



**AFYONKARAHİSAR'DA SATIŞA SUNULAN  
AFYON KAYMAĞINDA *ESCHERICHIA COLI* O157:H7  
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Gıda Mühendisi Didem SAĞLAM  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Esra ŞEKER  
Tez No: 2017-014**

**2017-AFYONKARAHİSAR**

T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AFYONKARAHİSAR'DA SATIŞA SUNULAN AFYON  
KAYMAĞINDA *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 VARLIĞININ  
ARAŞTIRILMASI

Gıda Mühendisi Didem SAĞLAM

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Esra ŞEKER

2017 - AFYONKARAHİSAR

T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AFYONKARAHİSAR'DA SATIŞA SUNULAN AFYON  
KAYMAĞINDA *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 VARLIĞININ  
ARAŞTIRILMASI

Gıda Mühendisi Didem SAĞLAM

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Esra ŞEKER

Bu tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon  
Birimi tarafından 15.SAĞ.BİL.10 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2017-014

2017 - AFYONKARAHİSAR

**KABUL ve ONAY**

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı**

çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

**Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/ 06/ 2017



Prof. Dr. Yahya KUYUCUOĞLU

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Jüri Başkanı



Doç. Dr. Esra ŞEKER

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Üye

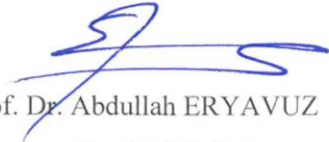


Doç. Dr. Tuba İÇA

Dumlupınar Üniversitesi

Üye

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Didem SAĞLAM'ın "Afyonkarahisar'da Satışa Sunulan Afyon Kaymağında *Escherichia coli* O157:H7 Varlığının Araştırılması" başlıklı tezi 22.06.2017 günü saat 16.00'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Türkiye'de geleneksel bir ürün olan ve özellikle Afyonkarahisar'da Afyon kaymağı olarak da bilinen, asıl orijini manda sütünden alan kaymak, hem üretildiği bölge hem de ülke bazında önemli bir pazar payına sahiptir. Bu nedenle de, kaymağın mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesine yönelik çeşitli araştırmalar yapıldığı, ancak, bu araştırmaların genellikle belirli bakteriler ya da sadece kimyasal parametreler üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir.

*Escherichia coli* O157:H7/H serotipi için sağlıklı ruminantlar primer rezervuarlar olarak kabul edilmekte ve bu hayvanlara ait serotiple kontamine her türlü gıda maddesi halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlike olarak görülmektedir. Günümüzde tüm dünyada en önemli gıda kaynaklı ve zoonotik öneme sahip bakteriyel patojenlerden biri olarak kabul edilen *E. coli* O157:H7/H serotipinin, gerek dünyada gerekse Türkiye'de çeşitli çiğ ve pastörize sütler ya da süt ürünlerinden izolasyonuna yönelik çok sayıda araştırma bulunmakla birlikte, yapılan kapsamlı literatür taramalarında bu serotipin kaymaklarda varlığının araştırılmasına yönelik bir adet çalışma olduğu, bu çalışmada da *E. coli* O157:H7/H izolasyonu yapılamadığı dikkati çekmiştir. Bu nedenle, sunulan çalışmanın temel amacı, Afyonkarahisar'da satışa sunulan Afyon kaymaklarından toplum sağlığı açısından büyük öneme sahip *E. coli* O157:H7/H serotipinin izolasyonu ve izole edilen türlerde infeksiyonların patogenezinde önemli rol oynayan Şiga toksin, enterohemolizin ve intimin virulens genlerinin varlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile araştırılmasıdır. Ayrıca, izole edilen suşların, ülkemizde tedavi ya da koruma amaçlı yaygın olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlilik durumları da incelenecektir. Türkiye'de kaymak örneklerinde ilk kez moleküler yöntemler kullanılarak gerçekleştirilecek bu çalışmada, hem bölge hayvancılığına hem de kaymak üretimi ve tüketimi noktasında insan sağlığına etkisi açısından katkı sağlanması da çalışmanın alt hedefleri olarak seçilmiştir.

"Afyonkarahisar'da satışa sunulan Afyon kaymağında *Escherichia coli* O157:H7 varlığının araştırılması" konulu Yüksek Lisans tez çalışmamda, değerli destekleriyle her zaman yanımda olan danışmanım Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Esra ŞEKER başta olmak üzere, bu güne gelmemde katkıda bulunarak, yüksek lisans eğitimimde değerli bilgilerini benimle paylaşan Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yahya KUYUCUOĞLU'na ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Beytullah KENAR'a teşekkür ederim. Ayrıca, tezimin her aşamasında bana yardımcı olan Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Veteriner Hekim Müesser YILMAZ'a teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Kabul ve Onay.....	i
Önsöz.....	ii
İçindekiler .....	iii
Simgeler ve Kısaltmalar.....	v
Şekiller.....	vi
Tablolar.....	viii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Afyon Kaymağı ve Üretimi.....	3
1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	5
1.2.1. Enterohemorajik <i>E. coli</i> O157:H7 .....	9
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>18</b>
2.1. Gereç.....	18
2.1.1. Örneklerin Toplanması .....	18
2.1.2. Standart suşlar.....	18
2.1.3. Besiyerleri, Solüsyonlar, İdentifikasyon Kitleri ve Antibiyotik Diskleri.....	22
2.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PZR) Kullanılan Buffer, Solüsyon, Ekipman ve Cihazlar.....	23
2.2. Yöntem.....	24
2.2.1. Kaymak Örneklerinden <i>E. coli</i> O157:H7 İzolasyon ve İdentifikasyonu .....	24
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	25
2.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu .....	25
2.2.2.2. <i>Stx1</i> , <i>Stx2</i> , <i>ehlyA</i> ve <i>eaeA</i> Genleri İçin Amplifikasyon Koşulları .....	26
2.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	27
<b>3.BULGULAR.....</b>	<b>28</b>
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları .....	28
3.2.PZR Bulguları .....	30
3.3Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	30
<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>32</b>

<b>SONUÇ</b> .....	<b>37</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>39</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>40</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>41</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>57</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR

A/E lezyonları	Bağlanma/Silinme lezyonları
ATCC	American Type Culture Collection
$\beta$	Beta
BCIG	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-glucuronic acid
bç	baz çifti
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
C-T	Cefixime-Tellurite
DAEC	Diffuz adherent <i>Escherichia coli</i>
<i>eaeA</i>	İntimin geni
EAggEC	Enteroagregatif <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>
<i>ehlyA</i>	Enterohemolizin geni
EIEC	Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>
EspS	<i>Escherichia coli</i> secreted proteins
ETEC	Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>
Gb <sub>3</sub>	Globotriyoskleramide
HC	Hemorajik kolitis
HUS	Hemolitik üremik sendrom
H <sub>2</sub> S	Hidrojen sülfür
kDa	kilodalton
LEE	Enterosit silinme lokusu
MDa	Megadalton
MHA	Mueller Hinton Agar
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
$\mu$ l	Mikrolitre
MR	Metil Red
mTSB	modifiye Tryptone Soy Broth
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SLT	Şiga benzeri toksin
SMAC	Sorbitol MacConkey



STEC	Şigatoksijenik <i>Escherichia coli</i>
Stx1/Stx2	Şiga toksin 1/ Şiga toksin 2
TSA	Trypticase Soy agar
TSB	Trypticase soy broth
TSI	Triple Sugar Iron
TTP	Trombotik trombositopenik purpura
VP	Voges Proskauer
VTEC	Verotoksijenik <i>Escherichia coli</i>
VT1/VT2	Verotoksin 1/Verositotoksin 2



## ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 3.1. BCIG içeren CT-SMAC agarda sorbitol fermentasyonu ve $\beta$ -glukuronidaz enzim aktivitesi negatif <i>E. coli</i> O157 kolonileri.....	29
Şekil 3.2. <i>E. coli</i> O157 Lateks testi ve değerlendirilmesi.....	29
Şekil 3.3. <i>E. coli</i> O157 suşlarında <i>Stx1</i> ve <i>ehlyA</i> genlerine ait PZR bulguları.....	30



**TABLULAR**

Sayfa

Tablo 1.1. Patojen <i>E. coli</i> grupları ve bazı önemli özellikleri.....	8
Tablo 2.1. Kaymak örneklerinin toplandığı yerler, örneklerin orijini ve üretim tipi.....	19
Tablo 2.2. Kullanılan primerlere ait oligonükleotid sekansları ve bant büyüklükleri... ..	26
Tablo 2.3. <i>Stx1</i> , <i>Stx2</i> , <i>ehlyA</i> ve <i>eaeA</i> genleri için uygulanan amplifikasyon koşulları.....	27
Tablo 3.1. <i>E. coli</i> O157 izolatlarının biyokimyasal özellikleri.....	28
Tablo 3.2. <i>E. coli</i> O157 izolatlarında antibiyotik dirençliliği.....	31



## 1. GİRİŞ

Türkiye, coğrafi konumu itibarıyla tarım ve hayvancılığa çok elverişli bir ülke olup, Afyonkarahisar'da da toplumun geçim kaynakları arasında hayvancılık önemli bir yere sahiptir. Yörede başta manda olmak üzere sığır, koyun ve keçi yetiştiriciliği yapılmakta, Türkiye'de iyi bir üne sahip olan kaymak, genellikle yöre mandalarının sütünden imal edilmektedir.

Manda sütü yüksek yağ içeriğinden dolayı kaymak yapımında sıklıkla tercih edilmekte (Yılsay ve Bayizit, 2002; Soysal ve ark., 2005), kullanıldığı peynir, yoğurt ve kaymak gibi ürünlere ayrı bir kıvam ve tat vermektedir (Sarıözkan, 2011). Kaymak, Türkiye'de genellikle küçük aile işletmelerince, özellikle Afyon, Edirne, Kocaeli, İstanbul, Bursa ve Ankara gibi illerde üretilen ve "Lüle Kaymağı" adıyla satışa sunulan bir süt ürünüdür. Türkiye'ye özgü geleneksel bir ürün olan kaymak yapımında, yağ oranı yüksek, kuru madde içeriği açısından zengin, kaymak bağlama yeteneği fazla ve süt rengi daha beyaz olan manda sütü ilk sırayı almaktadır. Manda sütünün yeterli olmaması durumunda ve genellikle paketlenmiş olarak piyasaya sunulan kaymaklarda, belirli miktarda krema ilavesiyle zenginleştirilmiş inek sütünden de yararlanılmaktadır (Yılsay ve Bayizit, 2002; Akalın ve ark., 2006). Türkiye'de kaymak denildiğinde akla ilk gelen ve Afyonkarahisar'da "Afyon Kaymağı" adıyla bilinen kaymak, bu bölgede geleneksel olarak manda sütünden üretilen bir süt ürünü olup, üretici için de önemli bir iş koludur.

Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC) grubunda yer alan *Escherichia coli* O157:H7/H serotipi; insanlarda hemorajik kolitis (HC), kanlı veya kansız diyare, hemolitik üremik sendrom (HUS) ve trombotik trombositopenik purpura (TTP) olarak tanımlanan ciddi ve çoğu kez letal etkili infeksiyonlara neden olmakta, son yıllarda tüm dünyada gıdalar ile bulaşan patojenler arasında en önemlilerinden birisi olarak kabul edilmekte ve halk sağlığı açısından büyük bir tehlike oluşturmaktadır (Karch ve ark., 1999; Law, 2000; Bidet ve ark., 2005; Karmali ve ark., 2010; Bugarel ve ark., 2011; Ko ve ark., 2016).

Sağlıklı ruminantlar, özellikle de sığırlar, herhangi bir klinik belirti göstermeksizin etkeni dışkılarında yoğun ölçüde bulundurmalarından dolayı, *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> infeksiyonları için primer rezervuarlar olarak kabul edilmektedir (Chapman ve ark., 1993b; Steinmuller ve ark., 2006; Karmali ve ark., 2010; Bugarel ve ark., 2011; Persad ve LeJeune, 2014). Bu nedenle de, doğrudan veya dolaylı olarak sığır dışkısı ile kontamine olmuş her türlü gıda maddesi, *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> infeksiyonları açısından potansiyel bir tehlike olarak kabul görmektedir (Steinmuller ve ark., 2006; Karmali ve ark., 2010; Farrokh ve ark., 2013). İnfeksiyonların epidemiyolojileri incelendiğinde, salgınlar ya da bireysel vakaların büyük bir çoğunluğunun yetersiz pişirilmiş etler ve pastörize edilmemiş çiğ sütler olmak üzere hayvan orijinli gıdalar aracılığı ile oluştuğu görülmektedir (Chapman ve ark., 1993a; Dean-Nystrom ve ark., 1999; Karmali ve ark., 2010; Farrokh ve ark., 2013).

*E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> serotipi insanlarda infeksiyonların gelişmesinde anahtar rol oynadığı bilinen Şiga toksinler (Stx1 ve Stx2), intimin ve enterohemolizin gibi virulens faktörlerine sahiptir (Law, 2000; Bugarel ve ark., 2011; Bergan ve ark., 2012). İnsan ve hayvan orijinli izolatlar ile hayvansal orijinli gıdalardan elde edilen izolatlarda, bu virulens faktörlerini kodlayan genlerin tek başlarına ya da kombine olarak bulunabildiği gösterilmiştir (Gyles ve ark., 1998; Law, 2000; Bidet ve ark., 2005; Şeker ve ark., 2010; Rantsiou ve ark., 2012; Akiyama ve ark., 2016).

Günümüzde *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> infeksiyonlarının sağaltımında antibiyotik kullanımı tartışmalı bir konudur. Bazı araştırmacılar, antibiyotik kullanımının Şiga toksin genlerinin *in vivo* ekspresyonunu artırarak, HC ve HUS'un gelişimini şiddetlendirdiğini, bu nedenle infeksiyonların sağaltımında antibiyotiklerin kullanılmaması gerektiğini belirtmektedirler (Wong ve ark., 2000; Zhang ve ark., 2000). Buna karşın bazı araştırmacılar ise, infeksiyonun erken dönemlerinde kullanılan ve etkenlerin henüz dirençli olmadıkları bazı antibiyotiklerin HUS'un ilerlemesini önlediğini bildirmektedir (Ikeda ve ark., 1999; Shiomi ve ark., 1999).

Afyonkarahisar'da manda dışkı ve sütlerinden *E. coli* O157:H7 izolasyonu ile izolatlarda önemli virulens genlerini gösteren sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır

(Şeker ve Yardımcı, 2008; Şeker ve ark., 2010). Bununla birlikte, özellikle, Afyon kaymağında bu serotipin varlığının ve virulens genlerinin moleküler yöntemler kullanılarak gösterildiği bir çalışmaya ise rastlanmamıştır. Sunulan çalışmanın temel amacı, Afyonkarahisar'da satışa sunulan Afyon kaymaklarından toplum sağlığı açısından büyük öneme sahip *E. coli* O157:H7/H serotipinin izolasyonu ve izole edilen türlerde infeksiyonların patogenezinde önemli rol oynayan Şiga toksin, enterohemolizin ve intimin virulens genlerinin varlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile araştırılmasıdır. Ayrıca, izole edilen suşların, ülkemizde tedavi ya da koruma amaçlı yaygın olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlilik durumları da incelenecektir. Afyonkarahisar'da kaymak örneklerinde ilk kez moleküler yöntemler kullanılarak gerçekleştirilecek bu çalışmada, hem bölge hayvancılığına hem de kaymak üretimi ve tüketimi noktasında insan sağlığına etkisi açısından katkı sağlanması da çalışmanın alt hedefleri olarak seçilmiştir.

### 1.1. Afyon Kaymağı ve Üretimi

Türk Gıda Kodeksi Krema ve Kaymak Tebliği'nde kaymak, ağırlıkça en az %60 oranında süt yağı içeren krema olarak ifade edilirken, **Afyon kaymağı** ise manda sütünün tekniğine uygun kaynatılarak 92 °C'de en az 2 dakika tutulması ve tekniğine uygun soğutulması ile elde edilen ürün olarak tanımlanmaktadır (TGK, 2003).

Kaymak, sütün yağdan zengin olan kısmıdır. Kürecikler halinde bulunan süt yağının özgül ağırlığı 0,931 g/ml iken, sütün plazma kısmının özgül ağırlığı ise 1,034 g/ml olarak bilinmektedir. Süt, uzun süre bekletildiğinde özgül ağırlığı daha düşük olan yağ kısmı yukarı çıkarak, yağ kürecikleri büyük kitleler halinde süt yüzeyinde toplanır. Giderek yağca zenginleşen bu tabaka, büyük bölümü süt yağı içeren kaymak tabakasını oluşturur (İnal, 1990).

