

SIĞIR VE İSHALLİ İNSAN DİŞKILARI İLE BAZI GIDALARDA *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 VE *stx1/stx2* GEN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Savaş Aslan¹, Mustafa Altındiş², Hilmi Yaman³

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Afyon

²Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Sakarya

³Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksekokulu Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Aydın

ÖZET

Afyonkarahisar ili ve ilçelerinden toplanan 237 sığır dışkısı, 162 süt örneği, 106 sucuk, 103 salata numunesi ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Hastanesi polikliniklerine ishal yakınması ile başvuran 110 hastanın dışkı numunesi üzere toplam 718 örnek, ön zenginleştirme sonrasında Cefixime–Tellurite Sorbitollü MacConkey Agar (CT–SMAC) besiyerine ekilmiş, burada üreyen sorbitolü fermente etmeyen koloniler, konvansiyonel yöntemler ve lateks aglütinasyonu ile tanımlanmıştır.

Sığır dışkılarından 13, süt ve sucuk örneklerinden ise sırasıyla dört ve bir adet olmak üzere toplam 18 adet H

antijeni bulundurmayan *E. coli* O157 izole edilmiş, gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT PCR) (ABI 7500 Fast, England) ile, bu 18 suştan 16'sında (%89) *stx1* ve/veya *stx2* geni saptanmıştır.

Sonuçta, kanlı dışkılama yakınmalı hastalarda *E. coli* O157:H7'nin araştırmasının gerekliliği açıktır. Temas ile hayvanlar ve çevresinden kontaminasyonun önlenmesinde gıda hijyen kurallarına özen gösterilmelidir.

Anahtar kelimeler: *E. coli* O157/H7, gastroenterit, süt, et, salata, sucuk. *Nobel Med* 2016; 12(3): 17-23

AN INVESTIGATION OF *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 AND *stx1/stx2* GENE IN FAECES FROM CATTLE/DIARRHEIC PATIENTS AND SOME FOODS

ABSTRACT

In this study, toxin genes in the 718 samples in total, feces samples of 110 diarrheic patients from University Hospital beside 103 salad samples, 106 sausage specimens, 162 raw milk, 237 animal feces gathered in Afyonkarahisar city, after pre-enrichment produces in the Cefixime–Tellurite Sorbitol MacConkey Agar, selecting colony that does not ferment sorbitol was defined by conventional methods and latex agglutination.

In the results, from 13 cattle feces, four milk and one sausage samples totally total of 18 samples not contain of H antigen, including a number of *E. coli* O157 isolated, by Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT PCR) (ABI 7500 Fast, England), from the 16/18 strains (89%) *stx1* and/or *stx2* gene has been identified.

Eventually, it is required to search for *E. coli* O157:H7 in patients with bloody stool. Good hygiene and hand washing before eating and preparing food is required to prevent contamination from contact with animals and their surroundings.

Keywords: *E. coli* O157/H7, gastroenteritis, raw milk, meat, salad, sausage. *Nobel Med* 2016; 12(3): 17-23

GİRİŞ

Genellikle insanlar ve sıcakkanlı hayvanlar ile kuşların normal bağırsak florasında bulunan *Escherichia coli*'nin bazı suşları toksin üreterek ciddi enfeksiyonlara sebep olurken toksin üreten *E. coli* türleri Shiga–toksin üreten *E. coli* (STEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), verosinotoksin üreten *E. coli* (VTEC) veya Shiga–toksin *E. coli* (STEC) olarak isimlendirilir. Sığırlar *E. coli* O157:H7 için önemli bir rezervuar kaynağıdır.¹ Avusturya'da meydana gelen gıda kaynaklı 438 salgında 1715 bireyin etkilendiği, 286 bireyin hastaneye yatırıldığı ve birinin ölümüne neden olduğu salgınların %1,3'ünden EHEC sorumlu tutulmuştur.² STEC'in neden olduğu gıda kaynaklı salgınlara, kontamine olan az pişmiş et ve et ürünleri, çiğ süt ve süt ürünleri, sebzeler, meyveler ve su tüketimi neden olmaktadır.³⁻⁵ *E. coli* O157, patojenik *E. coli* türlerinin bulunduğu grubun en yaygın üyesidir.¹ Çeşitli klinik tablolara neden olan bu bakterinin virulans faktörleri arasından shiga toksin, intimin ve hemolizin en önemlileridir. *E. coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae* tip 1'in ürettiği "shiga toksin" ile homolog yapıda "shiga benzeri toksin 1 (stx1)" ve "shiga benzeri toksin 2 (stx2)" olarak adlandırılan iki farklı toksin üretir ve bu toksinler, HeLa (Henrietta Lacks servikal kanser hücreleri–servikal adenokarsinom hücresi) ve Vero doku kültürlerinde toksik etki gösterirler. Shiga toksin, endotelial hücrelerin protein sentezine ve kan damarlarına zarar vererek, trombotik mikroanjyopati, hemoliz, trombositopeni, insanlarda böbrek yetmezliği ve Hemolitik Üremik Sendrom (HUS) gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilmektedir.⁶

Shiga–toksin üreten *E. coli*'nin kontamine olmuş farklı gıda ürünlerinin tüketimi ile insanlarda enfeksiyona neden olmaktadır. Bu amaçla bu çalışmada bazı gıda numunelerinde (çiğ süt, sucuk ve salata) ve ishal yakınmalı hastalarda *E. coli* O157:H7 suşlarının dağılımı ve EHEC toksin genlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

1. GEREÇ

Afyonkarahisar ilinde Şubat–Ağustos 2014 tarihleri arasında yürütülmüş bu çalışmada sığır dışkısı, çiğ süt, sucuk, salata ve ishali hasta dışkı numunelerinden oluşan toplam 718 numunede *E. coli* O157/O157:H7 suşlarının dağılımı ve EHEC toksin genlerinin varlığı araştırılmıştır.

