçekleştirilmiştir.

11. Çizelge. Stx1 varyantlarının belirlenmesinde kullanılan PZR koşulları

Aktivasyon	95 °C	15 dk	
Denatürasyon	95 °C	1 dk	
Primer bağlanması Uzama	53.1 °C	1 dk	35 döngü
	72 °C	1 dk	
Son uzama	72 °C	3 dk	
Sınırsız bekletme	4 °C		

PZR ürünleri daha önce tarif edildiği gibi yatay jel elektroforez sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

3.8. Stx2 Varyantlarının Belirlenmesi

Stx2 varyantlarının gen bölgeleri konvensiyonel PZR amplifikasyon yöntemi ile tespit edilmiştir. Stx2 varyantlarının primerleri için Scheutz ve ark.²⁹'nın çalışması referans alınmıştır. Primer dizileri 12. Çizelgede gösterilmiştir.

12. Çizelge. Stx2 varyant genleri, primer dizileri ve moleküler ağırlıkları

Primer Çifti	Primer Dizisi (5' - 3')	Moleküler Ağırlık (baz çifti)	Referans
<i>Stx2a F1</i>	GCGATACTGRGBACTGTGGCC		
<i>Stx2a R1</i>	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG	349 bç	Scheutz ve ark. ²⁹
<i>Stx2a R2</i>	GCCACCTTCACTGTGAATGTG	347 bç	
<i>Stx2b F</i>	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC		
<i>Stx2b R</i>	CAGCAAATCCTGAACCTGACG	251 bç	Scheutz ve ark. ²⁹
<i>Stx2c F</i>	GAAAGTCACAGTTTTTATATAACAACGGGTA		
<i>Stx2c R</i>	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA	177 bç	Scheutz ve ark. ²⁹
<i>Stx2d F1</i>	AAARTCACAGTCTTTATATAACAACGGGTG		
<i>Stx2d R1</i>	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG	179 bç	Scheutz ve ark. ²⁹
<i>Stx2d-O55-R</i>	TCAACCGAGCACTTTCAGTAG	235 bç	
<i>Stx2d R2</i>	GCCTGATGCACAGGTACTGGAC	280 bç	
<i>Stx2e F</i>	CGGAGTATCGGGGAGAGGC		
<i>Stx2e R</i>	CTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT	411 bç	Scheutz ve ark. ²⁹
<i>Stx2f F</i>	TGGGCGTCATTCCTGGTTG		
<i>Stx2f R</i>	TAATGGCCGCCCTGTCTCC	424 bç	Scheutz ve ark. ²⁹
<i>Stx2g F</i>	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC		
<i>Stx2g R</i>	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT	573 bç	Scheutz ve ark. ²⁹

Stx2 varyant bölgelerinin PZR reaksiyonu için hazırlanan karışım Scheutz ve ark.²⁹'nın çalışmasından optimize edilerek hazırlanmıştır. Her bir varyant gen bölgesi ayrı reaksiyonlarla çalışılmıştır. PZR karışımında ticari olarak satın alınan Hot Start Green Master Mix (Promega M5122 GoTaq®, ABD) kullanılmıştır. 100 µM olan primer stokları distile su ile sulandırılarak 5 µM'lık primer konsantrasyonu hazırlanmıştır. Bu primer

stoklarından her bir primer için 0.31 μM olacak şekilde karışıma eklenmiştir. Üç adet primere sahip gen bölgelerinde primer miktarı arttığı için distile suda azaltma yapılmıştır. Stx2 varyant gen bölgelerinin PZR reaksiyonu için hazırlanan PZR karışımı 13. Çizelge’de gösterildiği gibidir.

13. Çizelge. Stx2 varyantlarının belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı

Reaktifler	Bir örnek için
Hot Start Green Master karışımı	10 μl
Primer	1,25 μl (Stok konsantrasyonunu: 5 μM)
Kalıp DNA	5 μl
Distile su	3,75 μl
Toplam	20 μl

Reaksiyon döngüleri Scheutz ve ark.²⁹’nın çalışmasından optimize edilerek belirlenmiştir. PZR, 14 . Çizelge’de belirtilen koşullarda *iCycler* (BioRad, ABD) marka thermal cycler’da gerçekleştirilmiştir.

14. Çizelge. Stx2 varyantlarının belirlenmesinde kullanılan PZR koşulları

Aktivasyon	95 °C	10 dk	
Denatürasyon	95 °C	1 dk	
Primer bağlanması	61 °C	1 dk	35 döngü
Uzama	72 °C	1 dk	
Son uzama	72 °C	10 dk	
Sınırsız bekletme	4 °C		

PZR ürünleri daha önce tarif edildiği gibi yatay jel elektroforez sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

3.9. Klinik verilerin toplanması

Hasta örnekleri için ‘STEC Örneği Gönderim Formu’ doldurulmuş olup hastaya ait demografik bilgiler ve hastanın başvuru şikayetleri bu formda mevcuttur (1. Ek).

Hasta örnekleri Stx açısından tarandıktan sonra Stx pozitif saptanan hastalar için ‘STEC Pozitif Hastaların Klinik Bildirim Formu’ doldurulmuştur. Bu form aracılığıyla hastaların klinik verileri toplanmıştır (2. Ek).

Hasta örnek formları standart olup, STEC şüphesi ile örnek gönderilen tüm hastalardan rutin olarak istenmektedir.

3.10. İstatistik

Toplanan verilerin öncelikle tanımlayıcı istatistikleri yapıldı. Kategorik değişkenler sıklık ve yüzdeler olarak özetlendi. Sürekli değişkenlerin normallik varsayımı Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Sürekli değişkenler normal ortalama \pm SD veya medyan (IQR) ile gösterildi. Kategorik değişkenleri karşılaştırmak için Pearson Ki-kare testi ve Fisher’in kesin Ki-kare testi kullanıldı. Farklı gruplar için sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında uygun olarak independent samples t-test ve Kruskal Wallis analizi kullanıldı. P değerleri 0,05'in altı istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm istatistiksel analiz IBM SPSS 20.00 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı ile uygulandı.

3.11. Etik Kurul Onayı

Çalışma için Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Kurul’undan etik kurul onayı alındı. (Karar no: KÜ GOKAEK 2019/06.19 Proje no: 2019/111 Tarih:03.04.2019)

3.12. Proje Desteği:

Projede kullanılacak malzemelerin temini için Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne Tıpta Uzmanlık Tez projesi desteği için başvuruldu. Proje ilgili birim tarafından onaylanıp, yürürlüğe girdi. (Proje kodu: 2019/028)

4. BULGULAR

4.1. Hastaların Genel Özellikleri

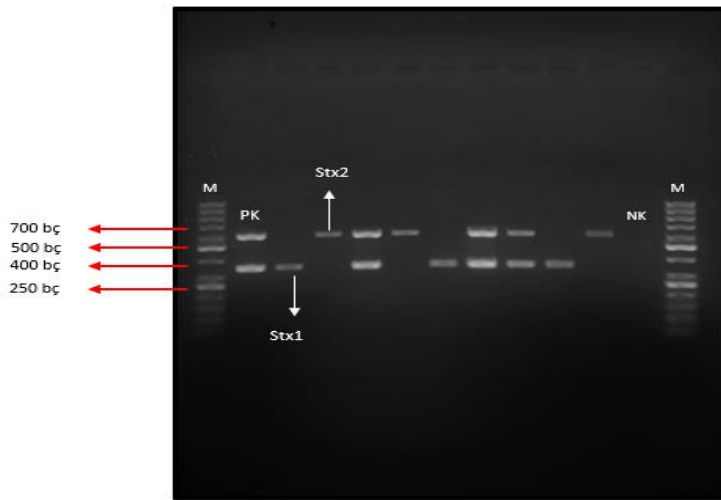
Bu çalışmaya 2012-2019 yılları arasında HÜS tanısı alan 46 çocuk dahil edilmiştir. Hastaların 25 (%45,7)'i kadın, 21 (%44)'i erkektir. Hastaların en küçüğü 5 aylık, en büyüğü 15 yaşında olup hastaların median yaşı 2'dir (IQR: 1,75-4; range: 0,4-15). Hastaların 25 (%54,3)'i 0-2 yaş grubunda, 14 (%30,4)'ü 3-5 yaş grubunda, 7 (%15,2)'si 5 yaştan büyüktür. Hastaların 24 (%52,2)'ü Kocaeli' de, 11 (%23,9)'i Trabzon'da, 7 (%15,2)'si İzmir'de, 1(%2,2)'i Ankara'da, 1(%2,2)'i Balıkesir'de, 1(%2,2)'i Edirne'de, 1(%2,2)'i Sakarya'da yaşamaktadır.

Araştırmamıza katılan hastaların 3 (%6,5)'ü 2012 yılında, 7 (%15,2)'si 2013 yılında, 3 (%6,5)'ü 2014 yılında, 4 (%8,7)'ü 2015 yılında, 5 (%10,9)'i 2016 yılında, 5 (%10,9)'i 2017 yılında, 12 (%26,1)'si 2018 yılında, 7 (%15,2)'si 2019 yılında HÜS tanısı olarak çalışmamıza dahil olmuştur.

4.2. İzolatların Genel Özellikleri

İzolatların 8 (%17,3)'i yalnızca Stx1, 26 (%56,5)'si yalnızca Stx2, 12 (%26)'si hem Stx1 hem de Stx2 bulundurmaktadır. Stx PZR çalışmasının jel görüntüleri 3. Çizim' de gösterilmiştir.

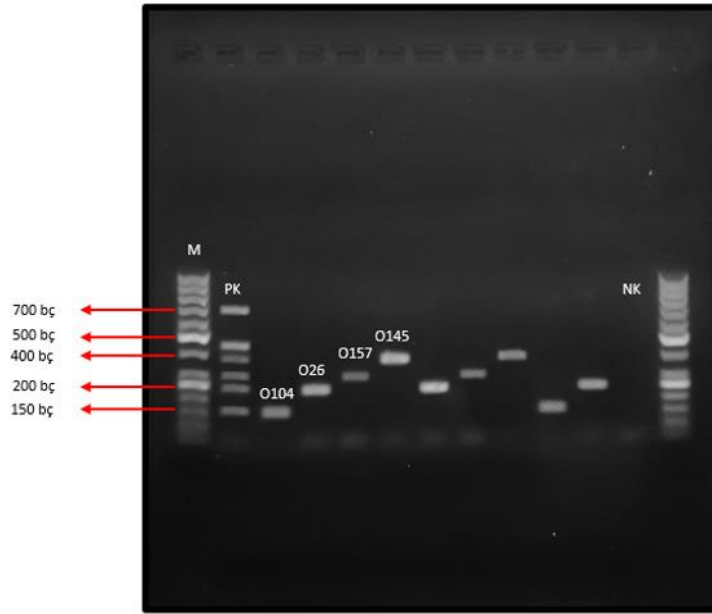
3. Çizim. Stx PZR çalışmasının jel görüntüleri



1. ve 13. kuyucuk: M; Moleküler ağırlık standardı
- 2.kuyucuk: PK; Stx1 (348 bç) ve Stx2 (584 bç) pozitif kontrol DNA'sının bant profili
- 3.-11. kuyucuklar: Hastalara ait izolatların bant profilidir.
12. kuyucuk: NK; Negatif kontrolün bant profili

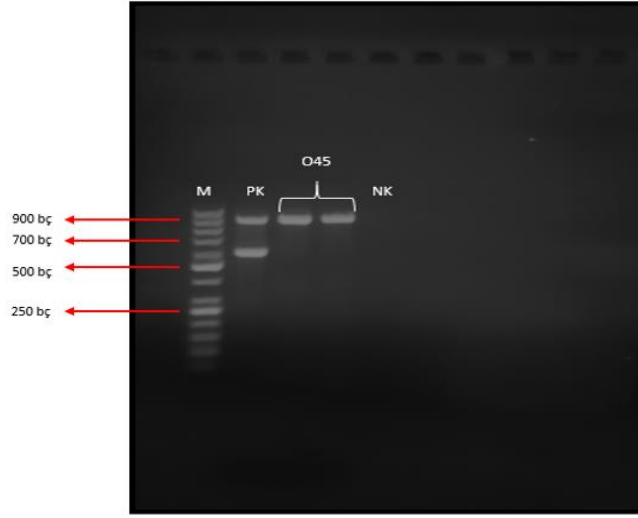
İzolatların 15 (%32,6)'i O145, 8 (%17,4)'i O157, 5 (%10,9)'i O26, 3 (%6,5)'ü O104, 2 (%4,3)'si O45 olarak tespit edilmiştir. O103, O111 ve O121 serotiplerine ait izolat tespit edilmemiştir. 13 (%28,3) izolat ise PZR ile taranan 8 serotipten herhangi biri olmayıp, non-typeable (NT) olarak gruplandırılmıştır. O103, O111, O145, O157, O26, O104 serotiplerinin PZR çalışmasının jel görüntüleri 4. Çizim' de gösterilmiştir. O121 (587 bç) ve O45 (890 bç) serotiplerinin PZR çalışmasının jel görüntüleri 5. Çizim' de gösterilmiştir. İzolatların O serotiplerinin dağılımı 6. Çizim' de gösterilmiştir.