Çiğ sütün kalitesinin ürün kalitesini de direkt etkilemesi nedeniyle, iyi kalitede bir kaymak elde etmek için hammaddenin de kaliteli olması gerekmektedir. Bu nedenle kaymak yapılacak sütün hilesiz, asitliğinin yükselmemiş, bakteriyolojik kalitesinin iyi, tat ve kokusunun kusursuz olması, kimyasal koruyucu maddeleri

içermemesi istenmektedir (Demirci ve ark., 1992; Koçak, 1995; Uysal ve ark., 1995). Ayrıca, asitliği yükselmiş sütlerin ısıtıldıklarında kesilmeleri nedeniyle sütün taze olması da iyi kalitede bir kaymak elde etmek için önemli bir unsurdur (Koçak, 1995; Tekinşen, 2000; Demirci ve Şimşek, 1997).

Bir çeşit konsantre krema olan kaymak üretiminde, taze manda sütü ya da manda sütünün yetersiz olması durumunda yağ oranı krema ilave edilerek artırılan inek sütü kullanılmaktadır. **Geleneksel yöntemlerle kaymak üretiminde**, sağımı takiben çift katlı tülbent bezinden süzülen manda sütü, alüminyum veya kalaylı bakırdan yapılmış kaymak tavalarına alınarak, süte önce 70-75 °C'ye kadar ön ısıtma işlemi uygulanır. Üretim inek sütü kullanılarak yapılacak ise, süte %10 oranında taze krema ilave edilir. Ön ısıtmayı takiben, tavalarda bulunan süt 4-5 saat süreyle sürekli karıştırılarak 90-95 °C'ye kadar ısıtılır. Bu sürenin sonunda süt 8-10 cm derinliğindeki tavalara belirli bir yükseklikten aktarılarak köpük oluşumu ve kaymağa özgü gözenekli yapının oluşması sağlanır. Tavalar, kendi halinde bekletilerek 40-45 °C'ye kadar soğumaları sağlanır. Ardından, kısa süreli olarak 70-75 °C'ye kadar tekrar ısıtılan tavalar, soğuk bir odada 24 saat bekletilir ve kaymak tabakasının iyice şekillenmesi sağlanır. Tava yüzeyine küçük buz parçacıkları serpilerek kaymak keskin bıçakla dilimlenip lüle haline getirilerek paketlenir ve tüketiciye sunulur (Yılsay ve Bayizit, 2002).

**Modern yöntemler ile kaymak üretiminde** ise, ilk olarak gerekli fiziksel ve kimyasal kontrolleri yapılan süt, disk filtrelerden geçirilerek kaba fiziksel kirlilik unsurlarından, seperatörlerden geçirilerek ise daha küçük kirlilik unsurlarından arındırılır. Sonrasında, 60 °C' ye kadar ısıtılan sütün kaymak kısmı kaymak seperatörü yardımıyla süttten ayrılır. Elde edilen kaymak %60 süt yağı içerecek şekilde standardize edilir. Önce 90-95°C' de 3-5 dakikalık ısıtmayı takiben, 25-30 °C' ye kadar soğutularak pastörize edilir. Ardından uygun kaplara dolumu yapılarak 4-6 °C' ye kadar soğutulur ve 12 saat süreyle aynı sıcaklıkta dinlendirilip tüketici için satışa hazır hale getirilir (Batu ve ark., 2008 ).

Manda sütünden yapılan kaymak kahvaltılık olarak tüketilebildiği gibi, geleneksel tatlıların yanında ikram edilmekte, ayrıca, lokum yapımında da kullanılmaktadır (İpek ve Zorba, 2008).

## 1.2. *Escherichia coli*

İlk kez Alman bakteriyolog Teodor Escherich tarafından 1885'de diyareli bir çocuğun dışkılarından izole edilerek tanımlanmış ve *Bacterium coli commune* olarak adlandırılmış olan etkenin (Levine, 1987; Anon., 2014), *Escherichia coli* olarak isimlendirilmesi 1919'da Castelani ve Chalmers tarafından yapılmıştır (Ørskov, 1984).

İnsan ve sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal sisteminin kommensal bakterileri olan *E. coli*'ler dışkı kültürlerinden en çok izole edilen bakterilerdir (Holt ve ark., 1994; Willke, 2008). Kommensal flora bakterisi *E. coli*'lerin memelilerin bağırsaklarını tercih ederken, patojen *E. coli*'lerin ise bağırsak mukozasına penetre olup bağırsak epitelini aşarak dolaşım sistemine karıştığı, buradan da uygun doku ve organlara lokalize oldukları bilinmektedir (Holt ve ark., 1994; Quinn ve ark., 2004). Besin hijyeninde de indikatör mikroorganizma olarak kabul edilen ve gıdalarda bulunması fekal kontaminasyonun göstergesi olarak değerlendirilen *E. coli*'ler, bazı serotiplerinin insan ve hayvanlarda ölümcül infeksiyonlara neden olduğunun ortaya çıkmasıyla potansiyel patojenler olarak kabul edilmiştir (Nataro ve Kaper, 1998).

*E. coli*'ler, Bacteria aleminin, Proteobacteria bölümü, Gamma proteobacteria sınıfı, Enterobacteriales takımı, Enterobacteriaceae ailesi, *Escherichia* cinsi içerisinde yer alırlar (Anon., 2014). Etkenler, Gram negatif, düzgün çomak şeklinde, aerofilik ya da fakültatif anaerofilik özellikte, çoğunlukla hareketli ve sporsuz bakterilerdir (Holt ve ark., 1994; Quinn ve ark., 2004). *E. coli*; genel besiyerleri ile selektif ve diferansiyel besiyerlerinde 37 °C'de 24 saat içerisinde genellikle gözle görülebilir büyüklükte, düzgün kenarlı, S- tipli koloniler oluştururken, bazı suşların ise küçük ve kuru görünümlü R- tipli koloniler ile mukoid özellikteki koloniler meydana getirdiği de görülür. Genellikle, patojen olan bazı suşları kanlı agar da



hemoliz oluşturma yeteneğindedir. Etkenler, buyyonda 37 °C'de 18-24 saat içerisinde hafif bir bulanıklık oluşturarak ürer (Holt ve ark., 1994; Quinn ve ark., 2004; İzgür, 2006). Etkenlerin optimal üreme ısısı 37 °C olmasına rağmen 20-40 °C'de, optimal pH'sı 7-7,2 olmasına rağmen pH 5-8'de de üreyebilmektedirler (İzgür, 2006).

*E. coli*, genellikle glukoz, sukroz, laktoz, mannitol gibi bazı karbonhidratları asit ve gaz oluşturarak fermente etme özelliğine sahiptir. İndol ve Metil Red (MR) testleri pozitif, Voges Proskauer (VP), sitrat, üreaz ve hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) testleri ise negatif olan *E. coli*, sitratları da kullanamaz. Ayrıca oksidaz negatif olan *E. coli*, nitratları nitritlere indirgeme yeteneğine de sahiptir (Holt ve ark., 1994; Quinn ve ark., 2004; İzgür, 2006).

*E. coli*'nin antijenik yapısı oldukça komplike olup, bu yapılar özellikle patojen suşlarda önem taşımaktadır (İzgür, 2006). İlk kez 1921'de Dodgeon tarafından *E. coli* suşları arasındaki serolojik ilişkiler ortaya konmuş, daha sonra Lowel *E. coli*'nin kapsül antijeni ve somatik antijen olmak üzere iki çeşit antijeni olduğunu belirtmiş, 1943'de ise Kauffmann tarafından etkenin flagella antijeninin de olduğu gösterilmiştir. Kauffmann tarafından 1944'te, *E. coli*'lerin serolojik klasifikasyonu için günümüzde modifiye edilerek kullanılmakta olan Kauffman şeması oluşturulmuştur. Bu şemaya göre, *E. coli*'ler somatik "O" antijenlerine, flagellar "H" antijenlerine ve kapsüler "K" antijenlerine göre serotiplendirilmektedir (Nataro ve Kaper, 1998). Somatik "O" antijenine göre yaklaşık 160'dan fazla, kapsüler "K" antijenine göre 100'e yakın ve flagellar "H" antijenine göre de 60'a yakın serogrup olduğu tespit edilmiştir (Kuntz ve Kuntz, 1999; İzgür, 2006).

Günümüzde insan ve hayvanlarda, özellikle diyare ilişkili infeksiyonlara neden olan patojen *E. coli* suşları; biyokimyasal ve moleküler karakterleri, virulens özellikleri, patojenite mekanizmaları, ürettikleri toksin tipleri, neden oldukları klinik semptomlar, epidemiyolojik farklılıkları ve sahip oldukları O ve H antijenlerine göre; enteropatojenik (EPEC), enterotoksijenik (ETEC), enteroinvaziv (EIEC), enteroagregatif (EAaggEC), diffuz adherent (DAEC) ve enterohemorajik (EHEC)

olmak üzere altı grupta sınıflandırılmaktadır (Padhye ve Doyle, 1992; Nataro ve Kaper, 1998; Karmali ve ark., 2010; Kiranmayi ve ark., 2010). Ancak, tanımlanmış bu altı gruba ilave olarak bazı araştırmacılar tarafından Verotoksijenik (VTEC) ve/veya Şigatoksijenik (STEC) olarak da tanımlanan *E. coli* suşlarının, başka gruplar ile de ifade edilebilmesi, bu konudaki terminolojiyi karışık bir hale getirmektedir (Mainil, 1999). Patojen *E. coli* grupları ve bazı temel özellikleri Tablo 1.1.'de gösterilmiştir.



**Tablo 1.1.** Patojen *E. coli* grupları ve bazı önemli özellikleri (Mainil, 1999)

Patojen Grup	Özellikleri
Enteretoksijenik <i>E.coli</i> (ETEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Turist diyarelerin %50'sinden fazlasından sorumludur.</li> <li>En çok fekal materyalle bulaşmış sular, bu sularla temas eden çiğ sebzeler, çiğ süt ve peynirlerde bulunur.</li> <li>İnfeksiyon dozu <math>10^8</math>-<math>10^{10}</math>'dur.</li> <li>Isıya dirençli (heat stabil; HS) ve duyarlı (heat labil; HL) iki enteretoksini vardır.</li> <li>Isıya duyarlı enterotoksini <i>Vibrio cholerae</i> toksinine benzer.</li> </ul>
Enteropatojenik <i>E.coli</i> (EPEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Çocuklarda ishalin en önemli nedenlerindedir.</li> <li>İnfeksiyon dozu <math>10^6</math>-<math>10^{10}</math>'dur.</li> <li>İnce bağırsak epiteline yapışarak mikrovillusların tahribine neden olur. Bundan sorumlu olan yapı 'EPEC-adhezyon faktörü' olarak adlandırılır.</li> </ul>
Enteroinvazive <i>E.coli</i> (EIEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Shigella</i> dizanterisine benzer kanlı ishale neden olur.</li> <li>Kontamine gıdanın tüketilmesiyle M hücreleri ve makrofajlar ile mücadele ederek kolon epitelinin etkiler ve hücrelerin apoptozisine neden olur.</li> <li>İnfeksiyon dozu <math>10^6</math>-<math>10^8</math> arasındadır. Bu nedenle Shigellosisten farklıdır. Çünkü <i>Shigella</i>'lar <math>10^4</math>'ten az bakteri ile infeksiyon oluşturur.</li> </ul>
Enteroagregatif <i>E.coli</i> (EAaggEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tropikal ve subtropikal bölgelere seyahat eden kişilerde ve immun sistemi baskılanmış özellikle AIDS ile ilgili diyarelerde izole edilmektedir.</li> </ul>
Diffuz adherent <i>E.coli</i> (DAEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Daha önceleri EPEC grubunda yer almaktaydı.</li> <li>Diffuz adhezyon ile karakterize olup çocuklarda süreklilik gösteren diyarelere neden olmaktadır.</li> <li>Patogenezi tam olarak açıklanamamıştır.</li> </ul>
Enterohemorajik <i>E.coli</i> (EHEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Başlıca kaynak sığır olmakla birlikte diğer sıcakkanlı hayvanlarda da bulunabilir.</li> <li>Shiga toksine benzer Verotoksin üretirler.</li> <li>Enfeksiyon dozu <math>10^{1-2}</math> kob/g gibi çok düşük bir değerdir.</li> <li>Hemorajik kolitis, hemolitik üremik sendrom, trombotik trombositopenik purpura olmak üzere üç temel sendroma neden olur.</li> </ul>

### 1.2.1. Enterohemorajik *E. coli* O157:H7/H

Enterohemorajik *E. coli*'ler; alfa ve beta hemolizinlerden farklı yapıda ve enterohemolizin olarak isimlendirilmiş bir hemolizin üretebilen, bir kısmı tanımlanabilmiş çeşitli sitotoksinler (verositotoksin ya da Şiga toksin) sentezleyen ve bu sitotoksinlerle mikrovilluslarda bağlanma ve silinme (attaching/effacing-A/E) lezyonları olarak adlandırılan lezyonlara sebep olan suşlardır (Milon ve ark., 1999). EHEC grubu çok sayıda serotip içermekle birlikte, aralarında en önemlisi *E. coli* O157:H7/H serotipidir (Nataro ve Kaper, 1998; Karmali ve ark., 2010; Kiranmayi ve ark., 2010). Bu serotip, son yıllarda tüm dünyada gıda kaynaklı infeksiyonlara neden olan patojenler arasında en önemlilerinden birisi olarak kabul edilmekte ve halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlike olarak görülmektedir (Armstrong ve ark., 1996; Park ve ark., 1999; Bidet ve ark., 2005; Karmali ve ark., 2010; Ko ve ark., 2016).

İlk olarak 1975 yılında California'da kanlı diyare semptomu gösteren bir kadın hastadan izole edilen *E. coli* O157:H7 serotipinin (Watt, 1988; Padhye ve Doyle, 1992) önemli bir insan patojeni olarak kesin identifikasyonu, 1982 yılında Oregon (26 vaka) ve Michigan'da (21 vaka) yetersiz ısı işlem görmüş kontamine hamburgerlerin tüketilmesinden kaynaklanan gastroenteritis salgınlarında gerçekleştirilmiştir (Armstrong ve ark., 1999; Park ve ark., 1999; Karmali ve ark., 2010). O'Brien ve Laveck (1983) tarafından 1983 yılında Kuzey Amerika'da görülen bir HC salgınında Şiga toksin üreten *E. coli* O157:H7 salgından sorumlu primer etken olarak tanımlanmış, 1985'de Karmali ve ark. (1985) Şiga toksin üreten *E. coli*'lerin HUS ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştü, Scotland ve ark. (1983) tarafından ise *E. coli*'lerdeki Şiga toksin 1 (Stx1) ve Şiga toksin 2 (Stx2) sentezini kontrol eden genlerin varlığı gösterilmiştir. Salgınlarda izole edilen suşların, EIEC'ler gibi invazif özellikte olmadıkları, ETEC'ler gibi enterotoksinler sentezlemedikleri ve EPEC'lerin neden olduğu klinik belirtilerle benzerlik göstermediklerinin belirlenmesi üzerine (Sack, 1987), Levine (1987) tarafından bu yeni gastrointestinal *E. coli* grubunun EHEC olarak isimlendirilmesi önerilmiş ve kabul edilmiştir.

Serotipin kesin identifikasyonunun yapıldığı tarihten günümüze, dünyanın pek çok ülkesinde, başta hayvansal gıda kaynaklı infeksiyonlar olmak üzere, çok sayıda ölümlü sonuçlanan salgın ve bireysel vakalardan primer patojen olarak *E. coli* O157:H7/H izolasyonu gerçekleştirilmiş ve *E. coli* O157:H7/H serotipi giderek önem kazanmıştır (Wall ve ark., 1996; Michel ve ark., 1999; Jo ve ark., 2004; Ko ve ark., 2016).

*E. coli* O157:H7/H serotipi diğer *E. coli*'lerin kültürel identifikasyonunda kullanılan pek çok biyokimyasal teste benzer reaksiyon vermekle birlikte; sorbitolü fermente edememesi,  $\beta$ -glukuronidaz enzim aktivitesine sahip olmaması, 44,5 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda iyi üreyememesi, enterohemolizin üretimi ve 60 MDa'luk pO157 plazmidi taşıması gibi özellikleri ile diğer *E. coli*'lerden ayrılmaktadır (Smith ve Scotland, 1993; Halkman ve ark., 2001, Kehl, 2002; Karmali ve ark., 2010). Ancak, son yıllarda yapılan araştırmalarda atipik *E. coli* O157:H7/H olarak tanımlanan bazı suşların, özellikle sorbitolü fermente edebildiği de gösterilmiştir (Karch ve Bielewska, 2001; Bettelheim ve ark., 2002).

