

**ETLERDE E. Coli O157:H7  
ARANMASI**

**NALAN YAMAN**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**Anadolu Üniversitesi**  
**Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Biyoloji Anabilim Dalı**

**OCAK-2004**

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca kabul edilen 011071 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nalan YAMAN' nın ETLERDE *E. coli* O157:H7 ARANMASI başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 07.01.2004 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Üye : Doç. Dr. Kıymet GÜVEN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nalan YILMAZ-SARIÖZLÜ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ..15.01.2004.... tarih ve ..2/1..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü  
**Prof. Dr. Orhan ÖZER**  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
40000

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ETLERDE *E. COLI* O157:H7 ARANMASI

NALAN YAMAN

Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

2004, 66 sayfa

*E. coli* O157:H7 hemolitik üremik sendromlara ve hemorojik diyareye sebep olan ve besin ile taşınan önemli bir patojendir. Çoğu salgında, *E. coli* O157:H7 ile kontamine olmuş etlerin tüketimi yolu ile insanlara taşınmaktadır. Bu nedenle bu bakterinin etlerdeki varlığının hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilmesi son derece önem taşımaktadır.

Bu çalışmada Eskişehir ilinde tüketime sunulmuş olan et ve et ürünlerinde *E.coli* O157:H7 varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla kültürel yöntemler, İmmunomagnetik ayırma ve Polimeraz Zincir yöntemleri kullanılmıştır. IMS ile birlikte PCR yönteminin kullanılmasının hızlı ve güvenilir sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *E. coli* O157 H7, IMS, PCR, Et ve et ürünleri, Gıda Mikrobiyolojisi

**ABSTRACT****Master of Science Thesis****DETECTION OF *E. COLI* O157:H7  
IN MEAT PRODUCTS****NALAN YAMAN****Anadolu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Program****Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ****2004, 66 pages**

*E. coli* O157:H7 is a foodborne pathogen which causes hemolytic and hemorrhagic diarrhea. In most cases, *E. coli* O157:H7 infections are connected with the consumption of contaminated meat products. Therefore accurate detection of these pathogenic bacteria in meat is very important.

In this study, meat and meat products from different markets in Eskisehir were investigated to determine whether they were contaminated with *E. coli* O157:H7 or not. Conventional methods, IMS and PCR methods were used. We suggest that IMS and PCR techniques can be used to detect of this pathogen in meat samples.

**Keywords: : *E. coli* O157 H7, IMS, PCR, Meat and meat products, Food Microbiology**

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma konusunun seçiminde bana önderlik eden ve araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar yardım ve eleştirilerini esirgemeyen tez hocam Sayın Prof. Dr. Merih KIVANÇ' a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında maddi ve manevi yönden desteğini gördüğüm eşim Arş.Gör. Mehmet Burçin MUTLU' ya ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Verdikleri eğitim ve gösterdikleri anlayışla bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>Sayfa</b>	
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Bakteri İle İlgili Genel Bilgiler.....	1
1.2. Kaynağı ve Yayılması.....	3
1.3. Enfeksiyon Aracı Olan Gıdalar.....	4
1.4. Biyokimyasal ve Antijenik Özellikleri.....	5
1.5. Gelişmesi ve Canlı Kalması.....	6
1.6. Yaptığı Hastalıklar.....	7
1.7. Virülens Faktörleri.....	11
1.8. Belirlenmesi.....	13
1.9. Klasik Yöntemler.....	13
<b>2. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	<b>17</b>
2.1. Materyal.....	17
2.1.1. Et Örnekleri.....	17
2.1.2. Test Bakterileri.....	19
2.1.3. Besiyerleri ve Tampon Çözeltiler.....	19
2.1.3.1. Nutrient Broth.....	19
2.1.3.2. Nutrient Agar.....	19
2.1.3.3. Violet Red Bile Agar.....	20
2.1.3.4. Sorbitol MacConkey Agar (SMAC).....	20
2.1.3.5. Sefiksim-Tellurit ilaveli Sorbitol MacConkey Agar (CT-SMAC).....	20
2.1.3.6. Plate Count Agar.....	20
2.1.3.7. Tryptic Soya Broth.....	21
2.1.3.8. Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) (0.01M, pH 7.2).....	21