1.1. Sığır Dışkı Numunesi

Bölgede herhangi bir tedavi uygulanmayan yaşları 2–4 arasında rastgele seçilmiş 237 sığırın dışkı numunesi,

taze dışkı şeklinde steril plastik numune kaplarına alınarak (yaklaşık 100–125g) uygun koşullarda laboratuvara getirilmiş ve aynı gün işleme alınmıştır.

1.2. Sığır Süt Numunesi

Çalışmada, herhangi bir tedavi uygulanmayan yaşları 2–4 arası rastgele ineklerden alınmış 162 süt örneği, steril plastik numune kaplarına aseptik şartlarda alınarak (yaklaşık 200–300ml) soğuk zincir koşullarında laboratuvara getirilmiş ve hemen işleme alınmıştır.

1.3. Sucuk Numunesi

Araştırma kapsamında market ve kasaplardan toplam 106 tüketime hazır sucuk numunesi temin edilmiş, etilen oksitle steril edilen poşetlere aseptik şartlarda alınarak (yaklaşık 200–300g) soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırılmış ve değerlendirilmiştir.

1.4. Salata Numunesi

Lokantalar, fast–food zincir restoranlar, "catering" firmaları, yemek satan Pazar yeri büfe ve seyyar satıcılarından toplam 103 tüketime hazır salata numunesi, tüketime sunulduğu hazır şekilde (marul, domates, havuç, roka, maydanoz, soğan, mor lahanaya) steril poşetlere aseptik şartlarda alınarak (yaklaşık 100–200g) soğuk zincir ile laboratuvara ulaştırılarak çalışmaya alınmıştır.

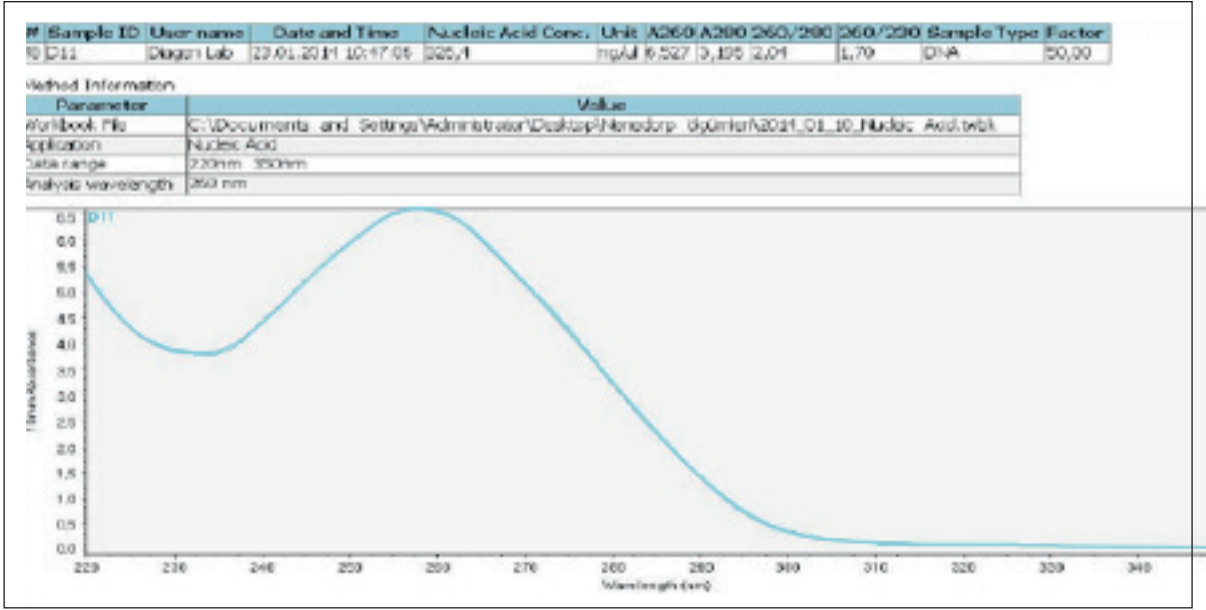
1.5. İnsan Dışkı Numunesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi Hastanesi polikliniklerine başvuran ishali hastalardan elde edilen 110 dışkı numunesi, Carry–Blair besiyeri ile laboratuvara taşınmış ve mikrobiyolojik açıdan irdelenmiştir. Hastaların yaş dağılımına bakıldığında %58,1 (64/110)'i 5 yaş altı, %35,4'ü 6-15 yaş arası ve %24,5'i de 15 yaş üstü şeklinde olup %64,5'i (71/110) de erkektir. Çalışmaya dâhil edilme kriteri olarak; hastalardan on beş günden kısa süreli, günde 3 veya daha fazla, sulu, yumuşak kıvamı dışkılaması olanlar akut ishali olgular alınmıştır. Kronik ishali olan gastrointestinal patolojili hastalar, malign hastalığı veya malabsorbsiyonu bulunanlar çalışmaya kabul edilmemiştir.