Optimum üreme pH'sı 7,2 ve optimum üreme ısı 37 °C olan *E. coli* O157:H7'nin, dondurulmuş ya da soğukta muhafaza edilen ürünler, düşük su aktivitesine sahip ürünler ve asidik özellikteki gıdalarda uzun süre canlılığını sürdürebildiği, pH'sı 4,5-5,5 aralığındaki bir ortamda aside adapte olarak direnç kazandığı belirtilmektedir (Doyle, 1991; Russell ve ark., 2000; Kehl, 2002; Tosun ve Gönül, 2003). Etkenin asidik ortama gösterdiği direncin, midenin kuvvetli asit ortamından rahatlıkla geçmesinde rol oynadığı düşünülmekte, pH'sı 1-2 olan insan midesinde yaklaşık üç saat süren sindirim sırasında canlı kalıp, buradan bağırsaklara geçmesi de bu görüşü desteklemektedir (Park ve ark., 1999; Russell ve ark., 2000; Kehl, 2002). Ayrıca, aside direnç, etkenin infektif dozunun çok düşük olmasına ( $10^0$ - $10^1$ ) neden olan bir faktör olarak değerlendirilmektedir (Griffin ve Tauxe, 1991; Park ve ark., 1999; Tosun ve Gönül, 2003).

*E. coli* O157:H7/H'nin **epidemiyolojisine** yönelik yapılan çalışmalarda, etkenin başlıca kaynağının sağlıklı ruminantlar, özellikle de sığırlar, olduğu, bu hayvanların dışkılarında yoğun oranda etkeni bulundurmalarından dolayı etkenin etrafa yayılmasında primer rezervuarlar görevi gördükleri kabul edilmektedir (Chapman ve ark., 1993b; Caprioli ve ark. 2005; Kiranmayi ve ark., 2010; Ko ve ark., 2016). Bununla birlikte, süt ineklerinin diğer ruminantlarla kıyaslandığında serotipi daha yüksek oranda taşıdığını bildiren görüşler de bulunmakta, ancak, süt ineklerinin bu patojenin ana kaynağı olup olmadığı, sütün sağım ya da nakliye sırasında kontamine olup olmadığı netlik taşımamaktadır (Wells ve ark., 1991; Garber ve ark., 1999). Etken sığır ve süt inekleri dışında sağlıklı koyun, keçi, manda, domuz, kedi, köpek, kanatlı hayvanlar, bizon, rengineyiği, ayı, yavru foklar ve penguenler gibi çok çeşitli hayvan türlerinden de izole edilebilmiş ve bu hayvanların da infeksiyonlar için rezervuar olabilecekleri belirtilmiştir (Beutin, 1999; Mainil, 1999; Wasteson ve ark., 1999; Li ve ark., 2004; Wales ve ark., 2005; Şeker ve ark., 2010; Persad ve LeJeune, 2014).

Direkt ya da dolaylı olarak etkeni taşıyan hayvanların dışkıları ile kontamine olmuş her türlü gıda maddesi ve sular, *E. coli* O157:H7/H infeksiyonları için potansiyel bir tehlike teşkil etmektedir (Samadpour ve ark., 1994; Rickert ve ark., 2000; Meyer-Broseta ve ark., 2001; Caprioli ve ark 2005). Epidemiyolojik veriler infeksiyonların büyük bir kısmının dışkı ile kontamine olmuş etlerin yeterince pişirilmeden tüketilmesi ve pastörize edilmemiş çiğ sütlerin tüketilmesi ile ilişkili olarak sığır ve süt ineği orijinli gıdalar aracılığı ile oluştuğunu göstermektedir (Riley ve ark., 1983; Chapman ve ark., 1993a; Park ve ark., 1999; Karmali ve ark., 2010). *E. coli* O157:H7/H serotipi ile süt inekleri ve çiğ ya da pastörize süt tüketimine bağlı salgınlar arasındaki ilişki, süt endüstrisi açısından önem taşımaktadır (Upton ve Coia, 1994). Etkenin insanlara bulaşmasında çiğ sütün bir aracı olabileceği, ilk kez 1986'da Wisconsin'deki bir süt çiftliğinde çiğ süt tüketen çocuklarda HC ve HUS'un belirlenmesiyle gösterilmiştir (Massa ve ark., 1999). İnfekte hayvanlar veya bunların dışkıları ile direkt temas (Griffin ve Tauxe, 1991; Locking ve ark., 2001) ile infekte insanlarla direkt temas da diğer bulaşma kaynakları olarak bilinmektedir (Dorn, 1995; Mead ve Griffin, 1998).

EHEC O157:H7/H<sup>-</sup> suşlarının neden olduğu infeksiyonların **patogenezinde** rol alan en önemli virülans faktörleri:

- Şiga toksin 1 ve 2 (Stx 1 ve Stx 2),
- Yeni tip hemolizin olarak tanımlanan enterohemolizin,
- Konak hücreye bağlanmadan sorumlu, dış membran proteini intimin,
- Enterohemolizinin kodlanmasından sorumlu pO157 plazmidi,
- Tip III sekresyon sistemi tarafından salınan proteinler,
- Hücre duvarı lipopolisakkariti olarak bilinmektedir (Mainil, 1999; Park ve ark., 1999; Donnenberg ve Whittam, 2001; Eklund, 2005; Mora ve ark., 2005; Karmali ve ark., 2010).

*E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> serotipi *Shigella dysenteriae* tip-1 tarafından sentezlenen Şiga toksinlere benzerliği nedeniyle, ilk olarak 1977'de literatüre geçmiş ve Şiga benzeri toksin (SLT) olarak isimlendirilmiş sitotoksinler (SLT-1, SLT-2) sentezler. Günümüzde SLT isimlendirmesi yerini, Şiga toksinler (Stx1, Stx2) ya da Vero hücreleri (Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri) için sitotoksik etkisinden dolayı Verotoksinler/Verositotoksinler (VT1, VT2) terimlerine bırakmıştır (Mainil, 1999; Donnenberg ve Whittam, 2001; Karmali ve ark., 2010; Bergan ve ark., 2012). Biyokimyasal özellikleri bakımından benzerlik, serolojik olarak farklılık gösteren bu Şiga toksinler (Stx1, Stx2), 33 kDa'luk bir A alt birimi ve her biri yaklaşık 7,7 kDa olan pentamer yapıda bir B alt biriminden oluşmaktadır. Biyolojik aktiviteden sorumlu molekül olan A alt birimi, 28S ribozomal RNA'daki (rRNA) protein sentezini inhibe eden bir aminoglikosidazdır ve proteoliz sonucunda büyük N-terminal A1 (enzimatik aktiviteyi gerçekleştiren) ve C-terminal A2 fragmentlerine ayrılır. B alt birimi ise, konakçı böbrek korteksinde bolca bulunan ve Şiga toksin reseptörü olan glikolipid globotriyoskleramide (Gb<sub>3</sub>), toksinin bağlanmasından sorumludur. Toksinin B alt biriminin hücrelerdeki bu reseptöre bağlanarak içeri girdikten sonra, A alt biriminin enzimatik olarak A1 fragmentine indirgendiği, bu fragmentin de daha sonra 28S rRNA'daki protein sentezini inhibe ettiği ve apoptozis yoluyla hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir (Paton ve Paton, 1998; Park ve ark., 1999; Donnenberg ve Whittam, 2001; Bergan ve ark., 2012). Kolonda aktif olan bu toksinlerin, insanlarda diyarenin şekillenmesinde primer faktör olmadıkları,

ancak, endotelial hücelere bağlanarak özellikle HC durumunda kanamanın şekillenmesi ve HUS'un gelişmesinde etkin oldukları kabul edilmektedir (Mainil, 1999; Bergan ve ark., 2012). İnsan ve hayvan orijinli klinik izolatlarda farklı Şiga toksin tipleri ve varyantlarının varlığı bildirilmiştir (Mohammad ve ark., 1985; Wall ve ark., 1996; Bidet ve ark., 2005; Şeker ve ark., 2010; Bergan ve ark., 2012; Akiyama ve ark., 2016).

Beutin ve ark. (1988) tarafından 1988'de tespit edilen ve yeni tip hemolizin olarak kabul edilen enterohemolizinin, diğer *E. coli*'lerden farklı olarak Şiga toksin üreten *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> serotipleri tarafından oluşturulduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda Şiga toksin ve enterohemolizin üretimi arasında sıkı bir ilişki olduğuna dikkat çekilmekte ve bunun, Şiga toksin üreten *E. coli* suşlarının hızlı saptanmasında bir gösterge olabileceği bildirilmektedir (Beutin ve ark., 1989; Cookson ve ark., 2007; Karmali ve ark., 2010). Enterohemolizinin infeksiyonların patogenezindeki rolü hala açıklık kazanmamasına rağmen, enterositlerin ve özellikle sığır lökositlerinin lizisine yol açtığı düşünülmektedir (Schmidt ve ark., 1995; Bauer ve Welch, 1996; Zhang ve ark., 2012).

Enterosit silinme lokusu (LEE) olarak adlandırılan 43-kb'lık patojenite adasında yer alan *eae* (*E. coli* bağlanma ve silinme) geni tarafından kodlanan, 94-97 kDa'luk bir dış membran proteini olan intimin, *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> infeksiyonlarının patogenezinde önemli role sahip bir diğer virulens faktörüdür (Kaper ve ark., 1998; Park ve ark., 1999; Judge ve ark., 2004). Etken; konakçı bağırsağında enterositlerin membranlarına yapışmakta ve mikrovilluslar ile stoplazma kayıplarına neden olmaktadır. *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> ile infekte hastalarda görülen bu lezyonlar "bağlanma ve silinme (A/E) lezyonları" olarak adlandırılmaktadır. İntestinal kolonizasyon ve bu lezyonların şekillenmesinde intiminin önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (Kaper ve ark., 1998; Mainil, 1999; Judge ve ark., 2004). Gnotobiyotik domuz yavruları, infant tavşanlar, neonatal buzağlar ve bir günlük civcivler gibi birçok hayvanda ve ayrıca *in vitro* memeli hücre kültürü modellerinde EHEC suşlarının A/E aktivitesi gösterilmiştir. İnce barsağın proksimal kısmı ve kalın barsağa kolonize olan EPEC suşlarının aksine EHEC suşları, kolon ve terminal



ileumdaki yüzey ve glandüler epitel hücrelerinde tipik lezyonlar oluştururlar (Whipp ve ark., 1994; Dean-Nystrom ve ark., 1997; Judge ve ark., 2004) .

EHEC O157:H7/H<sup>-</sup> suşlarının büyük bir kısmında, varlığı ilk olarak 1990 yılında gösterilen 60 MDa'luk pO157 plazmidi bulunmaktadır. Enterohemolizinin de içinde olduğu, katalaz peroksidaz, serin proteaz ve bir Tip II sekresyon sistemi gibi çeşitli potansiyel virulens faktörleri bu plazmid tarafından kodlanmaktadır (Schmidt ve ark., 1995; Park ve ark., 1999). pO157 plazmidinin EHEC infeksiyonlarının patogenezindeki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, yapılan çalışmalarda fimbrianın epitel hücrelerine adhezyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir (Schmidt ve ark., 1995; Nataro ve Kaper, 1998; Law, 2000).

Pek çok Gram negatif bakteride bulunan Tip III sekresyon sistemi aracılığıyla salınan Esps (*E. coli*-secreted proteins) gibi bazı immunreaktif proteinlerin *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> tarafından da salındığı bildirilmiştir. Bu immunreaktif proteinlerin tipik A/E lezyonlarının şekillenmesi için gerekli sinyal transdüksiyonunda rol aldığı belirtilmektedir. Tip III sekresyon sistemi bu proteinlerin sitoplazmadan direkt olarak hücre yüzeyine taşınmasında görev almaktadır (Park ve ark., 1999; Law, 2000).

*E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> serotipi de, tüm diğer Gram negatif bakterilerde de bulunan tipik lipopolisakkarit yüzey yapısına sahiptir. Somatik antijen ya da “O” antijeni olarak bilinen lipopolisakkarit, lipid A ve O polisakkaritinden oluşmaktadır. Serotipin antijenik determinantı olarak kabul edilen O polisakkaritinin, *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup>'nin konak epitel hücrelerine adezyonunda önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir (Park ve ark., 1999; Law, 2000).

*E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> serotipiyle doğal veya deneysel yolla infekte hayvanların büyük çoğunluğunda tipik **klirik bulgulara** rastlanılmadığı, çok azında geçici ve hafif bir ishal gözlenebildiği belirtilmekte, bu nedenle de primer rezervuarlar olarak kabul edilen sığırlar ve bu serotipin izole edildiği diğer hayvanların, *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> infeksiyonlarına dirençli oldukları, etkenin bu hayvanlar için, genellikle, patojenik olmadığı bildirilmektedir (Cody ve ark., 1999; Mainil, 1999; Syngé, 2000;

Wray ve ark., 2000). Dean-Nystrom ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada da, *E. coli* O157:H7'nin üç haftalıktan büyük buzağular için patojenik olmadığı vurgulanmıştır. Cray ve Moon (1995), sağlıklı yetişkin sığırlar için infeksiyöz dozun oldukça yüksek olduğunu, *E. coli* O157:H7'nin fekal saçılımının, buzağularda yetişkin sığırlara göre daha uzun süre devam ettiği ve serotiple infekte pek çok yetişkin sığırın klinik belirti göstermediğini belirtmiştir.

Gıda kaynaklı en önemli bakteriyel zoonotik ajanlardan olan *E. coli* O157:H7/H serotipi; insanlarda HC, kanlı veya kansız diyare, HUS ve TTP olarak tanımlanan ciddi ve çoğu kez letal etkili infeksiyonlara neden olmaktadır (Padhye ve Doyle, 1992; Coia, 1998; Nataro ve Kaper, 1998; Park ve ark., 1999). HC; her yaştaki bireylerde ani olarak ortaya çıkan kramplı karın ağrıları ve bunu izleyen 24-48 saat içerisinde gelişen sulu diyare ile karakterizedir. Diyarenin şiddeti arttıkça dışkıdaki kan miktarı artmakta ve dışkı zamanla tümüyle kanlı hale gelmektedir. HC, etkilenen insanlarda ateşin görülmemesi ve dışkıda fazla miktarda kan bulunması ile, Şigelloziste ve EIEC'lerin neden olduğu gastroenteritislerde tanımlanan tipik belirtilerden ayrılmaktadır (Padhye ve Doyle, 1992; Coia, 1998; Park ve ark., 1999). HUS; özellikle küçük yaştaki çocuklarda ve gençlerde akut renal yetmezlik, mikroanjyopatik hemolitik anemi ve trombositopeni ile karakterize edilen üçlü bir sendrom olarak ortaya çıkar (Coia, 1998; Nataro ve Kaper 1998). Ayrıca hastalarda ölümle sonuçlanabilen kalp yetmezliği, koma, hipertansif ensefalopati gibi kardiyovasküler ve merkezi sinir sistemi bozuklukları gelişebilir. *E. coli* O157:H7/H'nin Şiga toksinlerinin endotel hücrelerine zarar vererek böbrek ve diğer organlardaki kapillarlarda mikrotrombuslara yol açtığı ve bu şekilde HUS'un patogenezinde rol aldığı düşünülmektedir. (Padhye ve Doyle, 1992; Coia, 1998; Park ve ark., 1999). Klinik bulguları açısından HUS'a benzerlik gösteren ve genellikle yetişkinlerde görülen TTP'da ise; merkezi sinir sistemi bozuklukları daha temel bir özellik olup, mikroanjyopatik hemolitik anemi, trombositopeni, ateş ve azotemi gibi bulgularla karakterizedir. Ayrıca beyin kanaması sonucu çoğunlukla ölüm görülür (Padhye ve Doyle, 1992; Nataro ve Kaper 1998; Park ve ark., 1999).

*E. coli* O157:H7 serotipinin çeşitli gıdalar, fekal numuneler ve diğer klinik ve çevresel örneklerde aranması ve **teşhisine** yönelik farklı yöntemler kullanılmakta, teşhisde önerilen standart bir prosedür bulunmamaktadır. Teşhis amaçlı kullanılan yöntemler genellikle, serotipin biyokimyasal özelliklerine dayanan kültürel yöntemler ve Şiga toksinlerin neden olduğu sitotoksik etkilerin gösterilmesine dayanan biyolojik testler, Şiga toksinlere, O157 ve H7 antijenlerine karşı monoklonal ve poliklonal antikörlerin kullanıldığı immunokimyasal yöntemler ve virulens genlerinin tespitine dayanan moleküler yöntemleri kapsamaktadır (Karch ve ark., 1999; Tutenel ve ark., 2003; Karmali ve ark., 2010; Rantsiou ve ark., 2012; Farrokh ve ark., 2013).