4. Çizim. O103, O111, O145, O157, O26, O104 serotiplerinin PZR çalışmasının jel görüntüleri



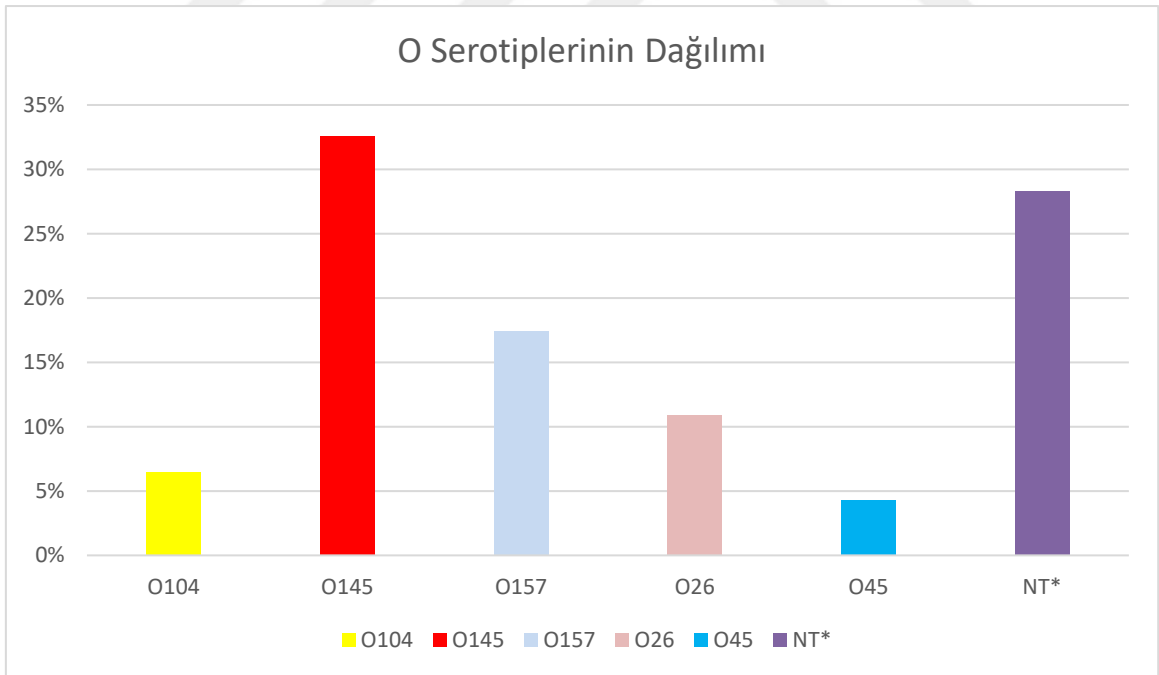
- 1. ve 13. kuyucuk: M;** Moleküler ağırlık standardı
2.kuyucuk: PK; O103 (716 bç), O111 (451 bç), O145 (374 bç), O157 (296 bç), O26 (241 bç), O104 (154 bç) serotiplerine ait pozitif kontrol DNA'sının bant profili
3.-11. kuyucuklar: Hastalara ait izolatların bant profili
12. kuyucuk: NK; Negatif kontrolün bant profili

5. Çizim. O121 ve O45 serotiplerinin PZR çalışmasının jel görüntüleri



1. **kuyucuk: M;** Moleküler ağırlık standardı
2. **kuyucuk: PK;** O121 (587 bç) ve O45 (890 bç) serotiplerinin pozitif kontrol DNA'sının bant profili
3. **ve 4. Kuyucuk:** Hastalara ait izolatların bant profili
5. **kuyucuk: NK;** Negatif kontrolün bant profili

6. Çizim: İzolatların O serotiplerinin dağılımı



NT*: Çalışmada PZR ile taranan 8 serotipinden herhangi birine ait olmayıp, serotiplendirilememiş izolatları ifade etmektedir.

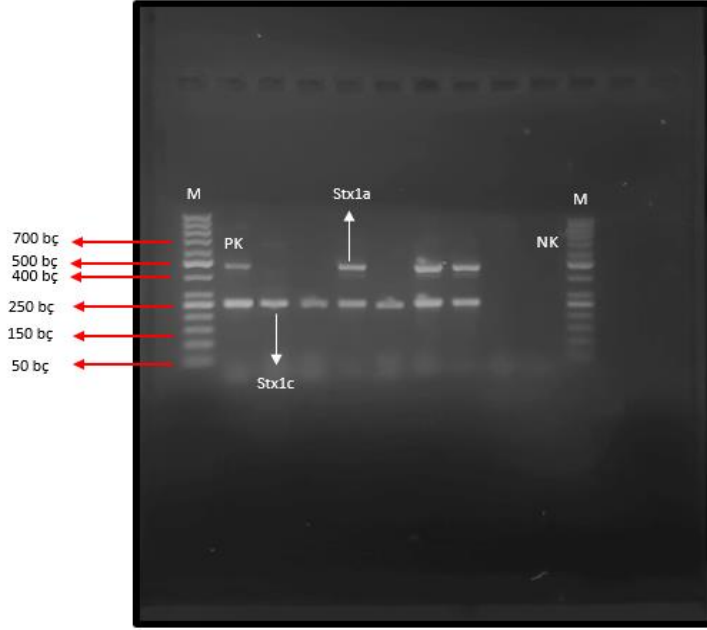
O serotiplerinin yıllar içinde dağılımında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p=0,36). İzolatların serotiplerinin yıllar içindeki dağılımı 15. Çizelge' de gösterilmiştir.

15. Çizelge. O Serotiplerinin Yıllara Göre Dağılımı

Yıl	O Serotip					
	O145	O157	O104	O26	O45	NT
2012	1	0	1	0	0	1
2013	2	1	1	0	0	3
2014	1	0	0	1	0	1
2015	1	0	1	2	0	1
2016	2	1	1	0	0	1
2017	2	2	0	1	0	0
2018	5	2	0	0	0	5
2019	1	2	0	1	2	1
Toplam	15	8	3	5	2	13

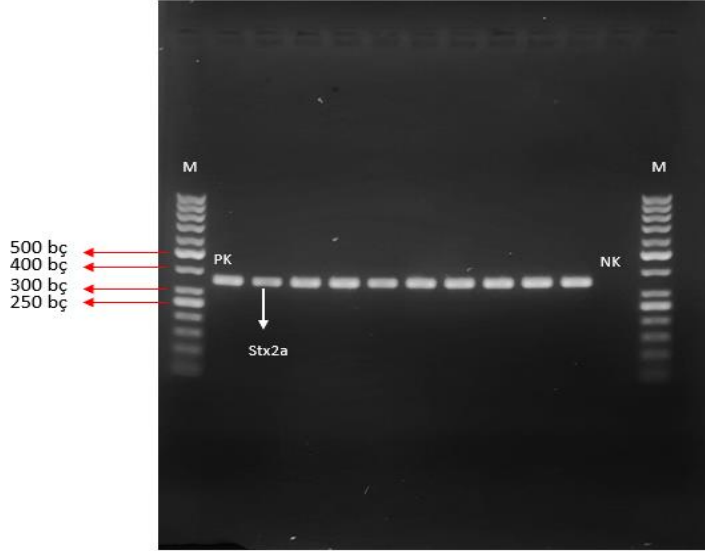
Stx varyant analizine göre izolatların 30 (%65,2)'u sadece tek bir varyant, 9 (%19,5)'u ikili varyant, 7(%15,4)'si üçlü varyant içerdiği belirlenmiştir. İzolatların 5 (%10,9)'i yalnızca Stx1c; 3 (%6,5)'ü Stx1c ve Stx1a; 23 (%50)'ü yalnızca Stx2a; 2 (%4,3)'si yalnızca Stx2c; 6 (%13)'sı Stx1c ve Stx2a; 6 (%13)'sı Stx1a, Stx1c ve Stx2a; 1 (%2,2)'i Stx1a, Stx1c ve Stx2c bulundurmaktadır. Stx1 varyantlarının PZR çalışmasının jel görüntüleri 7. Çizim' de gösterilmiştir. Stx2a varyantının PZR çalışmasının jel görüntüsü 8. Çizim' de gösterilmiştir. Stx2c varyantının PZR çalışmasının jel görüntüsü 9. Çizim' de gösterilmiştir. Toksin varyantlarının dağılımları 10. Çizim' de gösterilmiştir.

7. Çizim. Stx1 varyantlarının PZR çalışmasının jel görüntüleri



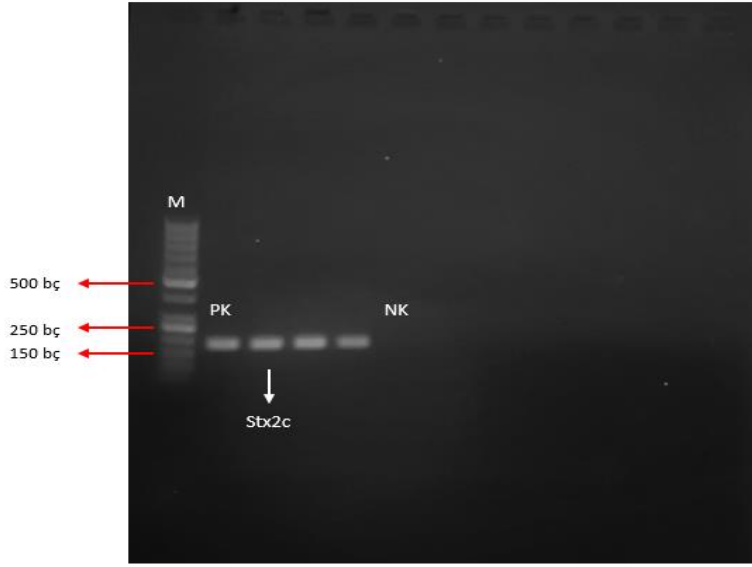
- 1. ve 11. kuyucuk: M;** Moleküler ağırlık standardı
2.kuyucuk: PK; Stx1a (478 bç) ve Stx1c (252 bç) pozitif kontrol DNA'larının bant profili
3.-9. kuyucuk: Hastalara ait izolatların bant profili
10.kuyucuk: NK; Negatif kontrolün bant profili

8. Çizim. Stx2a PZR çalışmasının jel görüntüsü



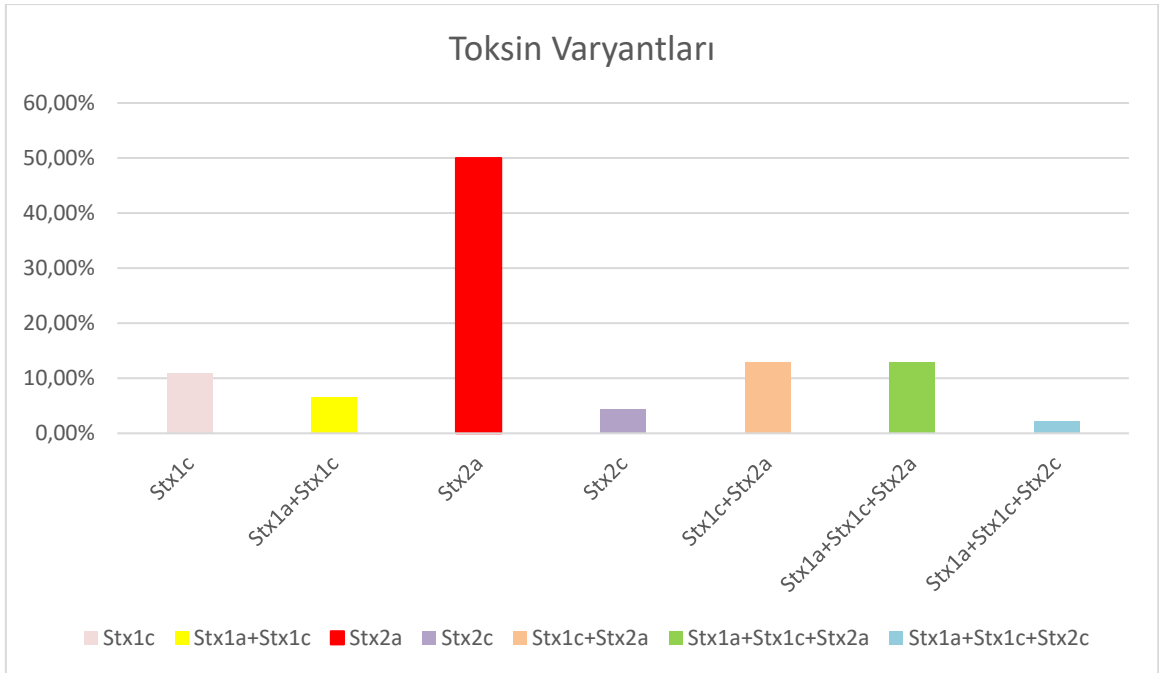
- 1. ve 13. kuyucuk: M;** Moleküler ağırlık standardı
2. kuyucuk: Stx2a (347 bç) pozitif kontrol DNA'sının bant profili
3.-11. kuyucuk: Hastalara ait izolatların bant profili
12.kuyucuk: NK; Negatif kontrolün bant profili

9. Çizim. Stx2c PZR çalışmasının jel görüntüsü



- 1. kuyucuk:** M; Moleküler ağırlık standardı
- 2. kuyucuk:** Stx2c (177 bç) pozitif kontrol DNA'sının bant profili
- 3.-5. kuyucuk:** Hastalara ait izolatların bant profili
- 12.kuyucuk:** NK; Negatif kontrolün bant profili

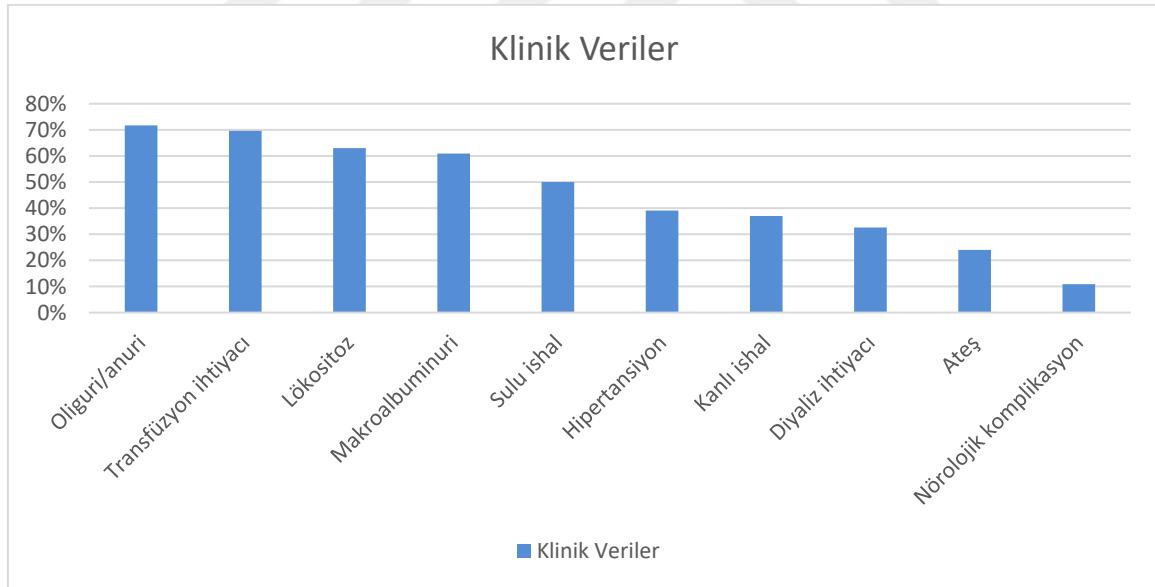
10. Çizim. İzolatların toksin varyantlarının dağılımı



4.3. Hastaların Klinik Durumuna İlişkin Bilgiler

Araştırmaya 2012-2019 yılları arasında HÜS tanısı almış toplam 46 hasta katılmıştır. Hastaların hiçbirinde daha önce tanımlanan altta yatan başka bir hastalık belirlenmemiştir. Hastalarda STEC dışında herhangi bir enfeksiyon saptanmamıştır. Hastaların 40 (%87)'inde ishal şikâyeti mevcuttur. Hastaların 23 (%50)'ünde sulu ishal, 17 (%37)'sinde kanlı ishal vardır. Hastaların 6 (%13)'sında ishal şikâyeti olmamıştır. Hastaların 29 (%63)'unda lökositöz, 33 (%71,7)'ünde oligüri/anüri, 28 (%60,9)'inde makroalbuminüri, 18 (%39,1)'inde hipertansiyon mevcuttur. Hastaların 12 (%24)'sinde ateş olmuştur. Hastaların 32 (%69,6)'si tedavileri sırasında transfüzyona, 15 (%32,6) diyaliz ihtiyacı duymuştur. Hastaların 5 (%10,9)'inde HÜS' e bağlı nörolojik komplikasyon gelişmiştir. Nörolojik komplikasyonu olan hastaların 4 (%80)'ünde konvulziyon olurken, 1 (%20)'inde desature kasılma olmuştur. Klinik verilerin dağılımı 11. Çizim'de gösterilmiştir.