2. YÖNTEM

2.1. Bakteri İzolasyonu

Hasta ve sığır dışkı örneklerinden bakteriyel zenginleştirme amacıyla, her bir dışkı örneği, içerisinde 9ml 20mg/lt Novobiocin (Oxoid SR 0181E, England) katkılı Tryptone Soy Broth (mTSB) (Oxoid, CM 0129, England) bulunan steril tüpe 1g eklenerek vorteksle



Şekil 1. DNA ekstraksiyonu optik yoğunluğu

1 dakika süreyle homojenize edilmiş ve 37°C'de 18–24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Gıda numunelerinde ise bakteriyel zenginleştirme amacıyla, her bir gıda örneği steril stomacher torbalarına 25'er g tartılarak üzerine 225ml mTSB eklenerek stomacherda 2 dakika süreyle homojenize edilmiş ve homojenizat 37°C'de 18–24 saat için inkübe edilmiştir.

Bakteriyel zenginleştirmede insan, sığır ve gıda numunelerindeki uygulamalar kısmen farklı olup çalışmanın devamındaki izolasyon basamakları benzerdir. Bakteriyel zenginleştirme amacı ile inkübasyona bırakılan homojenizattan inkubasyon sonrası bir öze dolusu alınarak Cefixime–Tellurite Selective Supplement (Oxoid, SR 0172E, England) içeren Sorbitol MacConkey Agar'a (Oxoid CM 0813, England) çizim yöntemi ile ekimi yapılmış ve 37°C'de 18–24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda sorbitol aktivitesi negatif (renksiz koloni) kolonilerden 4–5 koloni seçilerek indol testi (Tryptone Broth SRL M015, India; Kovac's Indole Reagent Himedia, India) yapılmıştır. İndol testi pozitif kolonilerin β–glukoronidaze aktivitesini belirlemek için 4–methyumbelli–phenylglucuronide ilave edilmiş Violet Red Bile Agar'a (Oxoid, CM 0978) çizim yöntemi ile ekimleri yapılarak ve 37°C'de 18–24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üreyen ve UV testi (Herolab UVT–20 M, Germany) (366 nm) negatif olan tipik bakteri kolonilerden (renksiz koloni) alınarak Nutrient Agar'a (Himedia M001, India) pasaj yapılmış ve 37°C'de 18–24 saat inkübe edilmiştir. Gelişen kolonilerden biyokimyasal ve antijenik testler yapılmıştır. Elde edilen kolonilerden 1–2 koloni alınarak beyaz zemin üzerinde 40µl steril fizyolojik su içerisinde süspanse edilmiştir. Süspanسیونun üzerine 40µl O157 lateks aglütinasyon test kiti (Wellcolex *E.*

coli O157:H7, Remel, UK) anti serumu ile karıştırılarak muamele edilmiş ve 60 saniye içerisinde oluşan aglütinasyon pozitif olarak değerlendirilmiştir. İndol, Metil–kırmızısı, Kligler testleri pozitif, sitrat, üre, sorbitol ve β–glukoronidaz testleri yapılmış ve O157 lateks testi ile aglütinasyon veren koloniler *E. coli* O157 olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, inkübasyon sonrası gelişen sorbitol ve β–glukoronidaze pozitif kolonilerin morfolojisi ve gram boyama özellikleri kontrol edilerek İndol, Metil–Kırmızısı, Laktöz fermentasyonu (Kligler Testi) pozitif, Sitrat ve Üre testi, Voges–Proskauer reaksiyonu negatif olan koloniler *E. coli* olarak değerlendirilmiştir.

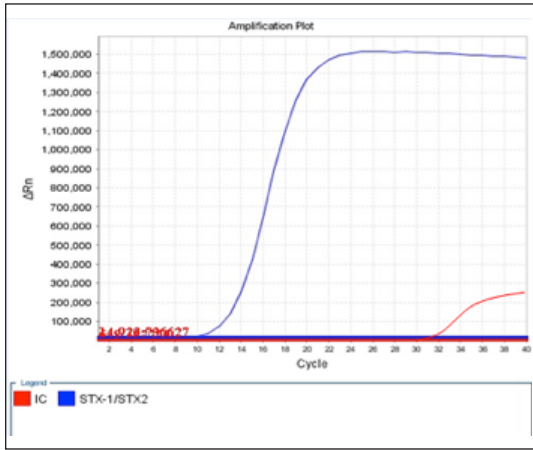
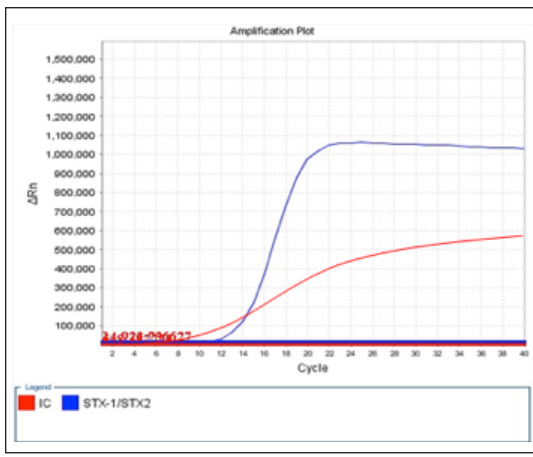
2.2. DNA Ekstraksiyonu