*E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> infeksiyonlarında **sağaltım** amaçlı antibiyotiklerin kullanımı konusunda farklı görüşler bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar tarafından infeksiyonda antibiyotik kullanımının Şiga toksin genlerinin *in vivo* ekspresyonunu artırarak HC ve HUS'un gelişimini şiddetlendirdiği vurgulanmaktadır (Wong ve ark., 2000; Zhang ve ark., 2000). Buna ilave olarak, CDC'nin (Centers for Disease Control and Prevention, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri) 2002 raporuna göre farklı kaynaklardan izole edilmiş *E. coli* O157 suşlarının %10'unun bir ya da daha fazla antibiyotiğe dirençli olduğu, %7'sinin ise çoklu antibiyotik direnci gösterdiği bildirilmiştir (Schroeder ve ark., 2002). Buna kaşın bazı araştırmacılar, infeksiyonun erken dönemlerinde kullanılan ve etkenlerin henüz dirençli olmadıkları bazı antibiyotiklerin HUS'un ilerlemesini önlediğini bildirmektedir (Ikeda ve ark., 1999; Shiomi ve ark., 1999).

*E. coli* O157:H7 infeksiyonlarından **korunma** amaçlı etkenin inhibisyonu için çeşitli kimyasallar kullanılmakta, bunlardan klor, özellikle içme ve kullanma suları için uygun bulunurken, çeşitli dezenfektanların da organik asitlere göre daha etkili olduğu belirtilmektedir (Mead ve Griffin, 1998; Gannon, 1999; Karmali ve ark., 2010). Genel hijyenik kurallara uyulması da infeksiyonlardan korunmada önem taşımaktadır. Bu amaçla başta kesimhane ve mezbahalar olmak üzere tüm gıda üretimi ve işlenmesi ile ilgili yerlerin, fekal kontaminasyon ve bir gıdadan diğerine kros kontaminasyon riskinin azaltılması amacıyla sanitize edilmeleri önerilmektedir.

Karkasların su veya uygun solüsyonlarla yıkanmasının da fekal materyallerin uzaklaştırılmasında bir dereceye kadar da olsa etkili olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, özellikle, çiftlik hayvanları yetiştiriciliği yapılan yerlerde periyodik olarak hayvanlardan dışkı örneği alınarak, *E. coli* O157:H7/H'ye yönelik izolasyon ve fekal saçılım taramaları yapılması önerilmektedir (Gannon, 1999).



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. Örneklerin Toplanması

Çalışma, Afyonkarahisar'a bağlı çeşitli merkez ve çevre ilçe ve köy halk pazarlarında ev yapımı ve ticari firmalar tarafından paketlenmiş olarak satışa sunulan Afyon kaymakları örneklenerek yürütüldü. Bu amaçla, Şubat-Nisan 2016 tarihleri arasında aseptik koşullarda her hafta 10 adet olacak şekilde toplam 100 adet kaymak numunesi toplanarak soğuk zincirde Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Örneklenen kaymak numunelerinin 32'si inek ve manda sütü (karışık), 57'si inek sütü, 11'i ise manda sütü orijinliydi. Yüz adet kaymak numunesinin 69'unu ev yapımı kaymaklar oluştururken, 31'ini ticari firmalar tarafından paketlenmiş halde satışa sunulan kaymaklar oluşturdu. Kaymak örneklerinin toplandığı yerler, örneklerin orijini ve üretim tipi Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

#### 2.1.2. Standart suşlar

*E. coli* O157:H7 EDL931 pozitif kontrol suşu, *E. coli* ATCC 25922 ise negatif kontrol suşu olarak kullanıldı.

**Tablo 2.1.** Kaymak örneklerinin toplandığı yerler, örneklerin orijini ve üretim tipi

ÖRNEK NO	ÖRNEKLERİN TOPLANDIğI YER	ÖRNEKLERİNİN ORİJİNİ	ÜRETİM TİPİ (TİCARİ/EV)
1	EŞREFPAŞA	KARIŞIK	TİCARİ
2	BEYYAZI	KARIŞIK	TİCARİ
3	SUSUZ	İNEK	TİCARİ
4	BEYYAZI	İNEK	EV
5	KÜÇÜKÇOBANLAR	KARIŞIK	EV
6	KÜÇÜKÇOBANLAR	MANDA	EV
7	BEYYAZI	KARIŞIK	EV
8	AKÇİN	MANDA	EV
9	BEYYAZI	İNEK	EV
10	BEYYAZI	KARIŞIK	TİCARİ
11	ŞUHUT-ÇAKIROZÜ	İNEK	EV
12	AKÖREN	İNEK	EV
13	AKÖREN	İNEK	EV
14	KÜÇÜKÇOBANLAR	İNEK	EV
15	AKÖREN	İNEK	EV
16	BEYYAZI	İNEK	EV
17	KÜÇÜKÇOBANLAR	KARIŞIK	EV
18	AKÖREN	İNEK	EV
19	AKÖREN	İNEK	EV
20	AKÖREN	İNEK	EV
21	AKÖREN	İNEK	EV
22	AKÖREN	İNEK	EV
23	KÜÇÜKÇOBANLAR	KARIŞIK	EV
24	KÜÇÜKÇOBANLAR	İNEK	EV
25	SEYDİLER	İNEK	EV
26	KÜÇÜKÇOBANLAR	MANDA	EV
27	BEYYAZI	İNEK	EV

**Tablo 2.1.** Devam.

28	SUSUZ	KARIŞIK	TİCARİ
29	BEYYAZI	İNEK	TİCARİ
30	ÇOBANLAR	İNEK	EV
31	SUSUZ	İNEK	EV
32	SÜLÜN	İNEK	EV
33	SÜLÜN	KARIŞIK	TİCARİ
34	SÜLÜN	KARIŞIK	TİCARİ
35	SÜLÜN	KARIŞIK	TİCARİ
36	SÜLÜN	İNEK	TİCARİ
37	AKÇİN	KARIŞIK	TİCARİ
38	AKÇİN	MANDA	EV
39	AKÇİN	MANDA	EV
40	AKÇİN	MANDA	EV
41	AKÇİN	MANDA	EV
42	AKÇİN	İNEK	EV
43	ERKMEN	İNEK	EV
44	ERKMEN	İNEK	EV
45	ERKMEN	İNEK	EV
46	ERKMEN	İNEK	EV
47	ERENLER	İNEK	EV
48	ERENLER	İNEK	EV
49	ERENLER	İNEK	EV
50	ERENLER	İNEK	EV
51	AKÖREN	İNEK	EV
52	ÇOBANLAR	İNEK	EV
53	BEYYAZI	KARIŞIK	TİCARİ
54	BEYYAZI	KARIŞIK	TİCARİ
55	BEYYAZI	KARIŞIK	TİCARİ

**Tablo 2.1.** Devam.

56	BEYYAZI	KARIŞIK	TİCARİ
57	BEYYAZI	KARIŞIK	TİCARİ
58	BEYYAZI	KARIŞIK	TİCARİ
59	BEYYAZI	KARIŞIK	TİCARİ
60	BEYYAZI	KARIŞIK	TİCARİ
61	ÇAYIRBAĞ	İNEK	EV
62	ÇAYIRBAĞ	İNEK	EV
63	ÇAYIRBAĞ	İNEK	EV
64	ÇAYIRBAĞ	KARIŞIK	TİCARİ
65	BALMAHMUT	KARIŞIK	EV
66	BALMAHMUT	KARIŞIK	EV
67	BALMAHMUT	İNEK	TİCARİ
68	AKÇİN	İNEK	EV
69	SALAR	İNEK	EV
70	AKÇİN	İNEK	EV
71	AKÇİN	İNEK	EV
72	SUSUZ	İNEK	EV
73	YAYLABAĞI	İNEK	EV
74	YAYLABAĞI	İNEK	EV
75	YAYLABAĞI	İNEK	EV
76	GAZLIGÖL	MANDA	TİCARİ
77	GAZLIGÖL	KARIŞIK	TİCARİ
78	GAZLIGÖL	KARIŞIK	TİCARİ
79	GAZLIGÖL	KARIŞIK	TİCARİ
80	İSMAİLKÖYÜ	İNEK	EV
81	İSMAİLKÖYÜ	İNEK	EV
82	İSMAİLKÖYÜ	İNEK	EV
83	İSMAİLKÖYÜ	İNEK	EV



**Tablo 2.1.** Devam.

84	İSMAİL KÖYÜ	İNEK	EV
85	İŞIKLAR	İNEK	EV
86	İŞIKLAR	MANDA	EV
87	GEBECELER	İNEK	EV
88	GEBECELER	MANDA	EV
89	MURATLAR KÖYÜ	MANDA	EV
90	MURATLAR KÖYÜ	İNEK	EV
91	MURATLAR KÖYÜ	İNEK	EV
92	EŞREFFAŞA	KARIŞIK	TİCARİ
93	SUSUZ	KARIŞIK	TİCARİ
94	AKÇİN	KARIŞIK	TİCARİ
95	BEYYAZI	İNEK	EV
96	BEYYAZI	İNEK	EV
97	KÜÇÜKÇOBANLAR	İNEK	EV
98	AKÇİN	KARIŞIK	TİCARİ
99	AKÇİN	KARIŞIK	TİCARİ
100	BEYYAZI	KARIŞIK	TİCARİ

**2.1.3. Besiyerleri, Solüsyonlar, İdentifikasyon Kitleri ve Antibiyotik Diskleri:**

Modifiye Tryptone Soy Broth (mTSB) (Oxoid, İngiltere)

Novobiocin supplement (Oxoid, İngiltere)

Sorbitol MacConkey agar (SMAC) (Oxoid, İngiltere)

Cefixime-Tellurite supplement (Oxoid, İngiltere)

Trypticase Soy agar (TSA) (Oxoid, İngiltere)

Gram boyama solüsyonları

Oksidaz test kiti (Oxoid, İngiltere)

Kovaks ayırıcı (Sigma-Aldrich, ABD)

Metil red (MR)-Voges Prouskauer (VP) broth (Merck, Almanya)

Metil red ayırıcı (Sigma-Aldrich, ABD)

Potasyum hidroksit (%40) (Remel, ABD)  
Alfa naftol (%5) (Remel, ABD)  
Simmon Sitrat agar (Oxoid, İngiltere)  
Triple Sugar Iron agar (TSI, Oxoid, İngiltere)  
Sellobiyoz (Sigma-Aldrich, ABD)  
Urea broth base (Oxoid, İngiltere)  
Trypticase Soy Broth (TSB, Oxoid, İngiltere)  
*E. coli* O157 lateks test kit (Oxoid, İngiltere)  
*E. coli* H7 antiserumu (Denka Seiken, Japonya)  
Mueller Hinton agar (MHA, Oxoid, İngiltere)  
Steril gliserin  
Amoksisilin+klavulanik asit (30µg) (Oxoid, İngiltere)  
Ampisilin (10µg) (Oxoid, İngiltere)  
Sefalotin (30µg) (Oxoid, İngiltere)  
Sefazolin (30µg) (Oxoid, İngiltere)  
Sefoksitin (30µg) (Oxoid, İngiltere)  
Seftiofur (30µg) (Oxoid, İngiltere)  
Sefriakson (30µg) (Oxoid, İngiltere)  
Enrofloksasin (5µg) (Oxoid, İngiltere)  
Gentamisin (10µg) (Oxoid, İngiltere)  
Kanamisin (10µg) (Oxoid, İngiltere)  
Streptomisin (10µg) (Oxoid, İngiltere)  
Siprofloksasin (5µg) (Oxoid, İngiltere)  
Nalidiksik asit (30µg) (Oxoid, İngiltere)  
Tetrasiklin (30µg) (Oxoid, İngiltere)  
İmipenem (10µg) (Oxoid, İngiltere)  
Trimetoprim+sulfametoksazol (25µg) (Oxoid, İngiltere)

#### **2.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PZR) Kullanılan Buffer, Solüsyon, Ekipman ve Cihazlar**

Tris-Borate-EDTA Buffer 10X (10X TBE Buffer) (Fermentas, Litvanya)

Ethidium bromid solüsyonu (AppliChem, Almanya)  
Agaroz (Basica Le Agarose, Prona, Fransa)  
Primerler (ThermoFisher Scientific, Almanya)  
10X PCR buffer (Fermentas, Litvanya)  
dNTP mix (Fermentas, Litvanya)  
MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Litvanya)  
Taq DNA Polymerase (Fermentas, Litvanya)  
DNA ladder (GeneRuler™ 100 bp DNA ladder, Fermentas, Litvanya)  
6XLoading dye (Fermentas, Litvanya)  
Vorteks (Ika, Almanya)  
Soğutmalı santrijüj (Sigma, Almanya)  
Hassas terazi (Ohaus-Pioneer, İsviçre)  
Thermal cyclers (Techne TC-Plus, İngiltere)  
Elektroforez güç kaynağı (Thermo Scientific, ABD)  
Jel elektroforez cihazı (Thermo Scientific, ABD)  
UV-transilluminatör (Vilber Lourmat, Avustralya)

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Kaymak Örneklerinden *E. coli* O157:H7 İzolasyon ve İdentifikasyonu

Soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılan her bir kaymak numunesi öncelikle kendi kabı içerisinde karıştırılarak homojenize edildi. Ön zenginleştirme amacıyla her bir numuneden 10 gram alınarak, içerisinde 20mg/l novobiocin (Oxoid, İngiltere) içeren 90 ml modifiye Tryptone Soy Broth (mTSB, Oxoid, İngiltere) içerisine aktarıldı. Örnekler vortekslenerek 37 °C'de aerobik koşullarda 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda her bir ön zenginleştirme sıvısından bir öze dolusu alınarak, Cefixime-Tellurite (C-T, Oxoid, İngiltere) ilave edilmiş 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-glucuronic acid (BCIG) içeren Sorbitol MacConkey agara (SMAC, Oxoid, İngiltere) ekim yapıldı. Petrilerin, 37 °C'de aerobik koşullarda 24 saat inkübasyonunu takiben, sorbitol fermentasyonu ve β-glukuronidaz enzim aktivitesi negatif renksiz koloniler

şüpheli olarak değerlendirildi ve Trypticase Soy agarda (TSA, Oxoid, İngiltere) pasajları yapıldı. Şüpheli olarak kabul edilen izolatların Gram boyaması yapılarak, Gram negatif çomak şeklindeki izolatlara hareket muayanesi, oksidaz, indol, metil red (MR), Voges Prouskauer (VP), sitrat, üreaz, triple sugar iron (TSI) agarda glukoz, sukroz, laktoz fermentasyonu ile serotipin *Escherichia hermannii*'den ayırımında kullanılan sellobiyoz fermentasyon testleri uygulandı (Şeker ve Yardımcı, 2008). Oksidaz, VP, sitrat, üreaz ve sellobiyoz negatif, indol, MR, TSI agarda glukoz, sukroz, laktoz fermentasyonları pozitif izolatların serolojik doğrulaması amacıyla ise, izolatlara O157 ve H7 antiserumları ile aglutinasyon testleri yapıldı. Somatik O157 antijeninin belirlenmesinde O157 Lateks Test kiti (Oxoid, İngiltere) kullanıldı ve ticari firmanın önerdiği şekilde uygulandı. Flagellar H7 antijeninin belirlenmesinde ise *E. coli* H7 antiserumu (Denka Seiken, Japonya) ile lam aglutinasyon testi yapıldı. Tüm uygulamalarda *E. coli* O157:H7 EDL931 suşu pozitif kontrol suşu, *E. coli* ATCC 25922 negatif kontrol suşu olarak kullanıldı. *E. coli* O157:H7/H<sup>+</sup> olarak izole ve identifiye edilen suşlar, daha sonra DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere, %15 oranında gliserin içeren Trypticase soy broth (TSB, Oxoid, İngiltere) içerisinde -20 °C'de muhafaza edildi.