11. Çizim. Klinik Verilerin Dağılımı



Hastaların ishal süresi'nin median değeri 4 gün (IQR: 3-7; range 1-10)'dür. Hastaların gastrointestinal şikayetlerinin başlamasıyla hastaneye başvuru arasında geçen süre'nin median değeri 4 gün (IQR: 2,75-5,25; range 0-15)'dür. Hastaların hastanede yatış süresinin median değeri 17 gün (IQR:9-27,2; range: 2-84)'dür.

Hastaların aile öykülerinde HÜS yoktur. Ailede veya çevresinde ishal şikâyeti mevcut değildir. Hastaların herhangi birinde tedavi sonrası kalıcı böbrek fonksiyon testi bozukluğu veya tedavi sonrası kalıcı diyaliz ihtiyacı olmamıştır. Hastaların 2 (%4,3)'sinde HÜS nedeniyle ölüm gerçekleşmiştir.

4.4. Serotiplendirme ve Toksin varyantlarının Klinik Verilerle İlişkisinin Araştırılması

O serotipleri; kanlı ishal, lökositoz, makroalbuminüri, oligüri/anüri, ateş, nörolojik komplikasyon, ishal süresi, gastrointestinal şikayetlerin başlangıcı ile hastaneye başvuru arasında geçen süre, hastanede yatış süresi gibi klinik verilerle istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

Stx2a tespit edilen hasta grubu toplam hastaların %50'sini oluşturmakta olup, diğer varyantları ve kombinasyonlarını içeren varyantlar tek tek incelendiğinde sayıca az olup, istatistiki veri elde edebilmek için sadece Stx2a bulduran hastalar bir grup, diğer varyantları ve kombinasyonlarını içeren varyantlar ayrı bir grup olarak kabul edilmiştir. Stx1c, Stx1a+ Stx1c, Stx2c, Stx1c+Stx2a, Stx1a+Stx1c+Stx2a, Stx1a+Stx1c+Stx2c varyantlarının tamamı 'diğer varyantlar' olarak isimlendirilmiştir. Yalnızca Stx2a tespit edilen hastalar, diğer varyantların tespit edildiği hastalar ile karşılaştırılarak istatistiksel analiz yapılmıştır.

Stx2a tespit edilen 23 hastanın 8 (%34,8)'inde, Stx1c tespit edilen 5 hastanın 2 (%40)'sinde, Stx1a+ Stx1c tespit edilen 3 hastanın 2 (%66,7)'sinde, Stx1c + Stx2a tespit edilen 6 hastanın 2 (%33,3)'ünde, Stx1a+Stx1c+Stx2a tespit edilen 4 hastanın 1 (%25)'inde, Stx1a+Stx1c+Stx2a tespit edilen 3 hastanın 2 (%66,7)'sinde kanlı ishal saptanmıştır. Stx2c tespit edilen 2 hastada kanlı ishal gelişmemiştir. Stx2a tespit edilen hastaların %34,8'inde, diğer varyantların tespit edildiği hastaların %39,1'inde kanlı ishal olup; Stx2a bulundurma ile kanlı ishal varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,76$).

Stx2a tespit edilen 23 hastanın 14 (%60,9)'ünde, Stx1c tespit edilen 5 hastanın 4 (%80)'ünde, Stx1a+ Stx1c tespit edilen 3 hastanın 2 (%66,7)'sinde, Stx2c saptanan 2 hastanın 2 (%100)'sinde, Stx1c+Stx2a tespit edilen 6 hastanın 3 (%50)'ünde, Stx1a+Stx1c+Stx2a tespit edilen 4 hastanın 3(%75)'ünde, Stx1a+Stx1c+Stx2c tespit edilen

3 hastanın 1 (%33,3)'ünde lökositoz saptanmıştır. Stx2a tespit edilen hastaların %60,9'unda, diğer varyantların tespit edildiği hastaların %65,2'sinde lökositoz olup; Stx2a bulundurma ile lökositoz varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,76).

Stx2a tespit edilen 23 hastanın 17 (%73,9)'sinde, Stx1c tespit edilen 5 hastanın 2 (%40)'sinde, Stx1a+ Stx1c tespit edilen 3 hastanın 1 (%33,3)'inde, Stx2c tespit edilen 2 hastanın 2 (%100)'sinde, Stx 1c+Stx2a tespit edilen 6 hastanın 6 (%100)'sında, Stx1a+Stx1c+Stx2a tespit edilen 4 hastanın 2 (%75)'sinde, Stx1a+Stx1c+Stx2c tespit edilen 3 hastanın 3 (%33,3)'ünde oligüri veya anüri saptanmıştır. Stx2a tespit edilen hastaların %73,9'unda, diğer varyantların tespit edildiği hastaların %69,6'sında oliguri veya anüri olup; Stx2a bulundurma ile oligüri veya anüri varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,74).

Stx2a tespit edilen 23 hastanın 18 (%78,3)'inde, Stx1c tespit edilen 5 hastanın 2 (%40)'sinde, Stx1c+Stx2a tespit edilen 6 hastanın 4 (%66,7)'ünde, Stx1a+Stx1c+Stx2a tespit edilen 4 hastanın 3(%75)'ünde, Stx1a+Stx1c+Stx2c tespit edilen 3 hastanın 1 (%33,3)'inde makroalbuminüri saptanmış olup; Stx1a+Stx1c ve Stx2c tespit edilen hastaların hiçbirinde makroalbuminüri saptanmamıştır.Stx2a tespit edilen hastaların %78,3'ünde, diğer varyantların tespit edildiği hastaların %43,5'inde makroalbuminüri olup; Stx2a bulundurma ile makroalbuminüri varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p=0,01). Stx varyantlarında makroalbuminüri varlığının dağılımı 16. Çizelge'de gösterilmiştir.

16. Çizelge. Stx varyantlarında makroalbuminüri varlığının dağılımı

Stx varyantları	Makroalbuminüri		Toplam
	Yok	Var	
Stx2a	5 (%21,7)	18 (%78,3)	23
Diğer varyantlar	13 (%56,5)	10 (%43,5)	23
Toplam	18 (%39,1)	28 (%60,9)	46

Stx2a tespit edilen 23 hastanın 10 (%43,5)'ünde, Stx1c tespit edilen 5 hastanın 2 (%40)'sinde, Stx1a+ Stx1c tespit edilen 3 hastanın 2 (%66,7)'sinde, Stx2c tespit edilen 2 hastanın 2 (%100)'sinde, Stx1c+ Stx2a tespit edilen 6 hastanın 2 (%33,3)'sinde

hipertansiyon gelişmiştir. Stx1a+Stx1c+Stx2a, Stx1a+Stx1c+Stx2c tespit edilen hastalarda hipertansiyon gelişmemiştir. Stx2a tespit edilen hastaların %43,5'inde, diğer varyantların tespit edildiği hastaların %34,8'inde hipertansiyon gelişmiş olup; Stx2a bulundurma ile hipertansiyon gelişmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (p=0,54).

Stx2a tespit edilen 23 hastanın 19 (%82,6)'unda, Stx1c tespit edilen 5 hastanın 4 (%80)'ünde, Stx1a+ Stx1c tespit edilen 3 hastanın 2 (%66,7)'sinde, Stx1c+Stx2a tespit edilen 6 hastanın 4 (%66,7)'ünde, Stx1a+Stx1c+Stx2a tespit edilen 4 hastanın 1 (%33,3)'inde, Stx1a+Stx1c+Stx2c tespit edilen 3 hastanın 2 (%66,7)'sinde tedavi sırasında transfüzyon ihtiyacı olmuştur. Stx2c tespit edilen 2 hastada transfüzyon ihtiyacı olmamıştır. Stx2a tespit edilen hastaların %82,6'sında, diğer varyantların tespit edildiği hastaların %56,5'inde transfüzyon ihtiyacı olup; Stx2a bulundurma ile transfüzyon ihtiyacı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,055).

Stx2a tespit edilen 23 hastanın 8 (%34,8)'inde, Stx1c tespit edilen 5 hastanın 2 (%40)'sinde, Stx1a+ Stx1c tespit edilen 3 hastanın 1 (%33,3)'inde, Stx1c+Stx2a tespit edilen 6 hastanın 3 (%50)'ünde, Stx1a+Stx1c+Stx2c 3 hastanın 1 (%33,3)'inde tedavi sırasında diyaliz ihtiyacı olmuştur. Stx2c ve Stx1a+Stx1c+Stx2a tespit edilen hastalarda diyaliz tedavisine ihtiyaç duyulmamıştır. Stx2a tespit edilen hastaların %34,8'inde, diğer varyantların tespit edildiği hastaların %30,4'ünde diyaliz ihtiyacı olup; Stx2a bulundurma ile diyaliz ihtiyacı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,69).

Stx2a tespit edilen 23 hastanın 3 (%13)'ünde, Stx1a+ Stx1c tespit edilen 3 hastanın 1 (%33,3)'inde, Stx1c+Stx2a tespit edilen 6 hastanın 1 (%33,3)'inde hastalık sırasında nörolojik komplikasyon gelişmiştir. Stx1c, Stx2c, Stx1a+Stx1c+Stx2a ve Stx1a+Stx1c+Stx2c tespit edilen hastalarda hastalık sırasında nörolojik komplikasyon gelişmemiştir. Stx2a tespit edilen hastaların %13'ünde, diğer varyantların tespit edildiği hastaların %8,7'sinde hastalık sırasında nörolojik komplikasyon gelişmiş olup; Stx2a ve nörolojik komplikasyon gelişimi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (p=0,63).

Stx2a tespit edilen 23 hastanın 12 (%52,2)'sinde, Stx1c tespit edilen 5 hastanın 2 (%40)'sinde, Stx1a+ Stx1c tespit edilen 3 hastanın 2 (%66,7)'sinde, Stx2c tespit edilen 2 hastanın 1 (%50)'inde, Stx1c+Stx2a tespit edilen 6 hastanın 1 (%16,7)'inde, Stx1a+Stx1c+Stx2a tespit edilen 4 hastanın 1 (%25)'inde, Stx1a+Stx1c+Stx2c tespit

edilen 3 hastanın 3 (%100)'ünde ateş saptanmıştır. Stx2a tespit edilen hastaların %52,2'sinde, diğer varyantların tespit edildiği hastaların %43,5'inde ateş olup; Stx2a bulundurma ve ateş oluşumu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (p=0,55).

Hastaların 2 (%4,3)'ünde ölüm gerçekleşmiş olup, birinde Stx1c, diğerinde Stx1c+Stx2a tespit edilmiştir. Stx2a bulundurma ve ölüm arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (p=0,14).

Stx2a tespit edilen hastaların ishal süresinin ortalama değeri $4,5 \pm 3$ gün iken, median değeri 4 gün (IQR:3-7; range:0-10)'dür. Diğer varyantların tespit edildiği hastaların ishal süresinin ortalama değeri $4,6 \pm 2,7$ gün iken, median değeri 4,6 gün (IQR:3-6; range: 0-10)'dür. Stx2a bulundurma ile ishal süresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,87).

Stx2a tespit edilen hastaların gastrointestinal şikayetlerin başlangıcıyla başvuru arasında geçen sürenin ortalama değeri $2,9 \pm 1,2$ gün iken, median değeri 3gün (IQR = 2-4 range:1-6)'dür. Diğer varyantların tespit edildiği hastaların gastrointestinal şikayetlerin başlangıcıyla başvuru arasında geçen sürenin ortalama değeri $5,2 \pm 2,7$ gün iken, median değeri 5 gün (IQR: 4-6; range: 0-15)'dür. Stx2a tespit edilen hastalarda gastrointestinal şikayetlerin başlamasıyla başvuru arasında geçen süre daha kısa tespit edilmiş olup, Stx2a bulundurma ile gastrointestinal şikayetlerin başlangıcıyla başvuru arasında geçen süre arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (p=0,00). Stx varyantlarında gastrointestinal şikayetlerin başlangıcıyla başvuru arasında geçen sürenin dağılımı 17. Çizelgede gösterilmiştir.

17. Çizelge. Stx varyantlarında gastrointestinal şikayetlerin başlangıcıyla başvuru arasında geçen sürenin dağılımı

Stx varyantları	Gastrointestinal şikayetlerin başlangıcıyla başvuru arasında geçen süre	
	Median	Mean
Stx2a	3	$2,9 \pm 1,2$
Diğer varyantlar	5	$5,2 \pm 2,7$

Stx2a tespit edilen hastaların hastanede yatış süresinin ortalama değeri $25,5 \pm 18,9$ iken, median değeri 21'dir (IQR = 12-29; range:8-84). Diğer varyantların tespit edildiği hastaların hastanede yatış süresinin ortalama değeri $15,6 \pm 11$ iken, median değeri 11'dir (IQR: 8-21,7; range: 2-46). Stx2a bulundurma ile hastanede yatış süresi arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (p=0,01). Stx varyantlarında hastanede yatış süresinin dağılımı 18. Çizelgede gösterilmiştir.