Üretici firma önerileri doğrultusunda; örneklerden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Nutrient agarda saf suştan 1–3 koloni, ependorf tüp içinde bulunan 3–5ml su (Nucleases Free) içinde homojenize edilmiş, 2dk oda ısısında 6000xg'de santrifüj edilerek ve tüpün dibinde kalan peletin üzerine 10µl lizozim eklenerek 37°C'de 20dk inkübe edilmiş, sonrasında santrifüj edilerek dipte kalan peletin üzerine 180µl Buffer R2 ve 20µl Proteinaz K ilave edilerek her 5dk'da bir karıştırılmak üzere 65°C'de 20dk inkübe edilmiştir. Sonunda 20µl RNase ilave edilmiş, homojenize edildikten sonra 65oC'de 10dk inkübe olması sağlanmış, saf etanolden 200µl ilave ile karıştırılmış, birkaç yıkama ve santrifüj sonrasında solüsyon halindeki DNA ekstraksiyonu elde edilmiştir. Elde edilen DNA ekstraktlarının miktar ve kalitesi (NanoDrop 2000C, UV–Vis Spectrophotometer, ThermoScientific, US) ölçülmüştür (Şekil 1).

2.3. PCR Prosedürü

Elde edilen DNA ekstraktları ile PCR (EHEC RT PCR Kit, Shanghai ZJ Bio–Tech Co, China) çalışması yapılmıştır.

SIĞIR VE İSHALLİ İNSAN DİŞKILARI İLE BAZI GIDALARDA ESCHERICHIA COLI O157:H7 VE stx1/stx2 GEN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI



Sample Name	Target Name	Reporter	Cm	Shiga Toxin	Sample Name	Target Name	Reporter	Cm	Shiga Toxin
MIXA	IC	VIC	4,313701153		MIXB	IC	VIC	31,86045265	
MIXA	STX1	FAM	10,90959644	+	MIXB	STX2	FAM	9,625151634	+

IC: Internal Kontrol FAM: 6-Fluorescein amidite VIC: Fluorescent Dyes

Şekil 2. Real-Time PCR EHEC *stx1* ve *stx2* pozitif

Stx1 geni için;

F- Primer 5'-AGTCGTACGGGGATGCA GATAAAT-3',

R- Primer 5'-CCGGACACATAGAAGGAAACTCAT-3' (418bp),
stx2 geni için;

F- Primer 5'-TTCCCAATGCAAATCAGTC-3',

R- Primer 5'-CGATACTCCGGAAGCACATTG-3' (246bp) primer çifti kullanılmıştır.⁷

Üretici firma önerileri doğrultusunda, reaksiyon Mix A (*stx1*) (35µl), Enzim Mix (0,4µl) ve internal kontrol (1µl) her bir reaksiyon için belirtilen miktarlarda alınarak Master Miks (36,4µl) elde edilmiştir. Hazırlanan Miks ve pozitif kontrol PCR (ABI 7500 Fast, England) cihazında çalışılarak EHEC şüpheli suşlara ait olan *stx1* ve *stx2* genleri belirlenmiştir (Şekil 2).

BULGULAR

Bu çalışmada konvansiyonel yöntem ile incelenen sığırdışkı numunesinin %26,5'inde, çiğ süt numunesinin %19,7'sinde, sucuk numunesinin %12,2'sinde, 103

salata numunesinin %16,5'inde sorbitol negatif *E. coli* O157 şüpheli izolatlar tespit edilmiştir.

Şüpheli izolatlar Lateks Aglutünasyon Yöntemi ile araştırılarak sığırdışkı numunesinin %5,4'ünde, çiğ süt numunesinin %2,4'ünde, sucuk numunesinin %0,9'unda *E. coli* O157 belirlenirken salata numunelerinin hiçbirinde *E. coli* O157 belirlenememiştir. Ayrıca virulans faktörlerinden biri olan shiga toksin varlığı Real Time PCR ile incelendiğinde, sığırdışkı numunesinin % 20,6'sında, çiğ süt numunesinin % 10,4'ünde, sucuk numunesinin %1,8'inde, salata numunesinin %2,9'unda görülmüştür (Tablo).

Çalışmamızda farklı numune tiplerinde belirlenen 18 *E. coli* O157 izolatında *stx* gen varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmada ishali hastaların dışkı numunesinde ve salata numunesinde *E. coli* O157/O157:H7 varlığı tespit edilemezken sığırdışkı numunesinde %15,4 oranında *stx1*, %23,0 oranında *stx2* ve %46,1 oranında *stx1/stx2* gen varlığı belirlenirken çiğ süt numunesinde %25 oranında *stx1*, %50 oranında *stx2* ve %25 oranında *stx1/stx2*; sucuk numunesinde ise %100 oranda *stx1/stx2* geni tespit edilmiştir. *Stx* varlığı, hemen hemen tüm *E. coli* O157 izolatlarında belirlenirken sadece sığırdışkı numunelerinden elde edilen 2 izolatta negatif olarak tespit edilmiştir. Ayrıca sığırdışkı numunelerinde %4,6 oranında, çiğ süt numunelerinin %2,4'ünde ve sucuk numunelerinin %0,9'unda saptanmıştır. *E. coli* O157 izolatına ait *stx* genine rastlanılmıştır.