## **2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

### **2.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu**

Pozitif (*E. coli* O157:H7 EDL931) ve negatif (*E. coli* ATCC 25922) kontrol suşları ile birlikte, bu çalışmada elde edilen tüm test izolatlarından DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla, kontrol suşları ve izolatların TSA'da (Oxoid, İngiltere) üremiş taze ve saf kolonilerinden birer adet seçilerek, koloniler 500 µl steril distile su içeren ependorflar (DNase-RNase free) içerisinde süspansiyon edildi. Süspansiyon, 100 °C'lik su banyosunda 10 dakika bekletildikten sonra 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bakteriyel DNA içeren süpernatant alınarak, PZR karışımında kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

### 2.2.2.2. *Stx1*, *Stx2*, *ehlyA* ve *eaeA* Genleri İçin Amplifikasyon Koşulları

Çalışmada, *Stx1* ve *Stx2* genleri için Otawa ve ark. (2004), *ehlyA* ve *eaeA* genleri için ise Osek (2003) tarafından önerilen oligonükleotid primerleri kullanıldı. *Stx1*, *Stx2* ve *ehlyA* genlerinin belirlenmesinde multipleks PZR, *eaeA* geninin belirlenmesinde ise tekli PZR protokolleri kullanıldı. Kullanılan primerlere ait nükleotid sekansları Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.2.** Kullanılan primerlere ait oligonükleotid sekansları ve bant büyüklükleri

Hedef genler		Oligonükleotid sekansları (5'-3')	Bant büyüklüğü (bç)
<i>Stx1</i>	Forward	TGTAAGTGGAAAGGTGGAGTATACA	210
	Reverse	GCTATTCTGAGTCAACGAAAATAAC	
<i>Stx2</i>	Forward	GTTTTTCTTCGGTATCCTATTCC	484
	Reverse	GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC	
<i>ehlyA</i>	Forward	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534
	Reverse	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	
<i>eaeA</i>	Forward	GGGATCGATTACCGTCAT	837
	Reverse	TTTATCAGCCTTAATCTC	

Final hacmi 50 µl olacak şekilde; 2 U Taq DNA polimeraz enzimi (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 5 µl 10X PCR buffer, 2,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mmol/l her bir dNTP, 0,25 µmol/l her bir primer ve deiyonize su içeren PZR karışımı hazırlandı. Çalışılacak izolat sayısına göre hazırlanan PZR karışımından, mini PZR tüplerine (DNase-RNase free) 48'er µl dağıtılarak, her birinin üzerine 2 µl hedef DNA ilave edildi. Tamamlanan reaksiyon karışımları için uygulanan amplifikasyon koşulları Tablo 2.3'te gösterilmiştir. Elde edilen amplifikasyon ürünleri (*Stx1* 210 bç, *Stx2* 484 bç, *ehlyA* 534 bç ve *eaeA* 837 bç), ethidium bromid (5 µg/ml) boyanmış % 1,5'lük agaroz jelde, sabit akımda 100 voltta 70 dakika elektroforeze tabi tutuldu ve UV-transilluminatörde görüntülendi.

**Tablo 2.3.** *Stx1*, *Stx2*, *ehlyA* ve *eaeA* genleri için uygulanan amplifikasyon koşulları

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık		Süre	
		<i>Stx1</i> , <i>Stx2</i> , <i>ehlyA</i>	<i>eaeA</i>	<i>Stx1</i> , <i>Stx2</i> , <i>ehlyA</i>	<i>eaeA</i>
Ön Denaturasyon	1	95 °C	95 °C	4 dk	4 dk
Denaturasyon	30	95 °C	95 °C	30 sn	30 sn
Bağlanma		57 °C	45 °C	30 sn	1 dk
Uzama		72 °C	72 °C	30 sn	1 dk
Son uzama	1	72 °C	72 °C	7 dk	7 dk

### 2.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Pozitif ve negatif kontrol suşları ile tüm test suşlarının antibiyotik dirençlilikleri Mueller Hinton agarda (Oxoid, İngiltere) Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi (CLSI, 2013). Bu amaçla, amoksisilin+klavulanik asit (30µg), ampisilin (10µg), sefalotin (30µg), sefazolin (30µg), sefoksitin (30µg), seftiofur (30µg), seftriakson (30µg), enrofloksasin (5µg), gentamisin (10µg), kanamisin (30µg), streptomisin (10µg), siprofloksasin (5µg), nalidiksik asit (30µg), tetrasiklin (30µg), imipenem (10µg) ve trimetoprim+sulfametoksazol (25µg) antibiyotik diskleri (Oxoid, İngiltere) kullanıldı.

Taze buyyon kültürlerinin yoğunlukları McFarland No. 0,5'e göre ayarlandıktan sonra, kültürler steril cam bagetler yardımıyla Mueller Hinton agara (Oxoid, İngiltere) yayma yöntemi ile inokule edildi. Antibiyotik diskleri agar yüzeyine yerleştirildikten sonra, petriyerler 37 °C'de aerobik koşullarda 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben, elde edilen zon çaplarının değerlendirilmesi Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2013) standartlarına göre yapıldı.

### 3. BULGULAR

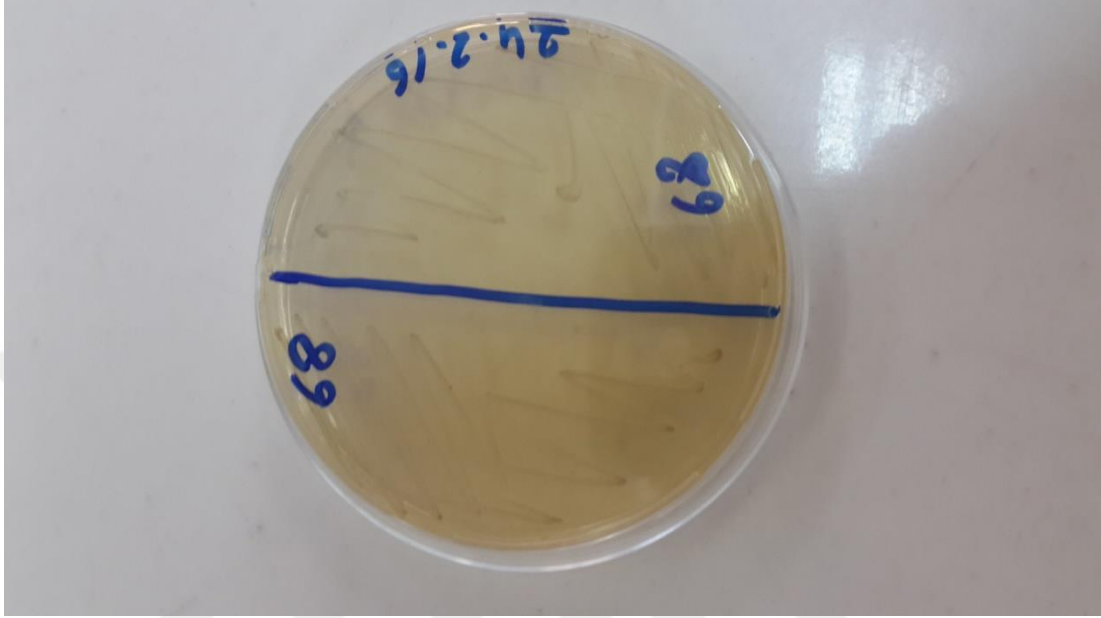
#### 3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Çalışmada, Afyonkarahisar'a bağlı çeşitli merkez ve çevre ilçe ve köy halk pazarlarında ev yapımı ve ticari firmalar tarafından paketlenmiş olarak satışı sunulan toplam 100 adet kaymak örneği toplandı. Ön zenginleştirmeyi takiben, örneklerden *E. coli* O157 izolasyonu amacıyla kullanılan C-T ilaveli BCIG içeren SMAC agardaki sorbitol fermentasyonu ve  $\beta$ -glukuronidaz enzim aktivitesi negatif, renksiz, şüpheli kolonilere uygulanan biyokimyasal testler ve serolojik doğrulama amacıyla kullanılan *E. coli* O157 lateks testi sonuçlarına göre, 100 kaymak numunesinin 3'ünden (%3,0) *E. coli* O157 identifiye edildi. H7 antiserumu ile yapılan aglutinasyon testinde ise, 3 izolata hiçbirinin H7 antijeni taşımadığı belirlendi. *E. coli* O157 şüpheli kolonilerin BCIG içeren CT-SMAC agardaki makroskopik morfolojisi Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Şüpheli olarak değerlendirilen 3 izolata ait biyokimyasal özellikler Tablo 3.1'de, lateks aglutinasyon test sonuçları ise Şekil 3.2'de verilmiştir.

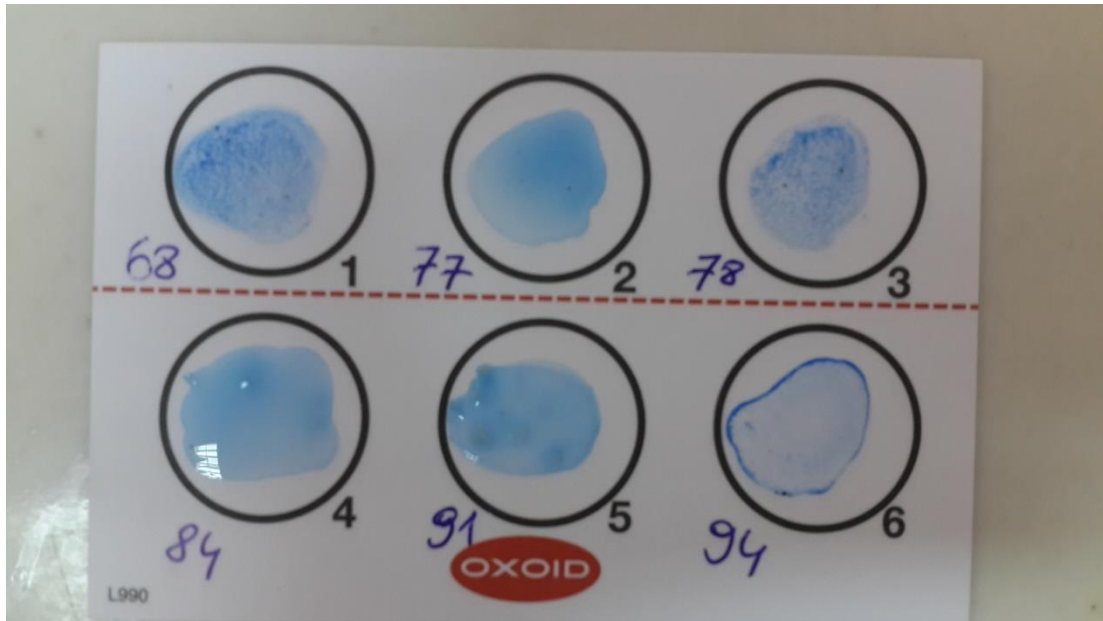
**Tablo 3.1.** *E. coli* O157 izolatlarının biyokimyasal özellikleri

Test		Sonuç
Oksidaz		-
Hareket		-
İndol		+
MR		+
VP		-
Sitrat		-
Üreaz		-
TSI agarda	Glukoz	+
	Sukroz	+
	Laktoz	+
	H <sub>2</sub> S	-
Sellobiyoz		-

Kaymak örneklerinden izole edilen 3 suştan 1'inin ev tipi üretime ait ve inek sütü orijinli olduğu, 2'sinin ise ticari tipte üretime ait ve inek ile manda sütünden yapılmış (karışık) olduğu belirlendi.



**Şekil 3.1.** BCIG içeren CT-SMAC agarda sorbitol fermentasyonu ve  $\beta$ -glukuronidaz enzim aktivitesi negatif *E. coli* O157 kolonileri

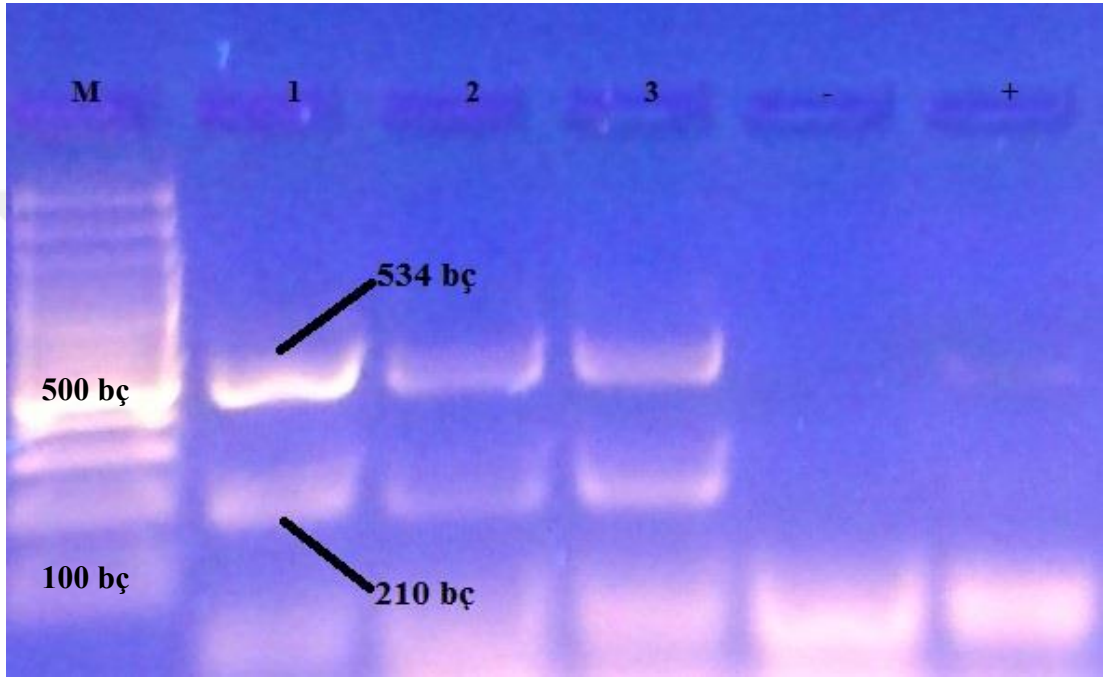


**Şekil 3.2.** *E. coli* O157 Lateks testi ve değerlendirilmesi. 1, 3, 6: pozitif reaksiyon; 2, 4, 5: negatif reaksiyon



### 3.2. PZR Bulguları

Kaymak örneklerinden kültürel yöntemler kullanılarak identifiye edilen 3 *E. coli* O157 suşunun tamamı *Stx1* ve *ehlyA* genleri yönünden pozitif bulunurken, suşların *Stx2* ve *eaeA* genlerini ise taşımadığı belirlendi. *Stx1* (210 bç) ve *ehlyA* (534 bç) genlerine ait jel görüntüsü Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.3.** *E. coli* O157 suşlarında *Stx1* ve *ehlyA* genlerine ait PZR bulguları. M: DNA ladder (100 bç); 1-3: *Stx1* (210 bç) ve *ehlyA* (534 bç) genleri pozitif test suşları; -: negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922); +: pozitif kontrol (*E. coli* O157:H7 EDL931).

### 3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Kaymak örneklerinden izole edilen 3 *E. coli* O157 izolatu 16 farklı antibiyotiğe karşı Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak test edildi. Üç izolatu tamamı sefazolin, sefoksitin ve seftiofura dirençli iken; izolatlarda ampisilin ve sefalothine karşı %66,7 oranlarında, seftriakson, nalidiksik asit ve trimetoprim+sulfametoksazole karşı ise %33,3 oranlarında direnç tespit edildi. İzolatların tümünün enrofloksasin, gentamisin, siprofloksasin, tetrasiklin ve imipeneme karşı duyarlı oldukları belirlendi. Kaymak örneklerinden izole edilen *E. coli* O157 suşlarının antibiyotik dirençlilikleri Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.2.** *E. coli* O157 izolatlarında antibiyotik dirençliliği

Antibiyotikler	<i>E. coli</i> O157 izolatları (n=3)					
	S		I		R	
	n	%	n	%	n	%
Amoksisilin+klavulanik asit (30µg)	2	66,7	1	33,3	-	0
Ampisilin (10µg)	1	33,3	-	0	2	66,7
Sefalothin (30µg)	-	0	1	33,3	2	66,7
Sefazolin (30µg)	-	0	-	0	3	100
Sefoksitin (30µg)	-	0	-	0	3	100
Seftiofur (30µg)	-	0	-	0	3	100
Seftriakson (30µg)	2	66,7	-	0	1	33,3
Enrofloksasin (5µg)	3	100	-	0	-	0
Gentamisin (10µg)	3	100	-	0	-	0
Kanamisin (30µg)	2	66,7	1	33,3	-	0
Streptomisin (10µg)	1	33,3	2	66,7	-	0
Siprofloksasin (5µg)	3	100	-	0	-	0
Nalidiksik asit (30µg)	2	66,7	-	0	1	33,3
Tetrasiklin (30µg)	3	100	-	0	-	0
İmipenem (10µg)	3	100	-	0	-	0
Trimetoprim+Sulfametoksazol (25µg)	2	66,7	-	0	1	33,3

S: duyarlı; I: orta derecede duyarlı; R: dirençli

#### 4. TARTIŞMA

Türkiye'de geleneksel bir ürün olan ve özellikle Afyonkarahisar'da Afyon kaymağı olarak da bilinen, asıl orijinini manda sütünden alan kaymak, hem üretildiği bölge hem de ülke bazında önemli bir pazar payına sahiptir. Bu nedenle de, kaymağın mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesine yönelik çeşitli araştırmalar yapıldığı (Yılsay ve Bayizit, 2002; Akalın ve ark., 2006; Siriken ve Erol, 2009, Öncü ve Arın, 2013), ancak, bu araştırmaların genellikle belirli bakteriler ya da sadece kimyasal parametreler üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir.