18.Çizelge. Stx varyantlarında hastanede yatış süresinin dağılımı

Stx varyantları	Hastanede yatış süresi	
	Median	Mean
Stx2a	21	$25,5 \pm 18,9$
Diğer varyantlar	11	$15,6 \pm 11$

Kız çocuklarının 9 (%36)'unda, erkek çocuklarının 8 (%38,1)'inde kanlı ishal olmuştur. Hastaların cinsiyetiyle kanlı ishal varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,88). Kız çocuklarının 18 (%72)'inde, erkek çocuklarının 11 (%52,4)'inde lökositoz olmuştur. Hastaların cinsiyetiyle lökositoz varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p= 0,17). Kız çocuklarının 18 (%72)'inde, erkek çocuklarının (%71,4)'inde oliguri veya anüri olmuştur. Hastaların cinsiyetiyle oliguri veya anüri varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,96). Kız çocuklarının 15 (%60,9)'inde, erkek çocuklarının 13 (%61,9)'ünde makroalbuminüri olmuştur. Hastaların cinsiyetiyle makroalbuminüri varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,89). Kız çocuklarının 10 (%40)'unda, erkek çocuklarının 8 (%38,1)'inde hastalık sırasında hipertansiyon gelişmiştir. Hastaların cinsiyetiyle hipertansiyon gelişimi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,89). Kız çocuklarının 18 (%72)'inde, erkek çocuklarının 14 (%66,7)'ünde transfüzyon ihtiyacı olmuştur. Hastaların cinsiyetiyle transfüzyon ihtiyacı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,69). Kız çocuklarının 6 (%24)'sında, erkek çocuklarının 9 (%42,9)'unda diyaliz ihtiyacı olmuştur. Hastaların cinsiyetiyle diyaliz ihtiyacı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,17). Kız çocuklarının 1 (%4)'inde, erkek çocuklarının 4 (%19)'ünde nörolojik komplikasyon gelişmiştir. Hastaların cinsiyetiyle nörolojik komplikasyon gelişimi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Kız çocuklarının 13 (%52)'ünde, erkek çocuklarının 9 (%42,9)'unda ateş olmuştur. Hastaların cinsiyetiyle ateş varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Kız çocuklarında ishal süresinin ortalama değeri $4,6 \pm 2,9$ iken, median değeri 4'tür (IQR:3-7; range: 0-10). Erkek çocuklarında hastanede yatış süresinin ortalama değeri $4,4 \pm 2,8$ iken, median değeri 4'tür (IQR:3-6; range: 0-10). Hastaların cinsiyetiyle ishal süresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,79$). Kız çocuklarında gastrointestinal şikayetlerin başlaması ile başvuru arasında geçen sürenin ortalama değeri $3,9 \pm 2,7$ iken, median değeri 3'tür (IQR:2-5; range:1-15). Erkek çocuklarında gastrointestinal şikayetlerin başlaması ile başvuru arasında geçen sürenin ortalama değeri $4,3 \pm 1,9$ iken, median değeri 5'tür (IQR:3-6; range:0-7). Hastaların cinsiyetiyle gastrointestinal şikayetlerin başlaması ile başvuru arasında geçen süre arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,19$). Kız çocuklarında hastanede yatış süresinin ortalama değeri $19 \pm 15,6$ iken, median değeri 14,5'tir (IQR:9-25; range:5-84). Erkek çocuklarında hastanede yatış süresinin ortalama değeri $22,6 \pm 16,8$ iken, median değeri 20'dir (IQR:9,2-31,5; range:2-62). Hastaların cinsiyetiyle hastanede yatış süresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,57$).

Kanlı ishali olan 17 hastanın 14 (%82,4)'ünde, kanlı ishali olmayan 29 hastanın 15 (%51,7)'inde lökositöz varlığı tespit edilmiştir. Kanlı ishal varlığı ile lökositöz varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0,03$). Kanlı ishali olan 17 hastanın 15 (%88,2)'inde, kanlı ishali olmayan 29 hastaların 17 (%58,6)'sinde transfüzyon ihtiyacı olmuştur. Kanlı ishal varlığı ile transfüzyon ihtiyacı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,03$). Kanlı ishali olanlarda lökositöz ve transfüzyon ihtiyacının dağılımı 19. Çizelgede gösterilmiştir.

19. Çizelge. Kanlı ishale lökositöz ve transfüzyon ihtiyacının dağılımı

Kanlı İshal	Lökositöz		Transfüzyon	
	Var	Yok	Var	Yok
Var	14 (%82,4)	3 (%17,6)	15 (%88,2)	2 (%11,8)
Yok	15 (%51,7)	14 (%48,3)	17 (%58,6)	12 (%41,4)
Toplam	29	17	32	14

Kanlı ishali olan hastaların ishal süresinin ortalama değeri $5,8 \pm 2,2$ iken median değeri 6'dır (IQR:3,5-8; range:3-10). Kanlı ishali olmayanların ishal süresinin ortalama değeri $4 \pm 2,9$ iken, median değeri 4'tür (IQR:1,5-5,5; range: 0-10). Kanlı ishali olanların ishal süresi daha uzun olup, kanlı ishal varlığı ile ishal süresi arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,02$). Kanlı ishalde ishal süresinin dağılımı 20. Çizelgede gösterilmiştir.

20. Çizelge. Kanlı ishalde ishal süresinin dağılımı

Kanlı ishal	İshal Süresi	
	Median	Mean
Var	6	$5,8 \pm 2,2$
Yok	4	$4 \pm 2,9$

HÜS sırasında makroalbuminüri tespit edilen hastaların hastanede yatış süresinin ortalama değeri $25,1 \pm 18,2$ iken, median değeri 21 (IQR:10-30; range:8-84)'dir. HÜS sırasında makroalbuminüri tespit edilmeyen hastaların hastanede yatış süresinin ortalama değeri $13 \pm 8,4$ iken, median değeri 11 (IQR:7,7-17,7; range:2-33)'dir. Makroalbuminüri varlığı ile hastanede yatış süresi arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p=0,007$).

HÜS'e bağlı hipertansiyon gelişen hastaların hastanede yatış süresinin ortalama değeri $31,1 \pm 20,4$ iken, median değeri 29 (IQR:14,7-40; range:5-84)'dur. HÜS'e bağlı hipertansiyon gelişmeyen hastaların hastanede yatış süresinin ortalama değeri $13,8 \pm 6,8$ iken, median değeri 10,5 (IQR:9-20, range:2-29)'tir. Hipertansiyon varlığı ile hastanede yatış süresi arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p=0,001$).

Diyaliz ihtiyacı olan hastaların hastanede yatış süresinin ortalama değeri $33,2 \pm 19,2$ iken, median değeri 30 (IQR:21-38; range:8-84)'dur. Diyaliz ihtiyacı olmayan hastaların hastanede yatış süresinin ortalama değeri $14,4 \pm 9,9$ iken, median değeri 11 (IQR:9-18; range:2-56). Diyaliz ihtiyacı ile hastanede yatış süresi arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p=0,00$).

HÜS'e bağlı nörolojik komplikasyon gelişen hastaların hastanede yatış süresinin ortalama değeri $46,6 \pm 28,7$ iken, median değeri 46 (IQR:20,5-73; range:8-84)'dır. Nörolojik komplikasyon gelişmeyen hastaların hastanede yatış süresinin ortalama değeri

17,4±10,6 iken median değeri 15 (IQR:9-23,5; range:2-56)'dir. Nörolojik komplikasyon varlığı ile hastanede yatış süresi arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir (p=0,02). Hastane yatış süresinin makroalbuminüri, hipertansiyon, diyaliz ihtiyacı ve nörolojik komplikasyon varlığına bağlı dağılımı 21. Çizelgede gösterilmiştir.

21. Çizelge. Hastane yatış süresinin makroalbuminüri, hipertansiyon, diyaliz ihtiyacı ve nörolojik komplikasyon varlığına bağlı dağılımı

Hastanede yatış süresi	Makroalbuminüri		Hipertansiyon		Diyaliz ihtiyacı		Nörolojik komplikasyon	
	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok
Mean	25,1	13	31,1	13,8	33,2	14,4	46,6	17,4
Median	21	11	29	10,5	30	11	46	15

Hastaların gastrointestinal şikayetlerinin başlaması ile başvuru arasında geçen süre <4 gün ve ≥ 4 gün olmak üzere gruplandırılarak klinik veriler incelendiğinde; hastaların 22 (47,8)'si gastrointestinal şikayetlerinin başlaması ile başvuru arasında geçen süre <4 grubuna dahil olurken, 24 (%52,2)'ü gastrointestinal şikayetlerinin başlaması ile başvuru arasında geçen süre ≥ 4 gün grubuna dahil olmaktadır. Hastaların gastrointestinal şikayetlerinin başlaması ile başvuru arasında geçen süre <4 gün olan hasta grubunun hastanede yatış süresinin ortalama değeri 20,1±16 iken, median değeri 17,5'dir (IQR:10-24; range:7-84). Hastaların gastrointestinal şikayetlerinin başlaması ile başvuru arasında geçen süre ≥ 4 gün olan hasta grubunun hastanede yatış süresinin ortalama değeri 21±16 iken, median değeri 15,5'dir (IQR:9-32; range:2-62). Gastrointestinal şikayetlerinin başlaması ile başvuru arasında geçen sürenin 4 günden az veya fazla olması durumu ile hastanede yatış süresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,87).

Hastaneye başvuru öncesinde antibiyotik kullanılan hasta sayısı 12 (%26,1)'dir. Hastalardan 6 (%13)'sında metronidazol, 1 (%2,2)'inde amoksisilin, 1 (%2,2)'inde sefiksim, 1 (%2,2)'inde seftriakson, 2 (%4,4)'sinde seftriakson ve metronidazol, 1 (%2)'inde imipenem kullanılmıştır. Antibiyotik kullanılmayan hastaların sayısı 34 (%73,9)'tür. Başvuru öncesi antibiyotik kullanımı ile kanlı ishal arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p= 0,69). Başvuru öncesi antibiyotik kullanımı ile lökositoz varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,27). Başvuru öncesi antibiyotik kullanımı ile oligüri veya anüri varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,06). Başvuru

öncesi antibiyotik kullanımı ile makroalbuminüri varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,63$). Başvuru öncesi antibiyotik kullanımı ile hipertansiyon gelişmesi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,83$). Başvuru öncesi antibiyotik kullanımı ile transfüzyon ihtiyacı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,80$). Başvuru öncesi antibiyotik kullanımı ile diyaliz ihtiyacı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,17$). Başvuru öncesi antibiyotik kullanımı ile nörolojik komplikasyon gelişimi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p=0,45$). Başvuru öncesi antibiyotik kullanımı ile ateş varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p=0,24$). Başvuru öncesi antibiyotik kullanımı ile ishal süresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,63$). Başvuru öncesi antibiyotik kullanımı ile gastrointestinal şikayetlerin başlangıcıyla başvuru arasında geçen süre arasında ilişki saptanmamıştır ($p=0,63$). Başvuru öncesi antibiyotik kullanımı ile hastanede yatış süresi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,53$).

Hastaneye başvuru sonrası antibiyotik kullanılan hasta sayısı 16 (%34,8)'dir. Hastalardan 7 (%15,2)'sinde imipenem; 5 (%10,9)'inde meropenem, 2 (%4,3)'sinde metronidazol; 1 (%2,2)'inde metronidazol+seftriakson+gentamisin, 1 (%2,2)'inde penisilin kullanılmıştır. Başvuru sonrası antibiyotik kullanımı ile kanlı ishal arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,95$). Başvuru sonrası antibiyotik kullanımı lökositöz varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,95$). Başvuru sonrası antibiyotik kullanımı ile oligüri veya anüri varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,72$). Başvuru sonrası antibiyotik kullanımı ile makroalbuminüri varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p=0,15$). Başvuru sonrası antibiyotik kullanımı ile hipertansiyon gelişimi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,06$). Başvuru sonrası antibiyotik kullanımı ile transfüzyon ihtiyacı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p=0,09$). Başvuru sonrası antibiyotik kullanımı ile diyaliz ihtiyacı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,00$). Başvuru sonrası antibiyotik kullanımı ile nörolojik komplikasyon gelişimi arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,003$). Başvuru sonrası antibiyotik kullanımı ile ateş varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,30$). Başvuru sonrası antibiyotik kullanımında diyaliz ihtiyacı ve nörolojik komplikasyonun dağılımı 22. Çizelgede gösterilmiştir.

22. Çizelge. Başvuru sonrası antibiyotik kullanımında diyaliz ihtiyacı ve nörolojik komplikasyonun dağılımı

Başvuru sonrası antibiyotik kullanımı	Diyaliz ihtiyacı		Nörolojik komplikasyon	
	Var	Yok	Var	Yok
Antibiyotik kullananlar	13 (%81,3)	3 (%18,8)	5 (%31,3)	11 (%68,8)
Antibiyotik kullanmayanlar	2 (%6,7)	28 (%93,3)	0 (%0,0)	30 (%100)
Toplam	15	31	5	41

Başvuru sonrası antibiyotik kullananların ishal süresinin ortalama değeri $3\pm 2,3$ iken, median değeri 3 (IQR:0,25-5,75; range:0-6). Başvuru sonrası antibiyotik kullanmayanların ishal süresinin ortalama değeri $5,4\pm 2,7$ iken, median değeri 5 (IQR:3-8; range:0-10)'tir.

Başvuru sonrası antibiyotik kullanımı ile ishal süresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0,009$). Başvuru sonrası antibiyotik kullananların gastrointestinal şikayetlerinin başlaması ile başvuru arasında geçen sürenin ortalama değeri $4,25\pm 1,8$ iken, median değeri 4,5 (IQR:3-6; range:0-7)'tir. Başvuru sonrası antibiyotik kullanmayanların gastrointestinal şikayetlerinin başlaması ile başvuru arasında geçen sürenin ortalama değeri $4\pm 2,6$ iken, median değeri 3 (IQR:2-5; range:1-15)'tir. Başvuru sonrası antibiyotik kullanımı ile gastrointestinal şikayetlerinin başlaması ile başvuru arasında geçen süre arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,27$). Başvuru sonrası antibiyotik kullanan hastaların hastanede yatış süresinin ortalama değeri $32,7\pm 21,2$ iken, median değeri 30 (IQR:20-44; range:2-84)'dur. Başvuru sonrası antibiyotik kullanmayan hastaların hastanede yatış süresinin ortalama değeri $14,1\pm 6,5$ iken, median değeri 11,5 (IQR:9-18; range:5-29)'tir. Başvuru sonrası antibiyotik kullanımı ile hastanede yatış süresi arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,001$) Başvuru sonrası antibiyotik kullanımında ishal süresi ve hastanede yatış süresinin dağılımı 23. Çizelgede gösterilmiştir.