2.1.3.9. PBS-TWEEN 20.....	21
2.1.3.10. Tris-EDTA (TE) Tamponu.....	21
2.1.3.11. %10'luk Sodyum Dodesilsülfat (SDS) Çözeltisi.....	22
2.1.3.12. 2X Örnek Uygulama Tamponu.....	22
2.1.3.13. Tris Sitrat.....	22
2.1.3.14. 5Xtank Tanponu.....	22
2.1.3.15. 1,5 M Tris.....	23
2.1.3.16. 1 M Tris.....	23
2.1.3.17. %10'luk Amonyumpersülfat Çözeltisi.....	23
2.1.3.18. Jel Boyama Solüsyonu.....	23
2.1.3.19. Destain Solusyonu.....	24
2.1.3.20. Fiksatif Solusyonu.....	24
2.1.3.21. % 10'luk Ayırma Jeli (10 ml).....	24
2.1.3.22. %5'lik Yükleme Jeli.....	24
2.1.3.23. dNTP Solusyonu.....	25
2.1.3.24. 1 mM Tris-HCl (pH 8.0).....	25
2.1.3.25. 0.5 M EDTA (pH 8.0).....	25
2.1.3.26. Tripton Broth.....	25
2.1.3.27. $\alpha$ -Naftol Çözeltisi.....	25
2.1.3.28. Kovaks Çözeltisi.....	26
2.1.3.29. %40'lık KOH Çözeltisi.....	26
2.1.3.30. Simmon-Sitrat Agar.....	26
2.1.3.31. MR-VP Broth.....	27
2.1.3.32. Metil Red İndikatör Çözeltisi.....	27
2.2. Yöntem.....	28
2.2.1. Et Örneklerinin Toplanması.....	28
2.2.2. Et örneklerindeki Toplam Bakteri Sayısının Tespiti.....	28
2.2.3. Et örneklerindeki Koliform Grubu Bakterilerin Sayısının Tespiti.....	28
2.2.4. Et örneklerindeki <i>E. Coli</i> O157:H7 Varlığının Kültürel Yöntemle Belirlenmesi.....	28
2.2.5. Immuno Manyetik Ayırma Yöntemi (IMS) ile <i>E. Coli</i> O157:H7 Varlığının Saptanması.....	29
2.2.6. PCR ile <i>E. Coli</i> O157:H7 Varlığının Araştırılması.....	30
2.2.6.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	31

2.2.6.2. eaeA Genine Spesifik Primerler ile Amplifikasyon.....	32
2.2.6.3. hlyA Genine Spesifik Primerler ile Amplifikasyon.....	33
2.2.6.4. H7 Genine Spesifik Primerler ile Amplifikasyon.....	33
2.2.6.5. stx1 Genine Spesifik Primerler ile Amplifikasyon.....	34
2.2.6.6. stx2 Genine Spesifik Primerler ile Amplifikasyon.....	34
2.2.6.7. slt1 Genine Spesifik Primerler ile Amplifikasyon.....	35
2.2.6.8. slt2 Genine Spesifik Primerler ile Amplifikasyon.....	35
2.2.6.9. Et Örneklerindeki <i>E. Coli</i> O157:H7'lerin Belirlenmesi İçin PCR.	36
2.2.7. Lateks Agglutinasyon Testi ile O157 ve H7 Antijenlerinin Tesbiti.....	36
2.2.8. Biyokimyasal Testler.....	36
2.2.8.1. İndol Testi.....	37
2.2.8.2. Metil-Red Testi.....	37
2.2.8.3. Voges.Proskauer Testi.....	37
2.2.8.4. Sitrat Testi.....	37
2.2.9. Protein Analizleri.....	38
2.2.9.1. Total Hücre Proteinlerinin Eldesi.....	38
2.2.9.2. Bradford Yöntemi ile Örneklerdeki Protein Miktarlarının Belirlenmesi.....	38
2.2.9.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	39
2.2.10. Plazmid Analizi.....	40
2.2.10.1. Alkali-Lizis Yöntemi ile Plazmid İzolasyonu.....	40
2.2.10.2 .Plazmidler İçin Agaroz Jel Elektroforezi.....	41
2.2.11. Hindi Kıymasında Canlı Kalma Süresinin Tesbiti.....	41
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>43</b>
3.1. Et Örneklerindeki Toplam Bakteri Sayısının Tesbiti.....	43
3.2. Et Örneklerindeki Koliform Grubu Bakterilerin Sayısının Tesbiti.....	43
3.3. Et Örneklerindeki <i>E. Coli</i> O157:H7 Varlığının Kültürel Yöntemle Belirlenmesi.....	45
3.4. Immuno Manyetik Ayırma Yöntemi (IMS) ile <i>E. Coli</i> O157:H7 Varlığının Saptanması.....	45
3.5. PCR ile <i>E. Coli</i> O157:H7 Varlığının Araştırılması.....	45
3.6. Et Örneklerindeki <i>E. Coli</i> O157:H7 'lerin Belirlenmesi İçin PCR.....	50
3.7. Lateks Agglutinasyon Testi ile O157 ve H7 Antijenlerinin Tesbiti.....	52