*E. coli* O157:H7/H serotipi için sağlıklı ruminantlar primer rezervuarlar olarak kabul edilmekte ve bu hayvanlara ait serotiple kontamine her türlü gıda maddesi halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır (Chapman ve ark, 1993b; Kiranmayi ve ark., 2010; Farrokh ve ark., 2013; Ko ve ark., 2016). Günümüzde tüm dünyada en önemli gıda kaynaklı ve zoonotik öneme sahip bakteriyel patojenlerden biri olarak kabul edilen *E. coli* O157:H7/H serotipinin, gerek dünyada gerekse Türkiye'de çeşitli çiğ ve pastörize sütler ya da süt ürünlerinden izolasyonuna yönelik çok sayıda araştırma bulunmakla birlikte (Upton ve Coia, 1994; Wang ve ark., 1997; Öksüz ve ark., 2004; Şeker ve Yardımcı, 2008; Rantsiou ve ark., 2012; Douëllou ve ark., 2016), yapılan kapsamlı literatür taramalarında bu serotipin kaymaklarda varlığının araştırılmasına yönelik sınırlı sayıda çalışma (İpekçioğlu, 2009) olduğu dikkati çekmiştir. İpekçioğlu (2009) tarafından gerçekleştirilen ve Afyonkarahisar'da tüketime sunulan Afyon kaymaklarında *E. coli*, *E. coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* varlığının araştırıldığı tek çalışmada, analiz edilen 100 kaymak örneğinin hiç birinden *E. coli* O157:H7 izolasyonu gerçekleştirilemediği bildirilmiştir.

Sunulan çalışmada Afyonkarahisar'a bağlı çeşitli merkez ve çevre ilçe ve köy halk pazarlarında ev yapımı (n=69) ve ticari firmalar tarafından paketlenmiş (n=31) olarak satışa sunulan toplam 100 adet kaymak örneği *E. coli* O157:H7/H varlığı yönünden analiz edildi. Örneklenen kaymak numunelerinin 32'si inek ve manda sütü

(karışık), 57'si inek sütü, 11'i ise manda sütü orijinliydi. Analiz edilen 100 adet kaymak örneğinin 3'ünden (%3) *E. coli* O157 izolasyon ve identifikasyonu gerçekleştirildi. Kaymak örneklerinden izole edilen 3 suştan 1'inin ev tipi üretime ait ve inek sütü orijinli olduğu, 2'sinin ise ticari tipte üretime ait ve inek ile manda sütünden yapılmış (karışık) olduğu belirlendi. *E. coli* O157:H7/H'nin çiğ inek ve manda sütlerindeki prevalansına yönelik çalışmalarda farklı izolasyon oranları bildirilmiş ve serotipin bu sütler ve sütlerden yapılmış ürünlerdeki varlığının halk sağlığı açısından risk oluşturabileceği vurgulanmıştır (Chapman ve ark., 1993a; Wang ve ark., 1997; Öksüz ve ark., 2004; Martucciello ve ark., 2008; Şeker ve Yardımcı, 2008; Rantsiou ve ark., 2012; Farrokh ve ark. 2013; Tanzifi ve ark., 2015). Özellikle süt ve süt ürünlerinden kaynaklanan salgın ya da bireysel vakalardan elde edilen epidemiyolojik veriler, süt ve süt ürünlerinin *E. coli* O157:H7/H serotipi ile kontaminasyonunun meme başı kaynaklı, sağım hijyeni yetersizliği, pastörizasyon yetersizliği ya da pastörizasyon sonrası kontaminasyon kaynaklı olabileceğini göstermiştir (Morgan ve ark., 1993; Wang ve ark., 1997; Şeker ve Yardımcı, 2008; Nobile ve ark., 2016). *E. coli* O157:H7/H'nin farklı ortamlarda gelişimi üzerine yapılan çalışmalarda etkenin asitliğe, yüksek tuz konsantrasyonlarına ve donma sıcaklıklarına önemli oranda direçli, yüksek sıcaklıklara ise *Salmonella* türlerinden çok daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Glass ve ark., 1992; Padhye ve Doyle, 1992; Berry ve Cutter, 2000; Law, 2000). Geleneksel yöntemlerle kaymak yapımında süte 70-75 °C'ye kadar ön ısıtma işlemi uygulandığı ve sonrasında sütün 90-95 °C'ye kadar ısıtıldığı dikkate alındığında, bu çalışmada elde edilen 3 izolatin kaynağının üretim aşamasından sonra, ürünün dışkı ile kontaminasyonu ya da üretim sonrası hijyen yetersizliğinden kaynaklanabilecek spontan bir bulaşma olabileceği düşünüldü.

*E. coli* O157:H7/H serotipi, insanlardaki infeksiyonların patogenezinde önemli role sahip Şiga toksinler, enterohemolizin ve intimin gibi çeşitli virules faktörlerine sahiptir (Law, 2000; Bugarel ve ark., 2011; Bergan ve ark., 2012). İnek ve manda orijinli süt ve süt ürünlerinden izole edilen *E. coli* O157:H7/H suşlarında bu virulens faktörlerini kodlayan genlerin tek başlarına ya da birlikte bulunabildikleri gösterilmiştir (Rahimi ve ark., 2012; Rantsiou ve ark., 2012; Trevisani ve ark., 2014;

Dou  llou ve ark., 2016; Nobili ve ark., 2016). Şiga toksinlerin *in vivo* koşullarda mikrovasküler değişikliklere neden olurken, *in vitro* ortamlarda ise hücreler üzerinde sitotoksik etki oluşturdukları bilinmekte ve bu toksinler HC ve HUS ile ilişkilendirilmektedir (Law, 2000; Bergan ve ark., 2012). Süt  r nlerinden Şigatoksijenik *E. coli* O157:H7/H  izolasyonuna yönelik yapılan çalışmalarda, izole edilen suşlarda Şiga toksin genlerinin dağılımı ve prevalansı değişkenlik göstermektedir. Konu ile ilgili bu araştırmalarda, özellikle izolat sayısının fazla olduğu çalışmalarda, genellikle *Stx2* geninin prevalansının *Stx1*'e göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Momtaz ve ark., 2012; Rahimi ve ark., 2012; Rantsiou ve ark., 2012; Dou  llou ve ark., 2016; Nobili ve ark., 2016). Genellikle, *E. coli* O157:H7/H  suşlarındaki *Stx2* genlerinin varlığının HUS'un gelişmesinde daha etkin rol oynayabileceği belirtilmekle birlikte, *Stx1* oluşturan suşların da infeksiyonlar açısından potansiyel bir tehlike yaratabileceği vurgulanmaktadır (Griffin ve Tauxe, 1991; Friedrich ve ark., 2002; Ko ve ark., 2016). Bu çalışmada kaymalardan izole edilen 3 *E. coli* O157 suşunun tamamının sadece *Stx1* genine sahip olduğu, *Stx2* genini ise taşımadığı belirlendi. Diğer araştırmaların bulguları ile karşılaştırıldığında elde edilen bu sonucun, çalışma materyalinin farklılığı, elde edilen suş sayısının azlığı ve bölgesel farklılıklar ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Enterohemorajik *E. coli* O157:H7/H  suşlarında plazmid tarafından kodlanan bir virulens faktörü olan enterohemolizin, patogenezdaki rolü tam olarak açıklık kazanmamakla birlikte insanlarda ciddi klinik hastalıklarla ilişkilendirilmekte ve bu virulens faktörünün Şiga toksin oluşturan patojen *E. coli* suşları için epidemiyolojik bir marker olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Cookson ve ark., 2007; Law, 2000; Karmali ve ark., 2010; Farrokh ve ark., 2013). Süt  r nlerinden *E. coli* O157:H7/H  serotipi ve serotipin virulens faktörlerinin izolasyonuna yönelik yapılan çalışmalarda, *ehlyA* geninin suşlarda genellikle en yaygın virulens geni olduğu ve çoğunlukla *Stx1* ve/veya *Stx2* genleri ile birlikte bulunduğu bildirilmiştir (Law, 2000; Momtaz ve ark., 2012; Rantsiou ve ark., 2012; Dou  llou ve ark., 2016). Bu verilerin aksine, Rahimi ve ark. (2011) farklı süt ürünlerinden izole ettikleri 9 *E. coli* O157 suşunun hiçbirinde *ehlyA* genine rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada, konu ile ilgili diğer araştırmaya verilerine benzer Şekilde, kaymak

örneklerinden izole edilen 3 suşun tamamı *Stx1* geni ile birlikte *ehlyA* geni yönünden pozitif olarak bulundu.

*E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> suşlarında bir diğer önemli virulens faktörü, intestinal epitel hücrelerinde bağlanma ve silinme lezyonlarının oluşumundan sorumlu tutulan dış membran proteini intimindir. Yapılan çalışmalarda inek orijinli süt ürünlerinden izole edilen *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> suşlarında bu proteini kodlayan *eaeA* geni prevalansı farklılık göstermektedir. İzolat sayısının fazla olduğu araştırmalarda gen prevalansının yüksek olduğu, izolat sayısının az olduğu çalışmalarda ise ya *eaeA* gen prevalansının düşüklüğü ya da suşlarda genin yokluğu dikkati çekmektedir (Law, 2000; Rahimi ve ark., 2011; Momtaz ve ark., 2012; Rantsiou ve ark., 2012; Douëllou ve ark., 2016). Bu çalışmada, kaymak örneklerinden izole edilen *E. coli* O157 suşlarının hiç birinde *eaeA* genine rastlanmadı. Diğer araştırmacıların bulguları ile karşılaştırıldığında ortaya çıkan bu sonucun, çalışma materyalinin farklılığı, örneklerden izole edilen suş sayısının azlığı ve suşların orijinindeki bölgesel farklılıklar ile ilişkili olabileceği düşünüldü. İnsan ve hayvan orijinli *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> suşlarına yönelik yapılan farklı çalışmalarda, bazı araştırmacılar *eaeA* geni varlığı ve Şiga toksin oluşturan *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> suşlarının patojenitesi arasında sıkı bir korelasyon olduğuna dikkat çekerken (Beutin ve ark., 2004) bazı araştırmacılar da *eaeA* geni taşımayan bazı suşların da patojen olabileceğini belirtmektedir (Karch ve ark., 2005). Ayrıca, *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> suşlarında *eaeA* geninin genellikle *ehlyA* geni ile birlikte bulunduğu, ancak bunun, daha sıklıkla insan izolatlarında görüldüğü vurgulanmaktadır (Law, 2000).

Günümüzde pek çok hastalıkta sağaltım ya da koruma amaçlı kullanılan antibiyotiklerin, *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> infeksiyonların tedavisinde kullanımı, etkilerine bağlı farklı görüşlerin bulunması nedeniyle tartışmalı bir konudur. Antibiyotiklerin Şiga toksin genlerinin *in vivo* ekspresyonunu artırarak HC ve HUS'un gelişimini şiddetlendirdiğini belirten araştırmacıların yanı sıra (Wong ve ark., 2000; Zhang ve ark., 2000), suşların henüz direnç göstermedikleri bazı antibiyotiklerin infeksiyonların erken dönemlerinde kullanımının HUS'un ilerlemesini önlediğini vurgulayan araştırmacılar da bulunmaktadır (Ikeda ve ark., 1999; Shiomi ve ark.,

1999). Antibiyotiklere karşı gelişen direnç, günümüzün en önemli sağlık sorunlarından birisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Çeşitli araştırmalar, infekte hayvanların sütlerinde bulunan antibiyotiklere dirençli bakterilerin ve bu bakterilerdeki direnç genlerinin, pastörize edilmemiş süt ve/veya peynir, yoğurt, krema, tereyağı, dondurma gibi süt ürünlerinin tüketilmesi sonucu insanlara aktarılabileceğini göstermektedir (Adeleke ve ark., 2000; Fluit ve Schmitz, 2004). Süt ve süt ürünlerinden izole edilen *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> suşlarının antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesine yönelik yapılan çeşitli çalışmalarda, genellikle etkenlerin yüksek direnç oranına sahip oldukları ya da çoklu antibiyotik direnci gösterdikleri bildirilmiştir (Rahimi ve ark., 2011; Momtaz ve ark., 2012; Reuben ve ark., 2013). Rahimi ve ark. (2011) tarafından İran'da yapılan bir çalışmada, süt ürünlerinden izole edilen 9 *E. coli* O157 suşunda ampisilin (%44,4), gentamisin (%44,4) ve eritromisine (%33,3) karşı yüksek direnç oranları bildirilmiştir. Bir başka araştırmada süt ve süt ürünlerinden izole edilen 14 *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> suşunun florokinolonlar (%100), trimetoprim (%85,7) ve ampisiline (%71,4) karşı yüksek direnç oranlarına sahip olduğu belirtilmiştir (Momtaz ve ark., 2012). Reuben ve ark. (2013), marketlerde satılan 420 yöresel fermente süt örneğinden izole ettikleri 19 *E. coli* O157:H7 suşunda 9 farklı direnç paterni belirlediklerini; suşlardaki en yüksek direnç oranlarının ise penisilin G (%100), tetrasiklin (%100), eritromisin (%94,7), amoksisilin (%84,2), oksasilin (%84,2), trimetoprim/sulfametoksazol (%84,2) ve kloramfenikole (%68,4) karşı bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, kaymak örneklerinden izole edilen 3 *E. coli* O157 suşunun Türkiye'de yaygın olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırıldı. Suşların tamamı sefazolin, sefoksitin ve seftiofura karşı dirençli iken, suşlarda ampisilin (%66,7), sefalothin (%66,7), seftriakson (%33,3), nalidiksik asit (%33,3) ve trimetoprim/sulfametoksazola (%33,3) karşı da direnç belirlendi. Ayrıca suşlardan 2'si streptomisine (%66,7), 1'i amoksisilin+klavulanik asite (%33,3), 1'i sefalothine (%33,3) ve 1'i de kanamisine (%33,3) orta derecede duyarlı bulundu. Elde edilen direnç oranlarının ve profillerinin diğer araştırmacıların bildirdiği sonuçlardan farklılık göstermesinin nedeninin, örneklenen materyalin farklılığı, bu çalışmada izole edilen suş sayısının sınırlı olması ve ülke bazında kullanılan antibiyotiklerin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Afyonkarahisar merkez ve merkeze bağlı çeşitli ilçe ve köy halk pazarlarında ev yapımı ve ticari firmalar tarafından paketlenmiş olarak satışa sunulan Afyon kaymaklarından *E. coli* O157:H7 serotipinin izolasyonu, izole edilen suşlarda önemli virulens genlerinin belirlenmesi ve suşların Türkiye'de yaygın olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere dirençliliklerinin araştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada, toplam 100 Afyon kaymağı örneğinden 3 *E. coli* O157 suşu izole edildi. Geleneksel yöntemlerle kaymak yapımında süte 70-75 °C'ye kadar ön ısıtma işlemi uygulandığı ve sonrasında sütün 90-95 °C'ye kadar ısıtıldığı dikkate alındığında, kaymak örneklerine bulaşmanın üretim aşamasından sonra fekal kontaminasyon ya da üretim sonrası hijyen yetersizliği ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

PZR ile virulens genlerini araştırdığımız 3 suшта *Stx1* ve *ehlyA* virulens genlerinin birlikte bulunduğu, buna karşın incelen suşların *Stx2* ve *eaeA* genlerine ise sahip olmadığı belirlendi. Elde edilen bu sonuçta, çalışılan suş sayısının azlığının etkili olabileceği düşünüldü. Genellikle insan infeksiyonlarının patogenezinde *Stx2* ve *eaeA* genlerinin önemi vurgulanmakla birlikte, bu genlere sahip olmayan *E. coli* O157:H7/H suşlarının da patojen karakterde olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu çalışmada elde edilen *Stx1* ve *ehlyA* virulens genleri yönünden pozitif *E. coli* O157 suşlarının ve bu suşların izole edildiği kaymakların da halk sağlığı açısından potansiyel bir risk teşkil edebileceği düşünüldü.