TARTIŞMA

E. coli'nin, gıdalarda ve sularda varlığı fekal kontaminasyon indikatörü olarak oldukça önemlidir. Bununla birlikte bazı *E. coli* türleri Shiga toksin olarak isimlendirilen bir toksin üreterek hastalığa neden olmaktadır. Bu toksini üreten bakteriler Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) veya verotoksijenik *E. coli* (VTEC) olarak isimlendirilirler ve salgıladıkları sitotoksinlerle insanlarda hemorajik kolit gelişimine neden olmaktadır. Bunlardan, gıda kaynaklı salgınlara yol açan ve hatta ölümlere neden olabilen *E. coli* O157/O157:H7 son yıllarda daha çok önem kazanmıştır. Yapılan çalışmalarda Sırbistan'da 115 sığırdışkı örneğinin %2,6'sında O157 antijeni, Güney Afrika'da enfekte 40 numunenin %55'inde *E. coli* O157:H7 antijeni ve %37,5'inde *stx* geni, Amman'da 180 insan dışkı örneğinin %10'unda O157 antijeni, %9,4'ünde H7 antijeni ve %8,3'ünde *stx* geni, Kayseri'de 500 dışkı örneğinin %4,6'sında O157 antijeni ve %0,2'sinde *stx2* geni, Ege Bölgesi'nde 150 dışkı örneğinin %2'sinde O157 antijeni, %1,3'ünde H7 antijeni, Elazığ'da 540 sığırdışkı numunelerinin %6,3'ünde O157 antijeni, %4'ünde H7 antijeni ve 5 izolatta *stx* genini belirlenirken, Yunanistan'da 140 ishali dışkı numunesinin hiç-

birinde *E. coli* O157:H7 serotipi gösterilememiştir.⁸⁻¹⁴. Bu çalışmada sığır dışkı numunelerindeki *E. coli* O157/O157:H7 varlığı bölgede yapılan araştırma verileri ile uyumlu bulunmuş, belirlenen izolatlarda H7 antijenine rastlanmaması ise Aydın ve ark.'nın (2010) araştırması ile benzer olarak değerlendirilmiştir.^{9,11,13} İzolatlarda görülen *stx* varlığı da ilgili çalışmalar ile benzer oranlarda bulunmuştur.⁹⁻¹⁴

Rehberler gaita örneklerinde *E. coli* O157/H7 kültürü ile birlikte toksin varlığının araştırılmasını da önermektedir. Salgınlar neden olabildiğinden ülkemizde, 2005 yılından itibaren laboratuardan bildirim zorunlu etken olarak sınıflandırılmıştır. İnsidansındaki düşüklük sebebiyle *E. coli* O157/H7 varlığının rutin gaita kültürleri yerine sadece kanlı dışkılaması olan hastalarda araştırılmasının hem maliyet hem de epidemiyolojik açıdan daha efektif olacağı düşünülmektedir.⁶ *E. coli*'nin varlığı besinde mutlaka enterik patojenlerin bulunacağı anlamına gelmediği gibi, aynı şekilde, bir gıdada enterik bir patojenin varlığı da, bu gıdada *E. coli*'nin var olduğunu göstermez. Çiğ süt numunesi ile yapılan çalışmalarda Yunanistan'da 100 çiğ süt örneğinden 99'unda, Türkiye'de 100 çiğ süt örneğinin hiçbirinde *E. coli* O157/H7 izolatına, Hindistan'da ise, %12'sinde *stx* geni bulunan, 50 numunenin hiçbirinde O157 antijenine rastlanmamıştır.¹⁵⁻¹⁷ Bununla birlikte, Çek Cumhuriyeti'nde 225 örneğin %1,7'sinde *E. coli* O157/O157:H7, Mısır'da 480 örneğin %0,83'ünde *E. coli* O157:H7'ye ait *stx* geni, Tekirdağ'da 100 süt örneğinin %1'inde *E. coli* O157, Ege Bölgesi'nde, %0,6'sında *stx* geni tespit edilen, 150 süt numunesinin %2'sinde O157 antijeni, %1,3'ünde H7 antijeni saptanmış.^{12,18-20} Kayseri'de 500 süt numunesinin %2'sinde *E. coli* O157:NM varlığı rapor edilirken herhangi bir H7 antijeni tespit edilmemiştir.¹¹

Bu çalışmada elde edilen izolatlardaki *stx* gen varlığı Virpari ve ark.'nın (2013) çalışmalarına göre düşük, Aydın ve ark. (2010), Çiçek ve Savaşan (2010), Lukášová ve ark. (2004) ve Ahmed ve Shimamoto'nun (2014) araştırma sonuçlarına göre daha yüksek olarak belirlenmiştir.^{11,17-19}