23. Çizelge. Başvuru sonrası antibiyotik kullanımında ishal süresi ve hastanede yatış süresinin dağılımı

Başvuru sonrası antibiyotik kullanımı	İshal Süresi		Hastanede yatış süresi	
	Median	Mean	Median	Mean
Var	3	3±2,3	30	32,7±21,2
Yok	5	5,4±2,7	11,5	14,1±6,5

Hastaların 9 (%19,6)'unda tedavide Eculizumab kullanılmıştır. Eculizumab kullanımı ile kanlı ishal varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,60$). Eculizumab kullanımı ile lökositöz varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($0,80$). Eculizumab kullanımı ile oliguri veya anüri varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,65$). Eculizumab kullanımı ile makroalbuminüri varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,24$). Eculizumab kullanımı ile hipertansiyon gelişmesi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,71$). Eculizumab kullanımı ile transfüzyon ihtiyacı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,16$). Eculizumab kullanımı ile diyaliz ihtiyacı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,10$). Eculizumab kullanımı ile nörolojik komplikasyon gelişmesi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,22$). Eculizumab kullanımı ile ishal süresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,43$). Eculizumab kullanımı ile gastrointestinal şikayetlerin başlaması ile başvuru arasında geçen süre arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,35$). Eculizumab kullanımı ile hastanede yatış süresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,07$).

5. TARTIŞMA

STEC enfeksiyonları tüm dünyada sık görülmektedir. Hemorajik kolit ve HÜS gibi ciddi hastalıklara neden olabileceği için ciddi bir halk sağlığı sorunudur. STEC ilişkili HÜS çocukluk çağı hastalığı olarak bilinmektedir ve nadiren erişkinlerde görülmektedir. Özellikle 5 yaş altındaki çocuklarda HÜS ölümle sonuçlanabilmektedir. HÜS patogenezinde Stx gen profili önemli bir yer tutmaktadır. Ayrıca HÜS'e neden olan STEC izolatlarının serotip dağılımını araştırmak epidemiyolojik açıdan önemlidir.

STEC enfeksiyonuna bağlı HÜS'e genellikle O157:H7 serotipi ve temel olarak O26, O45, O103, O104, O111, O121, O145 serotiplerini içeren non-O157:H7 olarak bilinen serotipler neden olmaktadır. Serotiplerin dağılımı dünyada değişkendir. Kuzey Amerika'da daha çok O157:H7 ilişkili HÜS görülürken, Avrupa kıtasında non-O157:H7 STEC enfeksiyonları O157:H7 enfeksiyonlarına göre daha yaygındır.⁷⁵ 2011 yılında Almanya'da 3816 kişinin enfekte olduğu salgında sorumlu serotip O104 olarak belirlenmiştir. Vakaların %20'inden fazlasında HÜS gelişmiştir.⁶²

STEC ilişkili HÜS'te ülkemizde hangi serotipin daha yaygın görüldüğüne dair literatürde kapsamlı bir veri yoktur. Gülesen ve ark.⁸⁴'nın 2011-2014 yılları arasında HÜS semptomlarının en az birini gösteren hastalardan alınan dışkı örnekleriyle yapılan çalışmada 28 hasta örneği Stx pozitif saptanmıştır. Hastalarda en sık saptanan O serotipleri O104 (%25) ve O26 (%21)'dir. Hastaların %11'inde O145, %7'sinde O157, %7'sinde O103, %3'ünde O181, %3'ünde O45, %3'ünde O111, %3'ünde O174, %3'ünde O181, tespit edilmiştir. Örneklerin %14'ü ise serotiplendirilememiştir.

Çalışmamıza dahil olan 46 hastadan izole edilen STEC suşları incelendiğinde en sık tespit edilen serotip O145 olmuştur. O145'i takiben sırasıyla O157, O26, O104, O45 serotipleri tespit edilmiştir. Gülesen ve ark.⁸⁴'nın yaptığı çalışmada da çalışmamıza benzer şekilde ülkemizde birçok serotipin görüldüğü tespit edilmiştir ve non-O157:H7 serotip grubu ön plandadır. Gülesen ve ark.⁸⁴'nın yaptığı çalışmada O104 serotipi en sık gözlenirken, bizim çalışmamızda O145 en sık saptanan serotip olarak belirlenmiştir. Bunun sebebi iki çalışmanın farklı yıllar arasında yapılması ve serotip dağılımının yıllar içinde değişmesi olabilir. Ayrıca, ülkemizde de Avrupa ülkelerine benzer şekilde STEC ilişkili HÜS'te ilk sırada non-O157 grubu içindeki serotipler yer almaktadır.

Dünyada salgınlara sebep olan serotipler incelendiğinde O26, O45, O103, O104, O111, O121, O145, O157 serotipleri en sık saptanan serotipler olduğu görülmektedir. Çalışmamızda en sık saptanan O145 serotipi de bu serotipler arasında yer almaktadır. Çalışmamızda O103, O111, O121 serotiplerine hiç rastlanmamış olup izolatların %26'sı tiplendirilememiş ve NT olarak gruplandırılmıştır. NT olan izolatlar insanlarda henüz hastalığa sebep olduğu bildirilmemiş olup, STEC'in temel rezervuarı olan sığırlarda bulunan O84, O81, O5 gibi serotipler açısından taranarak değerlendirilebilir.⁸⁵

O157 ve non-O157 STEC enfeksiyonlarının klinik profil üzerine etkisinin araştırıldığı çalışma sonucunda O157 serotipinin tespit edildiği hastalarda hastanede yatış süresi ortalama 4 gün iken, non-O157 serotipinin tespit edildiği hastalarda ortalama 2 gün olarak saptanmıştır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diğer klinik verilerle O serotiplendirme arasında bir ilişki saptanmamıştır.⁸⁶

Araştırmamızda O157 veya non-O157 serotipinin tespit edildiği hastalarda hastanede yatış süresi ve diğer klinik veriler arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bu durum bahsedilen çalışmanın %59'unu O157 serotipinin tespit edilmesi, araştırmamızda ise yalnızca hastaların %17'sinde O157 tespit edilmesinden kaynaklı olabilir. Bu konu daha kapsamlı çalışmalarla netlik kazanabilir.

STEC'in temel virulans faktörü toksinleridir. Stx1 ve Stx2 bir STEC izolatında beraber bulunabileceği gibi ayrı ayrı da bulunabilir. Stx2'nin Stx1'e göre daha güçlü toksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Stx çeşitli varyantlara ayrılmaktadır. Farklı varyantlarda farklı klinik durumlara yol açabilmektedir.¹¹

Bu çalışmadaki izolatların %17,3'ü yalnızca Stx1, %56,5'i Stx2, %26'sı hem Stx1 hem de Stx2 bulundurmaktadır. Stx1 daha hafif klinik durumlarla ilişkilendirilirken, Stx2'nin HÜS gibi ağır kliniklerle ilişkilendirildiği bilinmektedir. Çalışmada Stx2 bulundurma oranının %82,6 olması, çalışmadaki izolatların tamamının hastane yatışı olan HÜS'lü çocuklardan elde edilmiş olması diye düşünüyoruz.

Nüesch-Inderbilen ve ark.⁸⁰'nin İsviçre'de 2017 yılında yaptığı bir çalışmada insanlardan izole edilen 120 STEC suşununun 45 tanesinin (%37,5) yalnızca Stx1 taşıdığı, bunların da Stx1a (35), Stx1c (9), Stx1d (1) olduğunu raporlamıştır. Yalnızca Stx2 taşıyan izolat sayısı 47 (%39,1)'dir ve bunlar; Stx2a (14), Stx2b (14), stx2c (5), stx2d (12) ve stx2e

(2) olarak tespit edilmiştir. İzolatların 40 (33,3%) tanesinde potansiyel patojen olan Stx2a, Stx2c, Stx2d tespit edilmiştir. Bu çalışmada STEC enfeksiyonu olan 120 hastadan %7,4'ünde HÜS meydana gelmiştir. HÜS'lü 9 hastanın %55'inde Stx2a, %45'inde Stx2d tespit edilmiştir. İzolatların O serotiplerine bakıldığında 9 (%7,5)'unun O157: H7, 111(%92,5)'inin ise non-O157:H7 grubunda olduğu görülmüş. En sık görülen serotipler O103 (11), O145(6) ve 026 (8) olarak belirlenmiş. O111 tespit edilmemiştir. Çalışmalarını daha önceki verilerle kıyasladıklarında İsviçre'de O157:H7 sıklığının giderek azaldığı, non-O157:H7 grubuna ait serotiplerin arttığı görülmüş.

Bu çalışmadaki izolatların %10,9'unda Stx1c, %6,5'inde Stx1c+Stx1a tespit edilmiştir. Yalnızca Stx1a tespit edilen bir izolat yoktur. Şaşırtıcı olarak, Stx1a, Stx1 varyantları arasında en sık görülen olmasına rağmen çalışmada Stx1c daha fazla tespit edilmiştir. Stx1a ise tek olarak değil, Stx1c ile birlikte tespit edilmiştir. Stx1a, Stx1c gibi varyantların az sayıda tespit edilmesinin nedeni bu varyantların komplike olmayan ishallerle, asemptomatik olgularla ilişkili olup HÜS'e nadiren sebep olması olabilir. İzolatların %76'sında ise Stx2a tespit edilip, %6,5'inde Stx2c olmasının sebebi olarak HÜS'lü hastalarda en sık görülen Stx2 varyantlarının Stx2a ve Stx2c olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Stx2b, Stx2e Stx2f ve Stx2g daha hafif klinik durumlarla ilişkili olması ve insanlarda daha az sıklıkla bulunması nedeniyle bu varyantlara rastlanılmadığını düşünmekteyiz. Nüesch-Inderbilen ve ark.⁸⁰'nin çalışmasına benzer şekilde O serotiplendirme sonucunda non-O157:H7 serotipleri izolatların %82,6'sını oluşturmaktadır. En sık tespit edilen ise O145'tir. Bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızdaki Stx varyantlarının çoğunun Stx2 varyantı olmasının nedeni, çalışmamıza dahil olanlarının tamamının HÜS tanısı olması, hafif klinik durumlar, asemptomatik taşıyıcılık gibi durumların çalışmaya dahil olmamasıdır. Literatürde tamamı HÜS hastalarından oluşan ve Stx varyantlarının incelendiği bir çalışma yoktur. Bu çalışma HÜS'lü hastalarda Stx varyantlarının araştırıldığı ilk çalışmadır.

Stx1a, Maymun böbrek epitel hücreleri (Vero) üzerinde toksik etkiye sahiptir. Stx2a ise farelerde yapılan deneylerde daha düşük lethal doza (LD50) sahip olduğu tespit edilmiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar Stx2a'nın tek başına olduğu durumların, sadece Stx1a varlığına veya Stx1a+Stx2a varlığına göre daha ağır klinik tablolara yol açtığı görülmüştür. Stx2a ile enfekte olan farelere intraperitoneal olarak Stx1a'nın verilmesi sonucu Stx2a'nın

toksitesinin azaldığı görülmüş. Bunun sebebi olarak Stx1a'nın varlığı, Stx2a'nın böbrek hücrelerine bağlanmasını azalttığı düşünülmüştür. Böylece Stx1a varlığı, Stx2a'nın sitotoksitesini azaltmıştır.⁸⁷ Fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise Stx2a ve Stx1a'nın koenfeksiyonunda Stx1a'nın Stx2a'nın toksitesini azalttığı görülmüştür. Bu çalışmalar yalnızca Stx2a'ya bağlı salgıların her iki toksini taşıyanlara göre daha ağır klinik sonuçlara yol açmasını açıklamaktadır.⁸⁸

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak Stx1a'nın tek başına bulunduğu bir izolat tespit edilmemiştir. Literatürde Stx1a'nın tek başına HÜS'e neden olduğuna dair bir veriye rastlanılmamıştır. Çalışmamızda literatüre uyumlu olarak HÜS' lü hastalardan en sık Stx2a tespit edilmiştir. Stx2a ve Stx1a+Stx2a tespit edilen hastaların klinik durumu karşılaştırılmamıştır. Çünkü Stx1a+Stx2a tespit edilen hasta yoktur. Stx1a+Stx1c+Stx2a tespit edilen yalnızca 6 hasta olup, bu sayı karşılaştırma yapabilmek için istatistiki açıdan yeterli değildir. Ancak yalnızca Stx2a'nın bulunduğu HÜS tanılı hastalar tüm hastaların %50'sini oluşturması ve Stx1a'ya tek başına rastlanmaması Stx2a'nın daha potent bir toksin olduğunu ve HÜS'e daha sık neden olduğunu düşündürmektedir.

Bu araştırmada hastalardan izole edilen STEC izolatlarının 23 (%50)'si Stx2a bulundurur ve diğer 6 varyantı bulunduran hasta sayıları istatistik değerlendirme açısından yetersiz sayıdadır. Bu sebeple klinik veriler Stx2a tespit edilen hastalar, Stx2a tespit edilmeyen hasta grubuyla karşılaştırılmıştır. Klinik veri olarak; kanlı ishal varlığı, lökositöz, oliguri/anüri varlığı, makroalbuminüri varlığı, hipertansiyon gelişmesi, ateş, transfüzyon ihtiyacı, diyaliz ihtiyacı, nörolojik komplikasyon varlığı, antibiyotik kullanımı, Eculizumab kullanımı, ishal süresi, gastrointestinal şikayet varlığı ile başvuru arasında geçen süre, hastanede yatış süresi, ölümle sonuçlanma durumu değerlendirilmiştir. O serotiplerinin ve Stx varyantlarının bu klinik verilerle ilişkisi ve klinik verilerin birbirleriyle ilişkisi istatistiki açıdan araştırılmıştır.