Çalışmada izole edilen 3 suшта en yüksek direnç oranlarının sefazolin (%100), sefoksitin (%100) ve seftiofura (%100) karşı olduğu, suşların ayrıca ampisilin (%66,7), sefalotin (%66,7), seftriakson (%33,3), nalidiksik asit (%33,3) ve trimetoprim/sulfametoksazola (%33,3) karşı da dirençli oldukları belirlendi. İncelenen suş sayısının az olması nedeniyle, elde edilen bu direnç oranlarının suşların direnç profillerini yorumlamak açısından yeterli olamayabileceği düşünüldü. Bununla birlikte, özellikle antibiyotik direnç genlerini taşıyan patojen bakterilerle kontamine hayvansal gıdaların tüketilmesi sonucu, bu direnç genlerinin insanlara aktarılabildiğinin de göz ardı edilmemesi gerekmektedir.



Sonuç olarak, sunulan çalışma Türkiye'de kaymak örneklerinde *E. coli* O157 serotipinin ve infeksiyonların patogenezinde önemli role sahip virulens genlerinin varlığını gösteren ilk çalışmadır. Geleneksel bir ürün olan Afyon kaymağı, hem üretildiği bölge hem de ülke bazında önemli bir pazar ve tüketici payına sahiptir. Üretim aşamasında yetersiz ya da uygun olmayan ısı veya üretim sonrasında hijyen yetersizliğine bağlı kaynaklanabilecek fekal bir kontaminasyon, bu ürünlerin halk sağlığı açısından risk teşkil etmesine neden olabilmektedir. Türkiye'de günümüze kadar olan süreçte *E. coli* O157:H7/H serotipinin neden olduğu herhangi bir salgın ya da bireysel vaka bildirilmemesine rağmen, bu serotipin izole edildiği diğer hayvansal orijinli gıdalarda olduğu gibi, kaymakta da toplumsal açıdan farkındalık oluşturulması gerekmektedir.

## ÖZET

### **Afyonkarahisar'da Satışa Sunulan Afyon Kaymağında *Escherichia coli* O157:H7 Varlığının Araştırılması**

Bu çalışmada, Afyonkarahisar'da satışa sunulan Afyon kaymaklarından *E. coli* O157:H7/H serotipinin izolasyonu, izole edilen suşlarda *Stx1*, *Stx2*, *ehlyA* ve *eaeA* genlerinin PZR ile araştırılması ve suşların Türkiye'de yaygın olarak kullanılan bazı antibiyotiklere dirençliliklerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, Afyonkarahisar merkez ve köylerdeki halk pazarlarında satılan toplam 100 adet kaymak örneği toplandı. Konvansiyonel kültür yöntemleri ve serolojik doğrulama testleri kullanılarak 100 örneğin 3'ünden *E. coli* O157 izole edildi. İzole edilen 3 suşta *Stx1*, *Stx2*, *ehlyA* ve *eaeA* genlerinin varlığı PZR ile araştırıldı. *Stx1*, *Stx2* ve *ehlyA* genlerinin belirlenmesinde çoklu PZR, *eaeA* virulens geni için ise tekli PZR kullanıldı. Üç suşun tamamı *Stx1* ve *ehlyA* genine sahipken, suşlarda *Stx2* ve *eaeA* geni bulunamadı. Kaymak örneklerinden izole edilen 3 *E. coli* O157 suşunun çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırıldı. Suşların tamamı sefazolin, sefoksitin ve seftiofura karşı dirençli iken, suşlarda ampisilin (%66,7), sefalothin (%66,7), seftriakson (%33,3), nalidiksik asit (%33,3) ve trimetoprim/sulfametoksazola (%33,3) karşı da direnç belirlendi. Bizim bilgimize göre, bu çalışma Türkiye'de kaymak örneklerinde *E. coli* O157 ve virulens genlerinin varlığını gösteren ilk çalışmadır.

**Anahtar Sözcükler:** *E. coli* O157, enterohemolizin, intimin, kaymak, Şiga toksin

## SUMMARY

### **Investigation of *Escherichia coli* O157:H7 in Afyon Kaymak sold in Afyonkarahisar**

The aim of this study was to isolate the *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> serotype from Afyon kaymak sold in Afyonkarahisar, investigate the *Stx1*, *Stx2*, *ehlyA* and *eaeA* genes in isolated strains by PCR and determine the antibiotic resistance of strains to some antibiotics commonly used in Turkey. For this purpose, a total of 100 kaymak samples sold in public bazaars located center town and villages of Afyonkarahisar were collected. *E. coli* O157 was isolated from 3 of 100 samples by using conventional culture methods and serological confirmation tests. The presence of *Stx1*, *Stx2*, *ehlyA* and *eaeA* genes in the isolated 3 strains was investigated by PCR. Multiplex PCR was used for the detection of *Stx1*, *Stx2* and *ehlyA* genes and singleplex PCR was used for the detection of *eaeA* virulence gene. While all of 3 strains harboured the *Stx1* and *ehlyA* genes, the *Stx2* and *eaeA* genes were not found in the strains. The antibiotic resistance 3 *E. coli* O157 strains isolated from kaymak samples to some antibiotics was investigated by Kirby-Bauer disc diffusion test. While all of strains were resistant to cephalosporins, cefoxitin and ceftiofur, the resistance was also determined in the strains to ampicillin (66.7%), cephalothin (66.7%), ceftriaxone (33.3%), nalidixic acid (33.3%) and trimethoprim/sulphamethoxazole (33.3%). To our knowledge, this is the first study showing the presence of *E. coli* O157 and its virulence genes in the kaymak samples in Turkey.

**Key words:** *E. coli* O157, enterohemolysin, intimin, kaymak, Shiga toxin

## KAYNAKLAR

- ADELEKE, O. E., ADENIYI, B. A., AKINRINMISI, A. A. (2000). Microbiological quality of local soymilk: a public health appraisal. *African Journal of Biomedical Research*, **3**: 89-92.
- AKALIN, S. A., GÖNÇ, S. ÜNAL, G., ÖKTEN, S. (2006). Determination of some chemical and microbiological characteristics of kaymak. *Grasas Y Aceites*, **57 (4)**: 429-432.
- AKIYAMA, Y., FUTAI, H., SAITO, E., OGITA, K., SAKAE, H., FUKUNAGA, M., TSUJI, H., CHIKAHIRA, M., IGUCHI, A. (2016). Shiga toxin subtypes and virulence genes distributed among *Escherichia coli* isolated from cattle. *Japanese Journal Of Infectious Diseases*, DOI: 10.7883/Yoken.JJID.2016.100
- ANON. (2014). *Escherichia coli*. Erişim: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Escherichia\_coli]. Erişim tarihi: 03.05.2016.
- ARMSTRONG, G.L., HOLLINGSWORTH, J., MORRIS, J.G. (1996). Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of developed world. *Epidemiologic Reviews*, **18**: 29-51.
- BATU, A., ÇAĞLAR, A., KARA, H. H. (2008). Afyon kaymağının raf ömrünün uzatılmasında modifiye atmosferde paketlenme önerisi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **2**: 43-46.
- BAUER, M. E., WELCH, R. A. (1996). Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*, **64**: 167-175.
- BERGAN, J., LINGELEM, A.B.D., SIMM, R., SKOTLAND, T., SANDVIG, K. (2012). Shiga toxins. *Toxicon*, **60**: 1085-1107.

- BERRY, E.D., CUTTER, C.N. (2000). Effect of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of asetic asid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 1493-1498.
- BETTELHEIM, K. A., WHIPP, M., DJORDJEVIC, S. P., RAMACHANDRAN, V. (2002). First isolation outside Europe of sorbitol-fermenting verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) belonging to O group O157. *Journal of Medical Microbiology*, **51**: 713-714.
- BEUTIN, L. (1999). *Escherichia coli* O157 and Other Types of Verocytotoxigenic *E.coli* (VTEC) Isolated from Humans, Animals and Food in Germany. In: *Escherichia coli O157 in Farm Animals*. Ed: C.S. Stewart, H.J. Flint. Wallingford, UK: CABI Publishing, p: 121-145.
- BEUTIN, L., PRADA, J., ZIMMERMANN, S., STEPHAN, R., ØRSKOV, I., ØRSKOV, F. (1988). Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie Und Hygiene, Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, **267**: 576-588.
- BEUTIN, L., MONTENEGRO, M. A., QRSKOV, I., QRSKOV, F., PRADA, J., ZIMMERMANN, S., STEPHAN, R. (1989). Close association of verotoxin (shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**: 2559-2564
- BEUTIN, L., KRAUSE, G., ZIMMERMANN, S., KAULFUSS, S., GLEIER, K. (2004). Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**: 1099-1108.
- BIDET, P., MARIANI-KURKDJIAN, P., GRIMONT, F., BRAHIMI, N., COURROUX, C., GRIMONT, P., BINGEN, E. (2005). Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France. *Journal of Medical Microbiology*, **54**: 71-75.

- BUGAREL, M., MARTIN, A., FACH, P., BEUTIN, L. (2011). Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *BMC Microbiology*, **11**: 142-152.
- CAPRIOLI, A., MORABITO, S., BRUGERE, H., OSWALD, E. (2005). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*, **36**: 289-311.
- CHAPMAN, P.A., WRIGHT, D. J., HIGGINS, R. (1993a). Untreated milk as a source of verotoxigenic *E. coli* O157:H7. *Veterinary Record*, **133**: 171-172.
- CHAPMAN, P.A., SIDDON, C.A., WRIGHT, D.J., NORMAN, P., FOX, J., CRICK, E. (1993b). Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiology and Infection*, **111**: 439-447.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2013). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty Third informational supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA.
- CODY, S.H., GLYNN, M.K., FARRAR, J.A., CAIRNS, K.L., GRIFFIN, P.M., KOBAYASHI, J., FYFE, M., HOFFMAN, R., DEAN-NYSTROM, E.A., BOSWORTH, B.T., O'BRIEN, A.D., MOON, H.W. (1999). Bovine Infection with *Escherichia coli* O157:H7. In: *Escherichia coli O157 in Farm Animals*. Ed: C.S. Stewart, H.J. Flint. Wallingford, UK: CABI Publishing, p: 51-58.
- COIA, J. E. (1998). Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **20**: 1-9.
- COOKSON, A. L., BENNETT, J., THOMSON-CARTER, F., ATTWOOD, G. T. (2007). Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (*ehxA*) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 6360-6369.

- CRAY, W. C., MOON, H. W. (1995). Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 1586-1590.
- DEAN-NYSTROM, E. A., BOSWORTH, B. T., CRAY, W. C., MOON, H. W. (1997). Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infection and Immunity*, **65**: 1842-1848.
- DEAN-NYSTROM, E. A., BOSWORTH, B. T., O'BRIEN, A. D., MOON, H. W. (1999). Bovine Infection With *Escherichia Coli* O157:H7. In: *Escherichia Coli O157 in Farm Animals*. Ed: C.S. Stewart, H.J. Flint. Wallingford, UK: CABI Publishing, P: 51-58.
- DEMİRCİ, M., YÜKSEL, N. A., SOYSAL, İ.M. (1992). Memeden Mamül Maddeye Süt. *Hasad Yayıncılık*, İstanbul, sy. 103-112.
- DEMİRCİ, M., ŞİMŞEK, O. (1997). Süt İşleme Teknolojisi. *Hasad Yayıncılık*, İstanbul.
- DONNENBERG, M. S., WHITTAM, T. S. (2001). Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *The Journal of Clinical Investigation*, **107**: 539-548.
- DORN, C.R. (1995). *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **206**: 1583-1585.
- DOUËLLOU, T., DELANNOY, S., GANET, S., MARIANI-KURKDJIAN, P., FACH, P., LOUKIADIS, E., MONTEL, Mc., THEVENOT-SERGENTET, D. (2016). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dairy products - Genetic diversity and virulence gene profiles. *International Journal of Food Microbiology*, **232**: 52-62.
- DOYLE, M. P. (1991). *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, **12**: 289-302.

- EKLUND, M. (2005). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) findings from humans in Finland. Doctoral thesis, *National Public Health Institute*.
- FARROKH, C., JORDAN, K., AUVRAY, F., GLASS, K., OPPEGAARD, H., RAYNAUD, S., THEVENOT, D., CONDRON, R., DE REU, K., GOVARIS, A., HEGGUM, K., HEYNDRICKX, M., HUMMERJOHANN, J., LINDSAY, D., MISZCZYCHA, S., MOUSSIEGT, S., VERSTRAETE, K., CERF, O. (2013). Review of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*, **162**: 190-212.
- FLUIT, A. C., SCHMITZ, F. J. (2004). Resistance integrons and superintegrons. *Clinical Microbiology and Infection*, **10**: 272-288.
- FRIEDRICH, A. W., BIELASZEWSKA, M., ZHANG, W. L., PULZ, M., KUCZIUS, T., AMMON, A., KARCH, H. (2002). *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *Journal of Infectious Diseases*, **185**: 74-84.
- GANNON, V. P. J. (1999). Control of *Escherichia coli* O157:H7 at Slaughter. In: *Escherichia coli O157 in Farm Animals*. Ed.: C.S. Stewart, H.J. Flint. Wallingford, UK: CABI Publishing, p: 169-193.
- GARBER, L., WELLS, S., SCHROEDER-TUCKER, L., FERRIS, K. (1999). Factors associated with fecal shedding of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on dairy farms. *Journal of Food Protection*, **62**: 307-312.
- GLASS, K.A., LOEFFELHOLZ, J.M., FORD, J.P., DOYLE, M.P. (1992). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 2513-2516.
- GRIFFIN, P. M., TAUXE, R. V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic Reviews*, **13** (1) : 60-98.



- GYLES, C., ROGER, J., ANLI, G., KIM, Z., DENIS, P., STOJANKA, A., PATRICK, B. (1998). Association of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 4134-4141.
- HALKMAN, A. K., NOVEIR, M. R., DOĞAN, H. B. (2001). *Escherichia coli* O157: H7 Serotipi. *Sim Matbaacılık Ltd. Şti.*, Ankara.
- HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. *Lippincott Williams and Wilkins*, Philadelphia.
- İKEDA, K., IDA, O., KIMOTO, K., TAKATORIGE, T., NAKANISHI, N., TATARA, K. (1999). Effect of early fosfomycin treatment on prevention of hemolytic uremic syndrome accompanying *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Clinical Nephrology*, **52**: 357-362.
- İNAL, T. (1990). Süt Ve Süt Ürünleri Hijyen Ve Teknolojisi. *Final Ofset*, İstanbul.
- İPEK, D., ZORBA, N.N., (2008). Türk lokumuna uygulanan farklı ambalajlama tekniklerinin mikrobiyolojik kalitesine etkileri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **1**: 1-6.
- İZGÜR, M. (2006). Enterobakteri İnfeksiyonları (Enterobacteriaceae), In: *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*. Ed.: AYDIN, N., PARACIKOĞLU J. *İlke-Emek Yayınları*, Ankara, sy. 109-127.
- JO, M. Y., KIM, J. H., LIM, J. H., KANG, M. Y., KOH, H. B., PARK, Y. H., YOON, D. Y., CHAE, J. S., EO, S. K., LEE, J. H. (2004). Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. *International Journal of Food Microbiology*, **95**: 41-49.
- JUDGE, N. A., MASON, H. S., O'BRIEN, A. D. (2004). Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces. *Infection and Immunity*, **72**: 168-175.

- KAPER, J. B., GANSHEROFF, L. J., WACHTEL, M. R., and O'BRIEN, A. D. (1998). Intimin-Mediated Adherence Of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Attaching-and-Effacing Pathogens. In: *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing Escherichia coli*. Ed: J.B. Kaper, A.D. O'Brien. Washington, DC: American Society For Microbiology, Pp. 148-156.
- KARCH, H., BIELASZEWSKA, M., BITZAN, M., SCHMIDT, H. (1999). Epidemiology and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 34: 229-243.
- KARCH, H., BIELASZEWSKA, M. (2001). Sorbitol-fermenting shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup> strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**: 2043-2049.
- KARCH, H., TARR, P. I., BIELASZEWSKA, M. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *International Journal of Medical Microbiology*, **295**: 405-418.
- KARMALI, M. A., GANNON, V., SARGEANT, J. M. (2010): Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, **140**: 360-370.
- KARMALI, M. A., PETRIC, M., LIM, C., FLEMING, P. C., ARBUS, G. S., LIOR, H. (1985). The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Disease*, **151**: 775-782.
- KEHL, S. C. (2002). Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**: 2711-2715.
- KIRANMAYI, C. B., KRISHNAIAH, N., MALLIKA, E. N. (2010). *Escherichia coli* O157:H7-An emerging pathogen in foods of animal origin. *Veterinary World*, **3**: 382-389.