Fermente et ürünlerinde *E. coli* O157:H7 araştırılan farklı bölge çalışmaları irdelendiğinde; Çek Cumhuriyeti'nde yapılan bir çalışmada 15 sosis numunesinde, Bursa kökenli çalışmada 5 salam ve 9 sosis numunesinde, yine ülkemizde, İstanbul'da yapılan bir çalışmada incelenen sosis örneklerinde *E. coli* O157 antijeni belirlenmezken Arjantin'deki bir çalışmada sosis örneklerinin %3'ünde STEC suşları, %2'sinde *stx* genine sahip *E. coli* O157:H7 suşu, Sırbistan'da 48 sosis numunesinin %2,1'inde *E. coli* O157, İtalya'da 51 fermente sosis numunesinin %72,5'inde STEC, %78,4'ünde *stx* varlığı rapor edilmiştir.^{8,18,20-23}

Numune	Lateks Aglutinasyon <i>E. coli</i> O157		O157 suşlarında saptanan <i>stx</i> genleri (n:18)		
	Sayı	%	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1/stx2</i>
			Sayı	Sayı	Sayı
Numune Tipi (n)					
Sığır Dışkısı (237)	13	5.5	2/13	3/13	6/13
Süt (162)	4	2.4	1/4	2/4	1/4
Sucuk (106)	1	0.9	0	0	1/1
Salata (103)	0	0.0	0	0	0
İnsan Dışkısı (110)	0	0.0	0	0	0
TOPLAM (718)	18	2.5	3	5	8

Bu çalışmada izole ettiğimiz suşlarda *stx* varlığı Oteiza ve ark. (2006), Rantsiou ve ark. (2012) sonuçlarından daha düşük, Lukášová ve ark. oranlarından daha yüksek belirlenmiştir.^{18,22,23} Çalışmalar arasındaki bu farklılıklar, araştırmanın yapıldığı bölgelerdeki hayvanların barsak florasındaki ve çalışılan yöntemlerin duyarlılıkları arasındaki farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir.

Sebze/salata numuneleri ile yapılan farklı çalışmalarda, Norveç'ten bir çalışmada 890 sebze numunesinde *E. coli* O157, İspanya araştırmasında 300 sebze numunesinin tamamında *E. coli* O157:H7, Singapur'da sebze/meyvelerden oluşan 125 numunede *E. coli* O157:H7, Çek Cumhuriyeti'nde 51 salata numunesinde *E. coli* O157/O157:H7, Ankara'dan bir çalışmada incelenen sebze numunelerinin tamamında *E. coli* O157:H7 saptanmamıştır.^{18,24-27} Bu çalışmada da benzer şekilde O157/O157:H7 antijeni belirlenmemiştir. Bununla birlikte, Peru'da 101 sebze örneğinin %3,9'unda *E. coli* O157, Malezya'da 230 organik numunenin %5,2'sinde *E. coli* O157:H7, Yunanistan'da 60 sebze numunesinin %5'inde, *stx* geni taşımayan *E. coli* O157:H7, İstanbul'da 180 sebze numunesinin %7,2'sinde STEC, %1,6'sında O157 antijeni, %6,1'inde *stx* genin varlığı belirlenmiştir.^{14,28-30}

Farklı ülkelerde meydana gelen *E. coli* O157/O157:H7'nin sorumlu tutulduğu bazı EHEC salgınlarında vakaların sosis, ispanak, su teresi, kıyma gibi gıda tükettikleri ve genellikle gıda kaynaklı salgınlarda vakaların yüksek oranlarda olduğu görülmektedir.³¹ Güney Afrika'da 20 insan dışkı örneğinin 1'inde *stx* geni taşıyan *E. coli* O157:H7, Boston Çocuk Hastanesi'nde 5110 çocuk hastanın %0,9'unda STEC, %0,6'sında *E. coli* O157:H7, %0,9'unda *stx* varlığı, Nijerya'da farklı yaşlardaki sağlıklı ve gastrointestinal yakınması olan 1000 bireyin %2,7'sinde *E. coli* O157:H7, Erdoğan ve ark. (2011) Alanya'da gastroenteritli 1815 olgunun %0,1'inde *stx* üreten *E. coli* O157:H7, Doğu Anadolu'da Kalın ve ark. (2012) 367 dışkı numunesinin %2,7'sinde *stx* üretmeyen *E. coli* O157 izolatını belirlemiştir.^{9,32-35} Pinaka ve ark. (2013) Yunanistan'da 667 ishali dışkı

SIĞIR VE İSHALLİ İNSAN DIŞKILARI İLE BAZI GIDALARDA ESCHERICHIA COLI O157:H7 VE *stx1* / *stx2* GEN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

örneğinde rfbEO157, fliCh7 ve stx genini, Virpari ve ark. (2013) Hindistan'da 100 ishali hastada rfbO157 genini belirleyemezken %15'inde stx genini göstermişlerdir.^{14,17} Ateba ve Mbewe (2011), Pinaka ve ark. (2013), Hermors ve ark. (2011) ve Isibor ve ark. (2013) çalışmalarında *E. coli* O157/O157:H7 suşunu izole ederlerken bu çalışmada Virpari ve ark.'nın (2013) araştırmaları ile benzer şekilde O157 ve H7 antijenine rastlanmamıştır.^{9,14,17,32,33} Araştırmada izole edilen suşlarda shiga toksin (stx) varlığı Virpari ve ark. (2013) bulgularından düşük, Ateba ve Mbewe (2011), Pinaka ve ark. (2013) ve Hermors ve ark.'nın (2011) saptadığı verilerden yüksek oranda belirlenmiştir.^{9,14,17,32} Tespit edilen suşlarda *E. coli* O157/O157:H7 suş varlığının Yeniiz ve ark. (2009), Erdoğan ve ark. (2011), İşeri ve ark.'nın (2009) çalışmalarıyla benzer olduğu tespit edilmiştir.^{34,36,37}