Mody ve ark.⁶⁴'nın STEC ilişkili 770 hasta ile yaptığı çalışmada 22 HÜS vakası ölümle sonuçlanmıştır. 0-2 yaş arası çocuklarda HÜS kliniğinin daha ağır seyrettiği ve ölüm oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ölen 22 hastanın %40'ı 0-2 yaş, %31'i 2-4 yaş, %9'u 4-7 yaş, %20'si 7-18 yaş gruplarında tespit edilmiştir. Aynı çalışmada vakaların %80'inde kanlı ishal tespit edilmiştir. Kanlı ishali olmayanlarda ölüm gerçekleşmemişken, ölenlerin tamamında kanlı ishal öyküsü mevcuttur. Serum Kreatinin

ve BUN (Blood ürea nitrogen) seviyesinin yüksekliğinde mortalite riski daha yüksek saptanmıştır. İshal başlangıcı ile HÜS kliniği arasındaki sürenin 4 günden kısa olması durumunda mortalitenin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada ölen vakaların %52'sinde santral sinir sistemi tutulmuş olup, santral sinir sistemi tutulumunun mortaliteyi en çok etkileyen faktör olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmamızda 2 HÜS vakası ölümlü sonuçlanmış olup ölüm oranı %4'tür. HÜS'lü hastalarında mortalitenin %3-5 olduğu bilinmektedir.⁶⁴ Çalışmamız mortalite açısından literatür ile uyumludur; ancak 2 hastanın ölümüyle sonuçlanan çalışma istatistik açıdan değerlendirmek için yetersizdir. Bu sebeple klinik için verilerin mortalite ile ilişkisi değerlendirilememiştir. Yaş grupları ile klinik veriler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Vakaların %37'sinde kanlı ishal tespit edilmiştir. Kanlı ishali olan hastalarda lökositöz varlığı ve transfüzyon ihtiyacı daha sık tespit edilmiş ve istatistik açıdan anlamlı fark bulunmuştur. Kanlı ishali olan hastalarda olmayanlara göre ishal süresi daha uzundur. Kanlı ishal varlığı, lökositöz ve transfüzyon ihtiyacı için erken haber verici olabilir. Ayrıca, kanlı ishali olanların olmayanlara göre ishal süresinin daha uzun sürebileceği sonucu da verilerden elde edilmiştir. İshal başlangıcı ile başvuru arasında geçen sürenin kısa olmasının mortaliteyi artırdığı literatürde⁶⁴ bildirilmiştir; ancak araştırmamız Stx varyantlarının gastrointestinal şikayetlerin başlangıcı ile başvuru arasındaki geçen süre ile ilişkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Araştırma bulgularına göre gastrointestinal şikayetlerin başlangıcı ile başvuru arasında geçen süre Stx2a tespit edilenlerde ortalama 3 gün iken, diğer varyantların tespit edildiği hasta grubunda ortalama 5 gündür. Stx2a tespit edilen hastalarda daha hızlı bir klinik geliştiğini düşünmekteyiz. Stx2a tespit edilen hastalarda gastrointestinal şikayetlerin başlaması ile başvuru arasında geçen sürenin daha kısa olması Mody ve ark.⁶⁴'nin yaptığı çalışmaya göre; Stx2a'nın dolaylı olarak mortalite üzerinde etkisi olduğunu düşündürebilir. Bu durum ileri çalışmalarla desteklenmelidir.

Oakes ve ark.⁶⁶'nin STEC ilişkili HÜS nedeniyle ölen 17 vakanın incelendiği çalışmada 4 hastaya yapılan otopside beyin tutulumu gözlenmiştir; serebral ödem, enfarkt, herniasyon gibi bulgular saptanmıştır. Ölen hastaların %67'sinde oligüri, %41,7'sinde anüri saptanmış. Çalışma sonucunda yüksek lökosit seviyeleri, nörolojik tutulum ve oligüri varlığı HÜS'e bağlı ölümler için erken haber verici olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamız sonucunda nörolojik komplikasyonu olanlarda olmayanlara göre hastanede yatış süresinin daha uzun olduğu tespit edilmiştir. Bu durum nörolojik komplikasyonların mortaliteyi etkilemesinin yanı sıra, hastanede yatış süresini de etkilediğini düşündürmektedir. Bunun sebebi nörolojik komplikasyonu olan hastaların daha uzun süre takibe ihtiyacı olması olabilir. Literatürde⁶⁶ nörolojik komplikasyon varlığının mortaliteyi etkilediği bilinmektedir ancak; HÜS hastalarında nörolojik komplikasyonların hastanede yatış süresi ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışma mevcut değildir. Çalışmamız bu konudaki ilk araştırmadır.

Zhao ve ark.⁶⁸'nin 46 HÜS hastasının değerlendirdiği çalışmada diyaliz ve transfüzyon ihtiyacının olması, özellikle bu ihtiyacın uzun sürmesi mortaliteyi arttırdığı belirtilmiştir.

Garg ve ark.⁶⁹'nin 2013 yılında yayınladığı meta analize göre HÜS'lü hastalar arasında diyalize ihtiyacı olanlarda hastalığın prognozu daha kötü olduğu bildirilmiştir. Diyaliz ihtiyacı olanlarda glomerüler filtrasyon hız düşüklüğü, aşikar proteinüri, hipertansiyon gibi hastalık sonrası uzun dönem renal sekellerin olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda ölümle sonuçlanan vaka sayısı az olduğu için mortalite açısından istatistiki karşılaştırılması yapılamamıştır ancak; diyaliz ihtiyacının olması hastane yatış süresini uzattığı görülmüştür. STEC'e bağlı HÜS'de diyaliz ihtiyacı olması hastanede yatış süresine dair bir erken haber verici olabilir. Literatürde⁶⁹ diyaliz ihtiyacının uzun dönem renal sekellere sebep olduğu bildirilmesine rağmen hastanede yatış süresi ile ilişkisine dair veri yoktur. Çalışmamız bu konudaki ilk araştırmadır.

Spinale ve ark.⁸⁹'nin yayınladığı meta analize göre HÜS sonrası uzun dönem böbrek hasarı yaşayan hastaların %15-30'unda proteinüri, %5-15'inde hipertansiyon tespit edilmiş. Araştırmacılara göre proteinüri varlığı uzun dönemdeki komplikasyonların en önemli sebeplerindendir.

Renaud ve ark.⁹⁰'nin HÜS tanılı 42 çocukla yaptığı çalışmaya göre hastalık sırasında makroalbuminüri, aşikar proteinüri, ishal öyküsü olmaması, relapsların olması kötü prognoz olarak değerlendirilmiştir. Hüseman ve ark.⁹¹'nin 127 çocuğun 13 yıl takibini içeren çalışmasına göre yedi günden uzun süren anüri varlığı ve hipertansiyon gelişmesi en kötü prognoz olarak bildirilmiştir.

Araştırmamızda Stx2a tespit edilen hastaların %78,3'ünde, diğer varyantların tespit edildiği hastaların ise %43,5'inde makroalbuminüri saptanmıştır. Stx2a tespit edilen grupta makroalbuminüri daha fazla olup, istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur. Stx2a tespit edilen hastalarda hastanede yatış süresi daha uzun olarak saptanmıştır. Ayrıca makroalbuminürisi olan hastaların hastane yatış süreside daha uzun olarak tespit edilmiştir. Bu durum Stx2a varlığında makroalbuminürinin daha fazla olacağını ve makroalbuminüri hastalarda da hastanede yatış süresinin daha uzun olacağına dair haber verici olabilir. Stx varyantları, makroalbuminüri ve hastanede yatış süresi arasındaki ilişkiye dair literatürde bir veri yoktur. Çalışmamız Stx varyantlarının makroalbuminüri ve hastanede yatış ilişkisine dair ilk çalışmadır.

Hipertansiyon gelişen hastalarda da hastanede yatış süresi, hipertansiyon gelişmeyen hastalara göre daha uzun tespit edilmiştir. HÜS'e bağlı hipertansiyon gelişmesi hastanede yatış süresi için bir haber verici olabilir. Çalışmamız HÜS'e bağlı hipertansiyon gelişiminin hastanede yatış süresi ile ilişkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Smith ve ark.⁹²'i 20 yaşın altında 195 STEC enfeksiyonu olan hasta ile yaptığı çalışmanın sonucunda Beta Laktam grubu antibiyotiklerin kullanımının HÜS için risk faktörü olduğunu saptamıştır.

Tarr ve ark.⁹³'ün *E. coli* O157:H7 enfeksiyonuna bağlı HÜS geçiren 471 hasta ile yaptığı çalışmada antibiyotik kullanımı ile STEC'e bağlı HÜS gelişmesinde güçlü bir ilişki saptanmıştır. Bu çalışmaya göre 18 yaş altında olanların tanı öncesi antibiyotik kullanma oranı %13 iken, 18 yaş üzerinde olanların %54 saptanmıştır. Çalışmaya katılanlardan 232 kişi (%49) tanı öncesi antibiyotik kullanmış olup, kullanılan antibiyotikler nitroimidazol türevleri (%40), florokinolon türevleri (% 32), Beta laktam grubu antibiyotikler (% 17), Makrolidler (% 4), Glikopeptidler (% 3), Trimetoprim-sulfametoksazol (% 1), Aminoglikozidler (% 0.8), Tetrasiklinlerdir (% 0.4). Tarr ve ark.⁹³'ün çalışmasına göre tanı öncesi antibiyotik kullanan hastalarda antibiyotik kullanmayanlara göre HÜS gelişme oranı benzerdir. Bu antibiyotik gruplarından herhangi birinde HÜS'e karşı bir koruyuculuk saptanmamıştır. HÜS ve antibiyotik kullanımı arasındaki en kuvvetli ilişki Beta Laktam grubu antibiyotiklerde saptanmıştır.

Almanya'da 2011'de meydana gelen salgında, salgından sorumlu STEC izolatının EAEC ve EHEC bakterilerinin ortak virülans genlerine sahip olduğu, stx geninin olduğu ama tip 3 sekresyon sistemine sahip olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca bu izolatta genişlemiş spektrumlu beta laktamaz direnci varlığı bildirilmiştir.⁹⁴

Kakoullis ve ark.⁷¹'nin 2019'da yayınladığı derlemede antibiyotiklerin STEC üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar toplanmıştır. Antibiyotiklerin toksin üretimini indüklemesi toksin tipine de bağlıdır. Her iki toksini üreten suşlarda, belirli antibiyotiklere maruz kaldıktan sonra Stx2 üretiminin arttığı, Stx1 de ise artış olmadığı görülmüştür. Ciprofloxacın Stx2 üretimini arttırırken, Stx1'i inhibe ettiği görülmüştür. Bu durum Stx2 üretiminin bakterilerde DNA hasarı sonucu oluşan SOS yanıtından etkilenmesi ile açıklanmıştır. Kinolon grubu antibiyotiklerin Stx üretimini ciddi anlamda arttırdığı birçok çalışma ile ispatlanmıştır. Beta laktam grubu antibiyotiklerin kullanılmasının çok ciddi HÜS riski oluşturulduğu saptanmıştır. Gentamisin ise in vitro deneylerde Stx1 ve Stx2 üretimini azalttığı görülmüştür; fakat in vivo deneylerde başarısız olduğu görülmüştür. Bu nedenle gentamisine ilişkili net bir kanı oluşmamıştır. Rifampisin ile yapılan çalışmalarda Stx üretimini arttırmadığı görülmüş ve in vivo deneylerde mortaliteyi azalttığı bildirilmiştir. Kolistin ile yapılan çalışmalarda kolistinin Stx üretimini azalttığı görülmüştür. Kolistinin nefrotoksik etkisi nedeniyle oral verilmesi düşünülebilir. Oral verildiğinde emilim çok az olmakla birlikte lümeninde STEC suşlarına etki edebilmektedir.

Karmali ve ark.⁹⁵'nin 1983 yılında HÜS ve STEC enfeksiyonlarının ilk defa ilişkilendirildiği yayında böbrek yetmezliği başlamadan önce hastaların çoğunun antibiyotik kullandığı bildirilmiştir.

Freedman ve ark.⁹⁶'nin 2015 yılına kadar HÜS ve antibiyotik kullanımını inceleyen araştırmalardan derlediği metaanalize bazı çalışmalara göre antibiyotik kullanımı HÜS gelişme riskini arttırmadığı görülse bile, yanlış çalışmalar ve HÜS tanısının net olmadığı çalışma grubu dışlandığında antibiyotik kullanımının HÜS gelişmesi için bir risk olduğu görülmüş ve STEC enfeksiyonlarında antibiyotik kullanılmaması önerilmiştir.

Çalışmamızda başvuru öncesi antibiyotik kullanım oranı %26 olarak tespit edilmiştir. Kullanılan antibiyotikler metronidazol, amoksisilin, sefiksim, seftriakson ve imipenemdir. STEC enfeksiyonlarında antibiyotik kullanımı önerilmemesine rağmen pratik uygulamada

sıklıkla antibiyotik kullanılmaktadır. Tarr ve ark.⁹³'nin çalışmasına benzer şekilde başvuru öncesi en sık kullanılan antibiyotik bir nitroimidazol türevi olan metronidazoldür. Bunun yanı sıra beta laktam grubundan amoksisilin, sefiksime, seftriakson, imipenem gibi antibiyotikler de kullanılmıştır. Çalışma sonucunda başvuru öncesi antibiyotik kullanımı ile klinik veriler arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamızda başvuru sonrası antibiyotik kullanımı %34 tespit edilmiştir. En sık kullanılan antibiyotikler imipenem ve meropenem gibi karbapenem grubu antibiyotikler olmuştur. Bunun yanı sıra metronidazol, seftriakson, gentamisin, penisilin gibi antibiyotikler de kullanılmıştır.