- KO, H., MAYMANI, H., ROJAS-HERNANDEZ, C. (2016). Hemolytic uremic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7 infection in older adults: a case report and review of the literature. *Journal Of Medical Case Reports*, **10**: 1-4.
- KOÇAK, C. (1995). Fermente süt ürünlerinde kalite oluşumuna etki eden faktörler. *Milli Süt Ve Süt Ürünleri Sempozyumu*, Milli Produktivite Yayınları. Ankara, **548**: 374-378.
- KUNTZ, T. B., KUNTZ, S. T. (1999). Enterohemorrhagic *E. coli* infection. *Primary Care Update for OB/GYNS*, **6**: 192-196.
- LI, Q., SHERWOOD, J., LOGUE, C. M. (2004). The prevalance of *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 on bison carcasses during processing. *Food Microbiology*, **21**: 791-799.
- LAW, D. (2000). Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli*. *Journal Of Applied Microbiology*, **88**: E729-745.
- LEVINE, M. M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *Journal of Infectious Disease*, **155**: 377-389.
- LOCKING, M.E., O'BRIEN, S.J., REILLY, W.J., WRIGHT, E.M., CAMPBELL, D.M., COIA, J.E., BROWNING, L.M., RAMSAY, C.M. (2001). Risk factors for sporadic cases of *Escherichia coli* O157 infection: the importance of contact with animal excreta. *Epidemiology and Infection*, **127**: 215-220.
- MAINIL, J. (1999). Shiga/Verocytotoxins and Shiga/Verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Veterinary Research*, **30**: 235-257.
- MARTUCCIELLO, A., ASRARITA, S., RUGGIA, A., ALFANO, D., MORENA, C., GALIERO, G. A. (2008). A survey on *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and *Escherichia coli* O157 presence in Campania buffalo mozzarella cheese by real-time PCR. *Industrie Alimentari*, **47**: 1-2.

- MASSA, S., GOFFREDO, E., ALTIERI, C., NATOLA, K. (1999). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8 °C. *Letters In Applied Microbiology*, **28**: 89-92.
- MEAD, P. S., GRIFFIN, P. M. (1998). *Escherichia coli* O157:H7. *The Lancet*, **352**: 1207 - 1212.
- MEYER-BROSETA, S., BASTIAN, S. N., ARNÉ, P. D., SANAA, M. (2001). Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **203**: 347-361.
- MICHEL, P., WILSON, J. B., MARTIN, S. W., CLARKE, R. C., McEWEN, S. A., GYLES, C. L. (1999). Temporal ve geographical distributions of reported cases of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Ontario. *Epidemiology and Infection*, **122**: 193-200.
- MILON, A., OSWALD, E., RYCKE, J. D. (1999). Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Research*, **30**: 203-219.
- MOHAMMAD, A., PEIRIS, J. S. M., WIJEWANTA, E. A., MAHALINGAM, S., GUNASEKARA, G. (1985). Role of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in cattle and buffalo calf diarrhoea. *FEMS Microbiology Letters*, **26**: 281-283.
- MOMTAZ, H., FARZAN, R., RAHIMI, E., DEHKORDI, F. S., SOUOD, N. (2012). Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ruminant and donkey raw milk samples and traditional dairy products in Iran. *The Scientific World Journal*, Article ID 231342, doi:10.1100/2012/231342.
- MORA, A., BLANCO, J. E., BLANCO, M., ALONSO, M. P., DHABÍ, G., ECHEITA, A., and BLANCO, J. (2005). Antimicrobial resistance of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157: H7 and Non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Research in Microbiology*, **156(7)**: 793-806.

- MORGAN, D., NEWMAN, C. P., HUTCHINSON, D. N., WOLKER, A. M., ROWE, B., MAJID, F. (1993). Verotoxin producing *E.coli* O157:H7 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiology and Infection*, **11**: 181-187.
- NATARO, J. P., KAPER, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, **11(1)**: 142-201.
- NOBILI, G., FRANCONIERI, I., BASANISI, M. G., LA BELLA, G., TOZZOLI, R., CAPRIOLI, A., LA SALANDRA, G. (2016). Short communication: Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and mozzarella cheese in southern Italy. *Journal of Dairy Science*, **99**: 7877-7880.
- O'BRIEN, A. D., LAVECK, G. D. (1983). Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, **40**: 675-683.
- ØRSKOV, F. (1984). Genus I. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941<sup>AL</sup>. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume I. Ed.: N.R. Krieg, J.G. Holt. Baltimore, London: *Williams&Wilkins*, p: 420-423.
- OSEK, J. (2003). Development of a multiplex PCR approach for the identification of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *Journal of Applied Microbiology*, **95**: 1217-1225.
- OTAWA, K., SATO, M., SASAKI, T., SASAKI, H., NONAKA, J., ITO, K., KUROKI, T., NAKAI, Y. (2004). Genetic analysis of shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates from cattle in a limited region. *Animal Science Journal*, **75**: 261-269.
- ÖKSÜZ, Ö., ARICI, M., KURULTAY, S., GÜMÜŞ, T. (2004). Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. *Food Control*, **15**: 453-456.
- PADHYE, N. V., DOYLE, M. P. (1992). *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. *Journal of Food Protection*, **55**: 555-565.

- PARK, S., WOROBO, R., DURST, R. (1999). *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **39**(6): 481-502.
- PATON, J. C., PATON, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, **11**: 450–479.
- PERSAD, A.K., LEJEUNE, J. T. (2014). Animal reservoirs of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, Doi:10.1128/Microbiolspec.EHEC-0027-2014.
- QUINN, P.J., MARKEY, B.K., CARTER, M.E., DONNELLY, W.J., LEONARD, F.C. (2004). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Iowa, Blackwell Publishing Professional.*
- RAHIMI, E., MOMTAZ, H., ANARI, M. M. H., ALIMORADI, M., MOMENI, M., RIAHI, M. (2012). Isolation and genomic characterization of *Escherichia coli* O157:NM and *Escherichia coli* O157:H7 in minced meat and some traditional dairy products in Iran. *African Journal of Biotechnology*, **11**: 2328-2332.
- RANTSIOU, K., ALESSANDRIA, V., COCOLIN, L. (2012). Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food products of animal origin as determined by molecular methods. *International Journal Of Food Microbiology*, **154**: 37-43.
- REUBEN, C. R., OKOLOCHA, E. C., BELLO, M., TANIMU, H. (2013). Occurrence and antibiogram of *Escherichia coli* O157:H7 in locally fermented milk (Nono) sold under market conditions in Nasarawa State, Nigeria. *International Journal of Science and Research*, **2**: 591-598.
- RICKERT, K., ALBRECHT, J.A., BULLERMAN, L.B., SUMNER, S.S. (2000). Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on broccoli, cucumber and green pepper. *Dairy Food and Environmental Sanitation*, **20**: 24-28.

- RILEY, L. W., REMIS, R. S., HELGERSON, S. D., MCGEE, H. B., WELLS, J. B., DAVIS, B. R., HERBERT, R. J., OLCOTT, G. S., JOHNSON, L. M., HARGETT N. T., BLAKE, P. A., COHEN, M. L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype O157:H7. *The New England Journal Of Medicine*, **308**: 681-685.
- RUSSELL, J. B., DIEZ-GONZALES, F., JARVIS, G. N. (2000). Invited review: Effects of diet shifts on *Escherichia coli* in cattle. *Journal of Dairy Science*, **83**: 863-873.
- SACK, R. B. (1987). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *The New England Journal of Medicine*, **317**: 1535-1537.
- SAMADPOUR, M., ONGERTH, J.E., LISTON, J., TRAN, N., NGUYEN, D., WHITTAM, T.S., WILSON, R.A., TARR, P.I. (1994). Occurrence of shiga-like toxin-producing *Escherichia Coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Applied And Environmental Microbiology*, **60**: 1038-1040.
- SARIÖZKAN, S. (2011). Türkiye’de manda yetiştiriciliği’nin önemi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **17**: 163-166.
- SCHMIDT, H., KARCH, H., BEUTIN, L. (1994). The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiology Letters*, **117**: 189-196.
- SCHROEDER, C. M., ZHAO, C., DEBROY, C., TORCOLINI, J., ZHAO, S., WHITE, D.G., WAGNER, D.D., McDERMOTT, P.F., WALKER, R.D., MENG, J. (2002). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 576-581.
- SCOTLAND, S. M., SMITH, H. R., WILSHAW, G. A., ROWE, B. (1983). Vero cytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. *Lancet*, **2**: 216.

- SHIOMI, M., TOGAWA, M., FUJITA, K., MURATA, R. (1999). Effect of early oral fluoroquinolones in hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Pediatrics International*, **41**: 228-232.
- SMITH, H. R., SCOTLAND, S. M. (1993). Isolation and identification methods for *Escherichia coli* O157 and other vero cytotoxin producing strains. *Journal of Clinical Pathology*, **46**: 10-17.
- SOYSAL, İ., KÖK, S., GÜRCAN, E. K. (2005). Mandalarda alyuvar potasyum polimorfizmi üzerine bir araştırma. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2(2): 189-193.
- STEINMULLER, N., DEMMA, L., BENDER, J. B., EIDSON, M., ANGULO, F.J. (2006). Outbreaks of enteric disease associated with animal contact: not just a foodborne problem anymore. *Clinical Infectious Diseases*, **43**: 1596-602
- SYNGE, B. A. (2000). Veterinary significance of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **16**: 725-732.
- ŞEKER, E., YARDIMCI, H. (2008). First isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from faecal and milk specimens from Anatolian water buffaloes (*Bubalus bubalus*) in Turkey. *Journal of The South African Veterinary Association*, **79**: 167-170.
- ŞEKER, E., KUYUCUOĞLU, Y., SAREYYÜPOĞLU, B., YARDIMCI, H. (2010). PCR detection of Shiga toxins, enterohaemolysin and intimin virulence genes of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from faeces of Anatolian Water Buffaloes in Turkey. *Zoonoses and Public Health*, **57**: e33–e37.
- TANZIFI, P., BAHRAMI, A. R., RAHIMI, E. (2015). Study on antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157:H7/NM isolated from raw bovine, camel, water buffalo, caprine and ovine milk. *Research Journal of Recent Sciences*, **4**: 20-22.
- TEKİNŞEN, O. C. (2000). Süt Ürünleri Teknolojisi. *Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya*. ISBN 975-95678 : Sy, 75-100.



- TOSUN, H., GÖNÜL, Ş. A. (2003). *E. coli* O157: H7'nin aside tolerans kazanması ve asidik gıdalarda önemi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **10(1)**: 10-17.
- TREVISANI, M., MANCUSI, R., DONNE, D. G., BACCI, C., BASSI, L., BONARDI, S. (2014). Detection of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine dairy herds in Northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, **184**: 45-49.
- TUTENEL, A. V., PIERARD, D., VANDEKERCHOVE, D., HOOFF, J.V., DE ZUTTER, L. (2003). Sensitivity of methods for the isolation of *Escherichia coli* O157 from naturally infected bovine faeces. *Veterinary Microbiology*, **94**: 341-346.
- TÜRK GIDA KODEKSİ (TGK). (2003). Türk Gıda Kodeksi- Krema Ve Kaymak Tebliği. Tebliğ No: 2003/34, R.G. Tarihi:27.09.2003 R.G. Sayısı:25242. (Erişim Tarihi: 12.03.2016).
- UPTON, P. COIA, J. (1994). Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet*, **344**: 1015.
- UYSAL, H., KINIK, Ö., GÖNÇ, S. (1995). Yoğurda işlenecek sütün özellikleri ve antibiyotiklerin yoğurt teknolojisine ve kalitesine etkileri. 3. *Milli Süt Ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Milli Produktivite Yayınları*, **548**: 26-37.
- WALES, A. D., PEARSON, G. R., BEST, A., COOKSON, A. L., LA RAGIONE, R. M., ROEİ J. M., HAYES, C. M., WOODWARD, M. J. (2005). Naturally acquired attaching and effacing *Escherichia coli* in sheep. *Research in Veterinary Science*, **78**: 109-115.
- WALL, P. G., McDONNELL, R. J., ADAK, G. K., CHEASTY, T., SMITH, H. R., ROWE, B. (1996). General outbreaks of vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in England and Wales from 1992 to 1994. *Communicable Disease Report CDR Review*, **6**: 26-33.
- WANG, G., ZHAO, T., DOYLE, M. P. (1997). Survival and growth of *E.coli* O157:H7 in unpasteurized and pateurized milk. *Journal of Food Protection*, **60**: 610-613.

- WASTESON, Y., ARNEMO, J. M., JOHANSEN, B. K., VOLD, L., MATHIESEN, S. D., OLSEN, M. A., WIIG, Q., DEROCHE, A. E. (1999). Analysis of fecal samples from wild animals for verocytotoxin producing *Escherichia coli* and *Escherichia coli* O157:H7. *Veterinary Record*, **144**: 646-647.
- WATT, B. (1988). *Escherichia coli* O157 a new pathogen. *Microbiological Science*, **5**: 279.
- WELLS, J. G., SHIPMAN, L. D., GREENE, K. D., SOWERS, E. G., GREEN, J. H., CAMERON, D. N., DOWNES, F. P., MARTIN, M. L., GRIFFIN, P. M., OSTROFF, S. M., POTTER, M. E., TAUXE, R. V., WACHSMUTH, I. K. (1991). Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, **29**: 985-989.
- WHIPP, S. C., RASMUSSEN, M. A., CRAY, W. C. (1994). Animals as a source of *Escherichia coli* pathogenic for human beings. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, **204**: 1168-1175.
- WILLKE, A. (2008). *Escherichia coli* ishallerinde etiyoloji ve patogenezi. *Ankem Dergisi*, **22** (2): 188-191.
- WONG, C. S., JELACIC, S., HABEEB, R. L., WATKINS, S. L., TARR, P. I. (2000). The risk of hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *The New England Journal of Medicine*, **342**: 1930-1936.
- WRAY, C., McLAUREN, I.M., RANDALL, L.P., PEARSON, G.R. (2000). Natural and experimental infection of normal cattle with *Escherichia coli* O157. *Veterinary Record*, **147**: 65-68.
- YILSAY, T. Ö., BAYİZİT, A. (2002). Bursa ilinde tüketilen kaymakların mikrobiyolojik özellikleri ve bazı patojen bakterilerin aranması. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **16**: 77-86.

ZHANG, X., MCDANIEL, A. D., WOLF, L. E., KEUSCH, G. T., WALDOR, M. K., ACHESON, D. W. (2000). Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *Journal of Infectious Disease*, **181**: 664-670.

ZHANG, X. CHENG, Y., XIONG, Y., YE, C., ZHENG, H., SUN, H., HONGQING, Z., REN, Z., XU, J. (2012). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* specific enterohemolysin induced IL-1 $\beta$  in human macrophages and EHEC-induced IL-1 $\beta$  required activation of NLRP3 inflammasome. *PLoS ONE*, **7**: e50288. doi:10.1371/journal.pone.0050288.



## ÖZGEÇMİŞ

**ADI:** DİDEM

**SOYADI:** SAĞLAM

**DOĞUM TARİHİ, YERİ:** 24.03.1992, Menemen

**MEDENİ HALİ:** Bekar

**ÜNVANI:** Gıda Mühendisi

**EĞİTİM:**

**İlköğretim:** 1998-2005 Helvacı İlköğretim Okulu, İzmir

**Ortaöğretim:** 2006-2010 Alp Oğuz Anadolu Lisesi, İzmir

**Lisans:** 2010-2014 Afyon Kocatepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Afyonkarahisar

**Yüksek Lisans:** 2014-... (Tez Aşamasında) Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar

Kredi Yurtlar Kurumu Mahfiruz Hatice Sultan Kız Öğrenci Yurdu'nda gıda mühendisi olarak çalışmaktadır.

**E-MAIL:** didemsaglam035@gmail.com

**ADRES:** Marulcu Mah. Hacı Fellahi Cad. Ertaş Apt. No:40 Afyonkarahisar

**YABANCI DİL:** İngilizce

**YÜKSEK LİSANS TEZİ:** Afyonkarahisar'da Satışa Sunulan Afyon Kaymağında *Escherichia coli* O157:H7 Varlığının Araştırılması

**YAYIMLANMIŞ MAKALE:** Yüksek Lisans semineri

SAĞLAM, D., ŞEKER, E. (2016). Gıda kaynaklı bakteriyel patojenler. *Kocatepe Veterinary Journal*, **9(2)**: 105-113.