E. coli O157/H7 kliniğinde sıklıkla, ciddi abdominal ağrı (>%90), diyare (>%60 ciddi) ve hemorajik kolit (>%25 kanlı diyare) görülmektedir. Ateş çocuklarda yaygın bir bulgu olmamakla birlikte erişkinlerde daha da nadirdir.³⁸ Bu çalışmada, tüm hastalar dikkate alındığında, karın ağrısı en çok karşılaşılan hastalık bulgusu iken ikinci sırayı ateş almıştır. Ayrıca, 5 yaş altı çocuklarda, özellikle ateş ve ishal daha çok karşılaşılan bulgular olup erişkin yaşlarda sıklıklarının azaldığı belirlenmiştir. İleri yaştaki (>15 yaş) hasta grubumuzun klinik semptomları literatür bilgileri ile daha uyumlu bulunmuştur.

SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsanlar, direkt temas yoluyla patojeni taşıyan hayvanların dışkılarıyla, kontamine su ve toprakla, az pişmiş ya da çiğ et ve et ürünleri ya da diğer hayvansal ürünler ile kontamine sebze ve meyvelerin tüketimi ile enfekte olabilmektedir. *E. coli* O157/O157:H7 minimal enfeksiyon dozu düşük olup insanlar enfekte hayvan dışkısı ile kontamine eşyalara temasla, kontamine su

ve toprakla, az pişmiş ya da çiğ et ve et ürünleri ya da diğer hayvansal ürünler ile kontamine sebze ve meyvelerin tüketimi ile etkeni alabilmektedirler. Çalışmada örneklerde farklı oranlarda *E. coli* O157 varlığı saptanırken H7 antijeni tespit edilememiştir. Çalışmada H7 serotipinin saptanamamasını mevsimsel ve dönemsel nedenler ile açıklamak mümkündür. Bunun yanı sıra EHEC toksin genlerinin ve *E. coli* O157 izolatının farklı oranlarda varlığı potansiyel bir enfeksiyon kaynağını oluşturmaktadır. Bu çalışmada ve diğer ülke verilerinde sığırlarda ve bazı gıdalardaki *E. coli* O157 ve EHEC stx oranlarının farklı saptanması; hayvanların beslenme özellikleri, coğrafi dağılımı, süt sağım sırasında uygulanan yöntem ve kullanılan ekipmanın hijyeni, bakteriyel izolasyon yöntemlerindeki farklılık ve işletmelerdeki personelin hijyen kurallarına dikkat etmesi ile ilişkilendirilebilir. Öneriler;

1. Gıda ürünlerin mikrobiyolojik kalitesinin artırılması gerekmektedir.
2. Mikroorganizma ile kontamine olması muhtemel çiğ, az pişmiş et ve et ürünleri ile çiğ süt ya da pastörize edilmemiş süt tüketilmemelidir.
3. Mikroorganizma ile kontamine olmuş su ile sulanmış ya da kontamine dışkı ile gübrelenmiş sebze ve meyveler temiz su ile bol bol yıkanarak tüketilmelidir.
4. Kontaminasyona açık olan gıda üretim yerlerinde çalışan personel hijyen kurallarına uymalı, gıda hijyen eğitimi verilmelidir.
5. Hayvanların beslenmesinde kontamine yem ve su kullanılmamalıdır.

* Yazarlar herhangi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmadıklarını bildirmiştir.

G	İLETİŞİM İÇİN: Mustafa Altındış Sakarya Üniversitesi, Tıp Fak Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Dekanlık Binası KORUCUK/SAKARYA maltindis@gmail.com
✓	GÖNDERİLDİĞİ TARİH: 28 / 09 / 2015 • KABUL TARİHİ: 03 / 02 / 2016

KAYNAKLAR

1. Pennington H. *Escherichia coli* O157. Lancet 2010; 376: 1428-1435.
2. Much P, Pichler J, Kasper SS, Allerberger F. Foodborne outbreaks, Austria. Wiener Klinische Wochenschrift 2009; 121: 77-85.
3. Magwira CA, Gashe BA, Collison EK. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* O157:H7 in beef products from retail outlets in Gaborone, Botswana. J Food Prot 2005; 68: 403-406.
4. Denny J, Bhat M, Eckmann K. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with raw milk consumption in the Pacific Northwest. Foodborne Pathog Dis 2008; 5: 321-328.
5. Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, et al. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. Environ Microbiol 2010; 12: 2385-2397.
6. Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). Vet Microbiol 2010; 140: 360-370.
7. Heijnen L, Medema G. Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. J Water Health 2006; 4: 487-498.
8. Nastasijevic I, Mitrovic R, Buncic S. The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. Meat Sci 2009; 82: 101-105.
9. Ateba CN, Mbewe M. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: public health implications. Res Microbiol 2011; 162: 240-248.
10. Osaili TM, Alaboudi AR, Rahalah, M. Prevalence and antimicrobial