3.8. Biyokimyasal Testler.....	52
3.9. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	52
3.10. Plazmid Analizi.....	54
3.11. Hindi Kıymasında Canlı Kalma Süresinin Tesbiti.....	55
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>57</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>63</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

3.1.	<i>E.coli</i> O157:H7 genomik DNA'sı.....	46
3.2.	Agaroz jelde slt1, slt2 ve H7 primerlerinin verdiği reaksiyon ürünleri.....	48
3.3.	Agaroz jelde eae, hlyA ve stx1 primerlerinin verdiği reaksiyon ürünleri.....	49
3.4.	SDS-PAGE işleminden sonra total protein profilleri (Sırasıyla 15, 38, 42, 45, 47 ve 48 nolu et örneklerinden izole edilen suşlar; <i>E.coli</i> , <i>E.coli</i> O157:H7 ve son çukurda Marker (Protein Ladder)).....	53
3.5.	UVI Band programı ile elde edilen örnekler arasındaki benzerlik dendogramı.....	54
3.6.	Plazmid izolasyonundan sonra örneklerin %1'lik jeldeki görüntüleri (Sırasıyla 15, 38, 42, 45, 47 ve 48 nolu et örneklerinden elde edilen izolatlar; <i>E.coli</i> , <i>E.coli</i> O157:H7 ve Marker1kbFermentas)).....	54

## ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1.	Çalışmada incelenmiş olan et örnekleri.....	17
2.2.	PCR’da kullanılan primerler ve özellikleri.....	31
3.1.	Et örneklerindeki toplam bakteri sayıları.....	43
3.2.	Kültürel yöntemler, IMS ve PCR tekniklerinin örneklerdeki hedef bakteriyi tesbit edebilme durumu.....	50
3.3.	Hindi Kıymasına aşılana <i>E.coli</i> O157:H7 nin farklı yöntemlerle tesbiti.....	55

## 1.GİRİŞ

### 1.1. Bakteri İle İlgili Genel Bilgiler

*Escherichia coli* hayvanların ve insanların barsak sistemlerinin normal florasıdır. Normal olarak vücutta bulunan zararlı bakteri türlerini baskılaması ve vitamin sentezine katkıda bulunması nedeni ile vücut için yararlı olarak da nitelendirilebilmektedir. Az sayıda *E. coli* serotipi insan ve hayvanlarda zararlı etki yapmaktadır [1].

İnsanlarda diyareye neden olan *E. coli* suşları 2. Dünya Savaşı'ndan sonra ortaya çıkmıştır. Bu tarihe kadar düşük virülense sahip olduğu ve idrar yolları enfeksiyonlarına neden olabildiği kabul edilen *E. coli*' nin diyare etmeni olarak tanımlanması ile bu bakteriye bakış değişmiştir. Bugün insanlarda diyareye neden olan *E. coli* serotipleri patojenik [2, 3], enteropatojenik [4], enterovirulent [1, 5] diyarejenik [6] serotipler olarak adlandırılmaktadır. Bu serotipler virülens özellikleri, patojenite mekanizması, klinik sendromlar ve O:H serotiplerine göre başlıca; enteropatojenik (EPEC), enterotoksijenik (ETEC), enteroinvaziv (EIEC), enterohemorajik (EHEC), difuz-adhering (DAEC), entero-agregativ (EAaggEC) olmak üzere 6 ana grup altında toplanmaktadırlar [7]. Bununla birlikte diyareye neden olan serotiplerin bu şekilde kesin bir ayrımı yoktur. Bu gruplara ilaveten fakültatif enteropatojenik (FEEC), verotoksin oluşturanlar (VTEC), önceleri shiga benzeri toksin oluşturanlar (=shiga like toksin; SLTEC) olarak adlandırılmış olmakla beraber son zamanlarda doğrudan shiga toksin (Stx; çoğul formda Stxs) oluşturanlar (STEC) şeklinde tanımlanmış olması [8], diyare oluşturanlar (DEC) [6] gibi grupların başka gruplar ile de tarif edilebilmesi, diyareye neden olan *E. coli* 'lerin enfeksiyon veya intoksikasyon etmeni olarak gruplandırılması bu konudaki terminolojiyi zorlamaktadır [5].