Araştırma sonucunda başvuru sonrası antibiyotik kullananlarda diyaliz ihtiyacı %81 iken, başvuru sonrası antibiyotik kullanmayanlarda %6,7 olarak tespit edilmiştir. Bunun sebebi imipenem gibi bazı antibiyotiklerin nefrotoksik etkisi olabilir. Başvuru sonrası antibiyotik kullanan hastalarda nörolojik komplikasyon %31 iken, başvuru sonrası antibiyotik kullanmayanlarda nörolojik komplikasyon gelişmemiştir. Nörolojik komplikasyonu olan hastalar incelendiğinde 5 hastanın 4'ünün karbapenem grubu antibiyotik kullandığı görülmüş, 1'i ise metronidazol+seftriakson+gentamisin kullanmıştır. Nörolojik komplikasyonların daha sık gözlenmesinin sebebi karbapenemleri nörotoksik etkisi olabilir. Bu durum daha kapsamlı çalışmalarla incelenmelidir. Başvuru sonrası antibiyotik kullanan hastalarda hastanede yatış süresi daha uzun tespit edilmiştir. Ayrıca literatürde STEC izolatlarında birçok antibiyotiğe karşı direnç bildirilmiştir. Bu sebeplerle HÜS tanılı hastalarda antibiyotik kullanımından kaçınılmalıdır. STEC enfeksiyonlarında antibiyotik kullanımının HÜS gelişme riskini tetiklediği, Stx üretimini arttırdığı ve antibiyotik kullanımının önerilmediği literatürde^{95,96} bildirilmiştir ancak; antibiyotik kullanımı ile diyaliz ihtiyacı, nörolojik komplikasyon gelişimi ve hastanede yatış süresi hakkında veri yoktur. Çalışmamız bu verileri inceleyen ilk çalışmadır.

STEC ilişkili HÜS' de spesifik bir tedavi bulunmamaktadır. Akut mortalite %5 'den düşüktür, fakat HÜS sonrası hastaların üçte birinde uzun dönem böbrek hasarı olabilmektedir. Eculizumab bir kompleman C5 monoklonal antikordur. Eculizumab tedavisinin atipik HÜS için tedavide önemi bilinmektedir; fakat STEC ilişkili HÜS'deki rolü net değildir. 2011 yılında HÜS tanılı, ciddi böbrek hasarı ve nörolojik komplikasyonları olan 3 çocukla yapılan çalışmada eculuzimab tedavisi sonrası

hematolojik parametrelerde ve nörolojik komplikasyonlarda dramatik bir iyileşme görülmüş. Almanya'daki O104:H4 STEC salgınında ise Eculizumab tedavisinden belirgin bir fayda görülmemiştir.⁹⁷

Çalışmamıza dahil olan hastalarda yalnızca 9'unda Eculizumab kullanılmıştır. Bu sayı güçlü bir istatistik veri alabilmek açısından oldukça yetersiz olup, yapılan istatistiki veriler sonucunda Eculizumab kullanımı ile klinik veriler arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bu durum daha kapsamlı araştırmalarla desteklenmelidir.

Çalışmadan elde edilen tüm veriler dikkate alındığında Stx2a tespiti, makroalbuminüri varlığı, hipertansiyon gelişmesi, diyaliz ihtiyacı, nörolojik komplikasyon varlığı ve başvuru sonrası antibiyotik kullanımının hastanede yatış süresini uzattığı saptanmıştır. Bu parametreler kullanılarak hastanede yatış süresinin sınıflandırılması mümkün olabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Bu çalışma STEC ilişkili HÜS'te serotiplerin ve toksin varyantlarının dağılımı ve bunların klinik profil ile ilişkisine dair ülkemizdeki ilk çalışmadır.
2. STEC enfeksiyonuna bağlı HÜS'e O157:H7 serotipi ve temel olarak O26, O45, O103, O104, O111, O121, O145 serotiplerini içeren non-O157:H7 olarak bilinen serotipler neden olmaktadır. Serotiplerin dağılımı dünyada değişkendir. Çalışmamızda non-O157 serotip grubuna daha sık rastlanmıştır. En sık görülen serotip O145'tir. O serotipleri ve klinik profil arasında bir ilişki saptanmamıştır.
3. HÜS'lü hastalarda en sık görülen toksin varyantı olarak Stx2a tespit edilmiştir. Stx2a tespit edilen hastalarda makroalbuminüri daha fazla görülmüştür. Stx2a varlığı hastada makroalbuminüri gelişimi açısından erken haber verici olabilir. Stx2a tespit edilen hastalarda gastrointestinal semptomların başlangıcı ile hastaneye başvuru arasında geçen süre diğer toksin varyantlarına göre daha kısadır. Stx2a daha hızlı gelişen bir klinik duruma yol açabilir. Stx2a tespit edilen hastalarda hastanede yatış süresi daha uzundur. Stx2a tespiti hastanede yatış süresi açısından erken haber verici olabilir. Toksin varyantlarının klinik profili etkilediğinin görülmesi ile, STEC enfeksiyonlarında varyant tespiti önem kazanmıştır.
4. Stx2a olmayan varyantlara ve Stx2a'nın diğer varyantlarla kombine olduğu daha fazla hasta verisi elde edilerek, diğer varyantların ve Stx2a'nın diğer varyantlarla kombinasyonun klinik profil üzerinde etkisi araştırılmaya açık bir konudur.
5. Kanlı ishali olan hastalarda lökositöz ve transfüzyon ihtiyacı daha fazladır, ishal süresi daha uzundur. Kanlı ishal, lökositöz varlığı, transfüzyon ihtiyacı ve ishal süresinin uzunluğu açısından erken haber verici olabilir.
6. Hastaneye başvuru sonrasında antibiyotik kullanımının daha fazla diyaliz ihtiyacına ve nörolojik komplikasyona yol açtığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu hastalarda hastanede yatış süresi daha uzundur. HÜS tanılı hastalarda antibiyotik kullanımı önerilmemektedir.
7. HÜS tanılı hastalarda makroalbuminüri, diyaliz ihtiyacı, hipertansiyon veya nörolojik komplikasyonu olanlarda hastanede yatış süresi daha uzundur. Bu klinik veriler hastanede yatış süresi için erken haber verici olabilir.

7. ÖZET

Hemolitik Üremik Sendrom Tanılı Hastalardan İzole Edilen Shiga Toksin Üreten *Escherichia coli* İzolatlarının O Serotiplerinin ve Toksin Varyantlarının Klinik Durumla İlişkisinin Araştırılması

Giriş ve Amaç

STEC komplike olmayan ishalden, hemorajik kolite, Hemolitik Üremik Sendrom'a kadar değişen farklı klinik durumlara yol açmaktadır. STEC çeşitli serotiplere ve toksin varyantlarına sahiptir. STEC'in serotipler ve toksin profillerinin belirlenmesi, hastalığa neden olma potansiyellerini tahmin etmek ve epidemiyolojik değişiklikleri öngörmek için büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada HÜS hastalarından izole edilen STEC izolatlarının O serotip ve Stx gen profilinin saptanması, bu profilin hastanın klinik ve laboratuvar verileriyle ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Shiga toksini pozitif tespit olan 46 hastadan alınan dışkı örnekleri SMAC ve CT-SMAC ağara ekim yapılarak STEC izolatları tespit edilmiştir. STEC izolatından kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır. O serotiplendirme ve toksin varyantlarının belirlenmesi PZR yöntemi ile belirlenmiştir. Klinik veriler klinik bilgi formları aracılığı ile toplanmıştır. Verilerin analizi SPSS programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular

Shiga toksini pozitif olan 46 STEC hasta içerisinde en sık saptanan O serotip O145 (%32,6)'tir. Hastaların %50'sinde Stx2a tespit edilmiş olup, Stx2a varyantının tespit edildiği hastalar, diğer varyantların tespit edildiği hastalar ile karşılaştırılmıştır. Stx2a tespit edilen hastalarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde makroalbuminüri gelişmiştir ($p=0,01$). Stx2a tespit edilen hastalarda gastrointestinal şikayetlerin başlamasıyla başvuru arasında geçen süre daha kısa olarak saptanmıştır ($p=0,00$). Stx2a tespit edilen hastalarda hastanede yatış süresi daha uzun bulunmuştur ($p=0,01$). Kanlı ishali olanlarda lökositöz ve transfüzyon ihtiyacı daha fazla olarak tespit edilmiştir ($p<0,05$). Makroalbuminürisi olan, HÜS'e bağlı hipertansiyon gelişen, diyaliz ihtiyacı olan veya nörolojik komplikasyonu

olan hastalarda hastanede yatış süresi daha uzun olarak saptanmıştır ($p<0,05$). Başvuru sonrası antibiyotik kullanım durumunda diyaliz ihtiyacı ve nörolojik komplikasyonlara daha sık rastlanılmıştır ($p<0,05$). Başvuru sonrası antibiyotik kullanım durumunda ishal süresi daha kısa, hastanede yatış süresi daha uzun olarak tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Sonuç

Bu çalışma STEC ilişkili HÜS'te serotiplerin ve toksin varyantlarının dağılımı ve bunların klinik profil ile ilişkisine dair ilk çalışmadır. Toksin varyantının belirlenmesi hastaların klinik profilini etkilemektedir. HÜS tanılı hastalarda Stx varyantlarının belirlenmesi hastaların klinik prognozu için haber verici olduğunu düşünmekteyiz.



8. ABSTRACT

Investigation of the Relationship Between O Serotypes and Toxin Variants of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* Isolated from Patients with Hemolytic Uremic Syndrome and Clinical Status

Introduction and Purpose

STEC leads to different clinical situations ranging from uncomplicated diarrhea to hemorrhagic colitis and Hemolytic Uremic Syndrome. STEC has a variety of serotypes and toxin variants. The determination of serotypes and toxin profiles of STEC has great importance to predict their potential to cause disease and to predict epidemiological changes. In this study, it was aimed to determine the O serotype and Stx gene profile of STEC isolates isolated from HUS patients and to investigate the relationship of this profile with the clinical and laboratory data of the patients.

Materials and Methods

Stool samples taken from 46 patients with positive Shiga toxin were inoculated on SMAC and CT-SMAC agar to determine STEC isolates. DNA isolation was performed from STEC isolates by boiling method. O serotyping and determination of toxin variants were determined by PCR method. Clinical data were collected through clinical information forms. The analysis of the data was carried out using the SPSS program.

Results

Among the 46 Shiga toxin positive STEC patients, O145 (32.6%) was the most frequent serotype detected. Stx2a was detected in 50% of the patients, and the patients in whom the Stx2a variant was detected were compared with the patients in whom other variants were detected. Statistically significant macroalbuminuria developed in patients with Stx2a ($p = 0.01$). The time between the onset of gastrointestinal complaints and admission was found shorter in patients with Stx2a ($p = 0.00$). The duration of hospitalization was found longer in patients with Stx2a ($p = 0.01$). Leukocytosis and need for transfusion were found to be higher in those with bloody diarrhea ($p < 0.05$).

The duration of hospitalization was found to be longer in patients with macroalbuminuria, hypertension due to HUS, in need of dialysis, or neurological complications ($p < 0.05$). In the case of antibiotic use after admission, the need for dialysis and neurological complications were observed more frequently ($p < 0.05$). In case of antibiotic use after admission, the duration of diarrhea was shorter and the duration of hospitalization was longer ($p < 0.05$).

Conclusion

This study is the first study on the distribution of serotypes and toxin variants in STEC-associated HUS and their relationship with the clinical profile. Determination of the toxin variant affects the clinical profile of the patients. Determining the Stx variants in patients with a diagnosis of HUS may inform the clinical prognosis of the patients.

9.EKLER

1.Ek. STEC örneği gönderim formu

STEC ÖRNEĞİ GÖNDERİM FORMU

Hasta Adı-Soyadı:

Tarih:

Yaş:

Cinsiyet:

Tc:

Dosya no:

Hastaneye yatış tarihi:

Örnek türü: Dışkı Perianal sürüntü

Gönderen hastane ve Anabilim Dalı:

Hastayı takip eden doktorun adı-soyadı-iletişim numarası:

Hastanın ikamet ettiği il:

Hastanın tanısı ve tanı tarihi:

Hastanın mesleđi (Hasta çocuk ise ailesinin mesleđi):

Hastanın başvuru öncesi kullandığı antibiyotik var mı? Varsa adını yazınız?

Başvuru sırasında;

- | | <u>Var</u> | <u>Yok</u> |
|---|--------------------------|--------------------------|
| ➤ Ateş | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ➤ Karın ağrısı | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ➤ Kanlı İshal: | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ➤ Sulu ishal | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ➤ Oligüri | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ➤ Anüri | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ➤ Diğer şikayetler | | |
| ➤ GIS bulguları ile başvuru arasında geçen süreyi yazınız. | | |
| ➤ Hasta yakınında benzer şikayetler var mı? <u>Var</u> <input type="checkbox"/> <u>Yok</u> <input type="checkbox"/> | | |
| ➤ Ailede HÜS öyküsü veya çevresinde ishali olan varsa belirtiniz. | | |
| ➤ Son zamanlarda tüketilen yiyecekler/içecekler | | |

Sığır eti Koyun eti Keçi eti Domuz eti Kümes hayvanı

Kaynak suyu Pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri

Arş. Gör. Dr. Elif Okumuş

02623037436

2. Ek. STEC pozitif saptanan hastaların klinik bildirim formu

STEC POZİTİF SAPTANAN HASTALARIN KLİNİK BİLDİRİM FORMU

Hasta Adı- Soyadı:

Tarih:

Not: Aşağıdaki klinik durumlardan ‘var’ olarak işaretledikleriniz STEC enfeksiyonuna bağlı olup, akut dönemde gelişmiş olmalıdır.

Başvuru sonrası	Var	Yok	Açıklama
Kullanılan antibiyotik var mı?			Varsa adı:
Gaitada gizli kan			
Trombositopeni			
Hemolitik anemi			
Böbrek fonksiyon testlerinde bozulma			
Oligüri			
Anuri			
Akut Böbrek Yetmezliği			
Diyaliz ihtiyacı			Varsa seans sayısı:
Transfüzyon İhtiyacı			
Nörolojik Tutulum			
Hipertansiyon			
Eculizumab kullanımı			
STEC dışı enfeksiyon varlığı			
Lökositoz			
Aşık Proteinüri (> 300mg/gün)			
Tedavi sonrası kalıcı BFT bozukluğu			
Tedavi sonrası devam eden diyaliz ihtiyacı			

- Hasta ex olduysa belirtiniz.
- Toplam ishalli geçen gün sayısını yazınız.
- Hastanede yatış süresini yazınız.