- susceptibility of *Escherichia coli* O157:H7 on beef cattle slaughtered in Amman abattoir. *Meat Sci* 2013; 93: 463-468.
11. Aydın F, İca T, Yontar A. Kayseri yöresinde süt sığırlarında *Escherichia coli* O157:H7'nin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle araştırılması. *Sağ Bil Derg* 2010; 19: 159-166.
 12. Çiçek E, Savaşan S. Ege Bölgesi'ndeki sığırların süt ve dışkı örneklerinden *Escherichia coli* O157:H7 izolasyonu ve verotoksinlerinin belirlenmesi. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg* 2010; 21: 51-56.
 13. Kalender H. Isolation, Virulence Genes and Antimicrobial Susceptibilities of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 from Slaughtered Cattle in Abattoirs and Ground Beef Sold in Elazığ. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2013;19: 461-467.
 14. Pinaka O, Pournaras S, Mouchtouri V, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Central Greece: revalence and virulence genes of O157:H7 and non-O157 in animal feces, vegetables, and humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32: 1401-1408.
 15. Dontorou C, Papadopoulou C, Filioussis G, et al. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *Int J Food Microbiol* 2003; 82: 273-279.
 16. Ertas N, Gonulalan Z, Yıldırım Y, et al. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic separation and mPCR in Turkish foods of animal origin. *Lett Appl Microbiol* 2013; 57: 373-379.
 17. Virpari PK, Nayak JB, Brahmabhatt MN, Thaker HC. Study on isolation, molecular detection of virulence gene and antibiotic sensitivity pattern of *Escherichia coli* isolated from milk and milk products. *Vet World* 2013; 6: 541-545.
 18. Lukášová J, Abraham B, Cupáková Š. Occurrence of *Escherichia coli* O157 in Raw Material and Food in Czech Republic. *J Vet Med* 2004; 51: 77-81.
 19. Ahmed AM, Shimamoto T. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. *Int J Food Microbiol* 2014; 168-169: 57-62.
 20. Temelli S, Eyigor A, Anar Ş. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in red meat and meat products determined by VIDAS ECPT and LightCycler PCR. *Turk J Vet Anim Sci* 2012; 36: 305-310.
 21. Bingol EB, Dumen E, Kahraman T, et al. Prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in meat and meat products consumed in Istanbul. *Med Weter* 2013; 69: 488-491.
 22. Oteiza JM, Chinen I, Miliwebsky E, Rivas M. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (morcillas). *Food Microbiol* 2006; 23: 283-288.
 23. Rantsiou K, Alessandria V, Cocolin L. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food products of animal origin as determined by molecular methods. *Int J Food Microbiol* 2012; 154: 37-43.
 24. Johannessen GS, Loncarevic S, Kruse H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *Int J Food Microbiol* 2002; 77: 199-204.
 25. Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Viñas I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int J Food Microbiol* 2008; 123:121-129.
 26. Seow J, Agoston R, Phua L, Yuk HG. Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. *Food Control* 2012; 25: 39-44.
 27. Mercanoğlu B, Aytac SA. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in various foods in Turkey: a study on the use of the IMS technique. *Arch Lebensmittelhyg* 2006; 57: 76-79.
 28. Mora A, León SL, Blanco, M, et al. Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). *Int J Food Microbiol* 2007; 114: 204-210.
 29. Chang WS, Afsah-Hejri L, Rukayadi, Y, et al. Quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in organic vegetables and chickens. *Int Food Res J* 2013; 20: 1023-1029.
 30. Özpınar H, Turan B, Tekiner, İH, et al. Evaluation of pathogenic *Escherichia coli* occurrence in vegetable samples from district bazaars in Istanbul using real-time PCR. *J Appl Microbiol* 2013; 57: 362-367.
 31. Launders N, Byrne L, Adams N, et al. Outbreak of Shiga toxin-producing *E. coli* O157 associated with consumption of watercress, United Kingdom, August to September 2013. *Eurosurveillance* 2013; 18: 1-5.
 32. Hermos CR, Janineh M, Han LL, Mcadam AJ. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Children: Diagnosis and Clinical Manifestations of O157:H7 and Non-O157:H7 Infection. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 955-959.
 33. Isibor JO, Ekundayo AO, Ohenhen RE, Orhue PO. *Escherichia coli* O157:H7- Prevalence and Risk Factors of Infection in Edo State, Nigeria. *American J Res Commun* 2013; 1: 35-49.
 34. Erdoğan H, Levent B, Erdoğan A, Güleşen R, Arslan H. Gastroenteritli olgularda verotoksijenik *Escherichia coli* O157:H7 insidansının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45: 519-525.
 35. Kalın R, Ongor H, Cetinkaya B. [2012]. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 from broiler and human samples. *Foodborne Pathog Dis.* 2012; 9: 313-318.
 36. Yeniiz E, Öncül O, Çavuşlu Ş. [2009]. İshalli hastaların dışkılarında *Escherichia coli* O157:H7 varlığının araştırılması. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009; 29: 1398-1405.
 37. İşeri L. Verotoxin-Producing *Escherichia coli* in Faecal Specimens of Patients with Diarrhea in Malatya-Turkey. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009; 29: 987-990.
 38. Torso LM, Voorhees RE, Forest SA, et al. *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak Associated with Restaurant Beef Grinding. *J Food Prot* 2015; 78: 1272-1279.