Arş. Gör. Dr. Elif Okumuş

02623037436

10. KAYNAKLAR

1. Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr.* 2014;2(4):1–21.
2. Cody EM, Dixon BP. Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatr Clin North Am.* 2019;66(1):235–246.
3. Karmali MA, Steele BT, Petric M ve ark. Syndrome associated with faecal *Escherichia coli* in stools. *Lancet.* 1983;1:619–620.
4. Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA ve ark. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Brazilian J Microbiol.* 2016;47(1):3–30.
5. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S ve ark. J. Clin. Microbiol.-2003-Karmali-4930-40. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):4930–4940.
6. Bosilevac JM, Koohmaraie M. Prevalence and Characterization of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Commercial Ground Beef in the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(6):2103–2112.
7. Askar M, Faber M, Heiden M ve ark. Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing. *N Engl J Med.* 2011:1–11.
8. Kawano K, Okada M, Haga T ve ark. Relationship Between Pathogenicity for Humans and stx Genotype in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotype O157. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27(3):227–232.
9. Stearns-Kurosawa DJ, Collins V, Freeman S ve ark. Distinct physiologic and inflammatory responses elicited in baboons after challenge with Shiga toxin type 1 or 2 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2010;78(6):2497–2504.
10. Tesh VL, Burris JA, Owens JW, ve ark. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect Immun.* 1993;61(8):3392–3402.
11. Fuller CA, Pellino CA, Flagler MJ ve ark. Shiga Toxin Subtypes Display Dramatic

- Differences in Potency. *Infect Immun.* 2011;79(3):1329–1337.
12. Tönshoff B, Sammet A, Sanden I ve ark. Outcome and Prognostic Determinants in the Hemolytic Uremic Syndrome of Children. *Nephron.* 1994;68:63–70.
 13. Vaterodt L, Holle J, Hüseman D ve ark. Short- and Long-Term Renal Outcome of Hemolytic-Uremic Syndrome in Childhood. *Front Pediatr.* 2018;6(August):1–8.
 14. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F ve ark. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol.* 1999;37(3):497–503.
 15. Sonnenberg M. Enterobacteriaceae. Mandell L. Gerald, Gordan DR, Bennet E. John, ed. Mandell, Douglas, and Bennett's Infectious Disease Essentials. 7. baskı Philadelphia: Churcill Livingstone; 2009:2820–2822.
 16. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):123–140.
 17. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis.* 2002;181(5):1753–1754.
 18. Penders J, Thijs C, Vink C ve ark. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics.* 2006;118(2):511–521.
 19. Tenailon O, Skurnik D, Picard B ve ark. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(3):207–217.
 20. Biran D, Ron EZ. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018;416:149–161.
 21. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;Jan;11(1):142–201.
 22. Nataro JP, Steiner T, Guerrant R. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg Infectious Dis.* 1998;4:251–261.

23. Wei J, Goldberg M, Wei J ve ark. Complete Genome Sequence and Comparative Genomics of. *Society*. 2003;71(5):2775.
24. Pupo GM, Lan R, Reeves PR. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(19):10567–10572.
25. Etcheverría AI, Padola NL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence*. 2013;4(5):366–372.
26. Zumbrun SD, Hanson L, Sinclair JF ve ark. Human intestinal tissue and cultured colonic cells contain globotriaosylceramide synthase mRNA and the alternate shiga toxin receptor globotetraosylceramide. *Infect Immun*. 2010;78(11):4488–4499.
27. Smith HW, Green P, Parsell Z. Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. *J Gen Microbiol*. 1983;129(10):3121–3137.
28. Strockbine NA, Jackson MP, Sung LM ve ark. Cloning and sequencing of the genes for shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol*. 1988;170(3):1116–1122.
29. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, ve ark. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):2951–2963.
30. Bryan A, Youngster I, McAdam AJ. Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. *Clin Lab Med*. 2015;35(2):247–272.
31. Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK ve ark. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol*. 1998;28(1):1–4.
32. Blanco M, Padola NL, Krüger A ve ark. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol*. 2004;7(4):269–276.

33. Torres AG, Zhou X, Kaper JB. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun*. 2005;73(1):18–29.
34. Schmidt H, Karch H. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol*. 1996;34(10):2364–2367.
35. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun*. 1995;63(3):1055–1061.
36. Beutin L, Montenegro MA, Orskov I ve ark. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 1989;27(11):2559–2564.
37. Oscarsson J, Westermark M, Beutin L ve ark. The bacteriophage-associated ehly1 and ehly2 determinants from *Escherichia coli* O26:H- strains do not encode enterohemolysins per se but cause release of the ClyA cytolysin. *Int J Med Microbiol*. 2002;291(8):625–631.
38. Del Castillo FJ, Moreno F, Del Castillo I. Characterization of the genes encoding the SheA haemolysin in *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella flexneri* 2a. *Res Microbiol*. 2000;151(3):229–230.
39. Ludwig A, Rhein C Von, Bauer S ve ark. Molecular Analysis of Cytolysin A (ClyA) in Pathogenic. *Microbiology*. 2004;186(16):5311–5320.
40. Bolton DJ. Verocytotoxic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: Virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. *Foodborne Pathog Dis*. 2011;8(3):357–365.
41. Brockmeyer J, Bielaszewska M, Fruth A ve ark. Subtypes of the plasmid-encoded serine protease EspP in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Distribution, secretion, and proteolytic activity. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(20):6351–6359.
42. Bielaszewska M, Sinha B, Kuczius T ve ark. Cytolethal distending toxin from Shiga

- toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infect Immun.* 2005;73(1):552–562.
43. Paton AW, Srimanote P, Talbot UM ve ark. A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Exp Med.* 2004;200(1):35–46.
 44. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC ve ark. Characterization of Saa , a Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains That Are Virulent for Humans. 2001;69(11):6999–7009.
 45. Ross BN, Rojas-Lopez M, Cieza RJ ve ark. The role of long polar fimbriae in *Escherichia coli* O104:H4 adhesion and colonization. *PLoS One.* 2015;10(10):1–17.
 46. Gyles CL. Overview, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an. *J Anim Sci.* 2007;85(13):45–62.
 47. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):450–479.
 48. Sherman P, Soni R, Petric M ve ark. Surface properties of the Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* 1987;55(8):1824–1829.
 49. Elliott SJ, Sperandio V, Giron JA ve ark. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2000;68(11):6115–6126.
 50. Cornick NA, Booher SL, Moon HW. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. *Infect Immun.* 2002;70(5):2704–2707.
 51. Karmali MA, Gannon V, Sargeant J. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Vet Microbiol.* 2010;140(3–4):360–370.
 52. Castro VS, Carvalho RCT, Conte-Junior CA ve ark. Shiga-toxin Producing *Escherichia coli*: Pathogenicity, Supershedding, Diagnostic Methods, Occurrence,

- and Foodborne Outbreaks. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2017;16(6):1269–1280.
53. Schüller S. Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. *Toxins (Basel).* 2011;3(6):626–639.
 54. Obrig TG, Karpman D. Shiga toxin pathogenesis: kidney complications and renal failure. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012;357:105–136.
 55. Stein C, Kuchenmüller T, Henrickx S ve ark. The Global Burden of Disease assessments - WHO is responsible? *PLoS Negl Trop Dis.* 2007;1(3).
 56. Gould LH, Demma L, Jones TF ve ark. Hemolytic Uremic Syndrome and Death in Persons with *Escherichia coli* O157:H7 Infection, Foodborne Diseases Active Surveillance Network Sites, 2000–2006. *Clin Infect Dis.* 2009;49(10):1480–1485.
 57. Majowicz SE, Scallan E, Jones-Bitton A ve ark. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog Dis.* 2014;11(6):447–455.
 58. Tarr GAM, Shringi S, Oltean HN ve ark. Importance of case age in the purported association between phylogenetics and hemolytic uremic syndrome in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Epidemiol Infect.* 2018;146(12):1550–1555.
 59. Gould LH, Mody RK, Ong KL ve ark. Emerging Infections Program Foodnet Working Group. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathog Dis.* 2013;10(5):453–460.
 60. Loirat C. Hemolytic uremic syndrome caused by Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Rev French.* 2013;63(1):11–16.
 61. Sin MA, Takla A, Flieger A ve ark. Carrier prevalence, secondary household transmission, and long-term shedding in 2 districts during the *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany, 2011. *J Infect Dis.* 2013;207(3):432–438.
 62. Frank C, Werber D, Cramer JP ve ark. US Investigation Team. Epidemic profile of

- Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med*. 2011;365(19):1771–1780.
63. Dixon BP, Gruppo RA. Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatr Clin North Am*. 2018;65(3):509–525.
 64. Mody RK, Gu W, Griffin PM ve ark. Postdiarrheal hemolytic uremic syndrome in United States children: Clinical spectrum and predictors of in-hospital death. *J Pediatr*. 2015;166(4):1022–1029.
 65. Loirat C. Post-diarrhea hemolytic-uremic syndrome: clinical aspects. *Arch Pediatr*. 2001;8(4):776–784.
 66. Oakes RS, Siegler RL, McReynolds MA ve ark. Predictors of Fatality in Postdiarrheal Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatrics*. 2006;117(5):1656–1662.
 67. Lou-Meda R, Oakes RS, Gilstrap JN ve ark. Prognostic significance of microalbuminuria in postdiarrheal hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2007;22(1):117–120.
 68. Zhao SA, Ning BT, Mao JH. Clinical characteristics of children with hemolytic uremic syndrome in Hangzhou, China. *World J Pediatr*. 2017;13(2):183–185.
 69. Garg A, Rita S, Barrowman N, Rehman F ve ark. Long-term Renal Prognosis of Diarrhea Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Jama*. 2003;290(10):1360–1370.
 70. Grisaru S. Management of hemolytic-uremic syndrome in children. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2014;7:231–239.
 71. Kakoullis L, Papachristodoulou E, Chra P ve ark. Shiga toxin-induced haemolytic uraemic syndrome and the role of antibiotics: a global overview. *J Infect*. 2019;79(2):75–94.
 72. Beutin L, Wang Q, Naumann D ve ark. Relationship between O-antigen subtypes, bacterial surface structures and O-antigen gene clusters in *Escherichia coli* O123 strains carrying genes for Shiga toxins and intimin. *J Med Microbiol*. 2007;56(PART 2):177–184.

73. Karmali MAA, Mascarenhas M, Petric M ve ark. Infection by shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Infect Dis. 2002;70(11):1773–1782.
74. Bosilevac JM, Koohmaraie M. ‘Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. Appl Environ Microbiol. 2011;77:2103–2112.
75. Brooks JT, Sowers EG, Wells JG ve ark. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. J Infect Dis. 2005;192(8):1422–1429.
76. Caprioli A, Luzzi I, Rosmini F ve ark. Communitywide Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome Associated with Non-0157 Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. 1994:208–211.
77. Gerber A, Karch H, Allerberger F ve ark. Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: A prospective study. J Infect Dis. 2002;186(4):493–500.
78. Mathusa EC, Chen Y, Enache E. Non-O157 Shiga Toxin – Producing *Escherichia coli* in Foods. 2010;73(9):1721–1736.
79. Eklund M, Scheutz F, Siitonen A. Clinical Isolates of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: Serotypes, Virulence Characteristics, and Molecular Profiles of Strains of the Same Serotype. J Clin Microbiol. 2001;39(8):2829–2834.
80. Nüesch-Inderbilen M, Morach M, Cernela N ve ark. Serotypes and virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated during 2017 from human infections in Switzerland. Int J Med Microbiol. 2018;308(7):933–939.
81. Cebula TA, Payne WL, Feng P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. J Clin Microbiol. 1995;33(1):248–250.
82. Paddock Z, Shi X, Bai J ve ark. Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle

- feces 1. *Vet Microbiol.* 2012;156(3–4):381–388.
83. Zhang W, Bielaszewska M, Bauwens A ve ark. Real-time multiplex PCR for detecting Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O104:H4 in human stools. *J Clin Microbiol.* 2012;50(5):1752–1754.
84. Gulesen R, Levent B, Demir T ve ark. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans between 2011 and 2014. *Jpn J Infect Dis.* 2016;69(5):390–394.
85. Fan R, Shao K, Yang X ve ark. High prevalence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle detected by combining four selective agars. *BMC Microbiol.* 2019;19(1):213–222.
86. Wang X, Taylor M, Hoang L ve ark. Comparison of Clinical and Epidemiological Features of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 Infections in British Columbia, 2009 to 2011. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2013;24:102–106.
87. Petro CD, Trojnar E, Sinclair J ve ark. Shiga Toxin Type 1a (Stx1a) Reduces the Toxicity of the More Potent Stx2a In Vivo and In Vitro. *Infect Immun.* 2019;87(4):1–9.
88. Russo LM, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Shiga Toxin (Stx) Type 1a Reduces the Oral Toxicity of Stx Type 2a. *J Infect Dis.* 2016;213(8):1271–1279.
89. Spinale JM, Ruebner RL, Copelovitch L ve ark. Long-term outcomes of Shiga toxin hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2013;28(11):2097–2105.
90. Renaud C, Niaudet P, Gagnadoux M ve ark. Haemolytic uraemic syndrome: prognostic factors in children over 3 years of age. *Pediatr Nephrol.* 1995;9(1):24–29.
91. Hüseman D, Gellermann J, Vollmer I ve ark. Long-term prognosis of hemolytic uremic syndrome and effective renal plasma flow. *Pediatr Nephrol.* 1999;13(8):672–677.
92. Smith K, Wilker P, Reiter P ve ark. Antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157

- infection and the risk of hemolytic uremic syndrome, Minnesota. *Pediatr Infect Dis.* 2012;31(1):37–41.
93. Tarr GAM, Oltean HN, Phipps AI ve ark. Strength of the association between antibiotic use and hemolytic uremic syndrome following *Escherichia coli* O157:H7 infection varies with case definition. *Int J Med Microbiol.* 2018;308(7):921–926.
 94. Ibarra C, Amaral MM, Palermo MS. Advances in pathogenesis and therapy of hemolytic uremic syndrome caused by Shiga toxin-2. *IUBMB Life.* 2013;65(10):827–835.
 95. Karmali M, Petric M, Steele B ve ark. Sporadic Cases of Haemolytic-Uraemic Syndrome Associated with Faecal Cytotoxin and Cytotoxin-producing *Escherichia Coli* in Stools. *Lancet.* 1983;321(8325):619–620.
 96. Freedman SB, Xie J, Neufeld MS ve ark. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, antibiotics, and risk of developing hemolytic uremic syndrome: A meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2016;62(10):1251–1258.
 97. Walsh PR, Johnson S. Eculizumab in the treatment of Shiga toxin haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2019;34(9):1485–1492.