Bunlardan ETEC suşları ısıya dirençli (Heat Stable Toxin =ST) ve ısıya duyarlı (Heat Labile Toxin =LT) bir yada daha fazla toksin oluştururlar. Bu suşlar bağırsağa tutunma ve kolonizasyon için özel bir yapışma fimbriyası içerirler. Genellikle düşük bir ateşe neden olabilirler ya da ateş görülmez. Sulu bir diyareye neden olurlar ve tipik bir gastroenteritis etmenidirler. Turist ishali (seyahat

diyaresi) olarak tanımlanan hastalıklara ve özellikle sıcak mevsimlerde bebek ishallerine neden olurlar. Bu bakterilerin hastalığa neden olabilmesi için çok sayıda bakterinin vücuda girmesi gerekir. Bir başka deyişle bunlarda enfektif doz yüksektir. Bazı EPEC suşları bir ya da daha çok verositotoksin üretirler. Sulu ve kanlı bir dışkı ile görülen ishallerine neden olurlar. Hastalık sırasında ateş yüksektir. EIEC suşları ise genellikle laktoz negatif ya da laktoz geç pozitif ile hareketsiz olma gibi atipik özellikler taşırlar ve *Shigella* türleri ile antijenik olarak yakınlık gösterirler. Diğer enterovirulent tiplerden farklı olarak invaziv özellik taşırlar ve fekal lökositlere rastlanır. Mukoid ve kanlı bir dışkı görülür. Ateş yüksektir. Bu gruba giren bakterilerde enfektif doz düşüktür. EHEC olarak tanımlanan grubu başlıca *E. coli* O157:H7 serotipi oluşturur. EHEC izolatları çeşitli toksinler oluşturmakla beraber bunlardan sadece birkaçı tanımlanabilmiştir. İlk kez 1955 yılında tanımlanmış olan hemolitik üremik sendrom (HUS) en fazla ölüme neden olan hastalıktır. Sulu ve çok kanlı bir dışkı görülürken ateş yoktur. Enfektif doz ise kayda değer ölçüde düşüktür. EA-AggEC suşları hayvanlarda epidemiyolojik çalışmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Tropik ülkelerde çocuklarda süreklilik gösteren diyareye neden olurlar. Daha önceden EPEC grubunda yer alan ve Hep-2 hücre modeline göre diffuz adhesyon ile karakterize edilen diğer grup DAEC olarak adlandırılmıştır. Bunlar da çocuklarda süreklilik gösteren diyareye neden olurlar [5, 6, 7, 8, 9].

Diyareye neden *E. coli* serotipleri içinde en önemlileri *E. coli* O157:H7 ve O126:H11 serotipleridir. Her iki bakteri de EHEC grubu içinde yer almakta ve benzer hastalıkları yapmakla beraber O126:H11 serotipine gıdalarda rastlanmamıştır. Ayrıca *E. coli* O157:H7 serotipinin farklı suşları VT-1 ve/veya VT-2 toksinlerini üretirken *E. coli* O126:H11 serotipinin bütün suşları sadece VT-1 üretmektedir. O157:H7 serotipi bugün için kabul edilen en tehlikeli gıda kaynaklı patojenler içinde yer alır [10]. Bununla beraber O11 gibi O157 olmayan STEC serotiplerine gıdalarda sıklıkla rastlandığı ve bunların da klinik hastalıklara neden olduğu, bu nedenle bu serotiplerin ihmal edilmemesi gerektiği belirtilmektedir [11].

*E. coli* O157:H7 serotipi genel olarak Kuzey Amerika kıtası ülkelerinde daha sıklıkla görülmekle beraber, bugün 6 kıtada en az 16 ülkede giderek artan

sayıda vakaya rastlandığı, genel olarak Mayıs-Ekim aylarında vaka sayısında artış olduğu, hastalığın 5 ve daha altındaki çocuklar ile 65 ve daha yukarı yaşlılarda daha fazla görüldüğü bildirilmektedir. Enfektif dozunun 0,3-15 hücre/g gibi çok düşük düzeyde olması salgınların yayılmasında kişiden kişiye bulaşmaların temel etken olduğunu göstermektedir [7, 8].

## 1.2. Kaynağı ve Yayılması

*E. coli* O157:H7 serotipinin kaynağı üzerinde farklı görüşler bulunmaktadır. Çeşitli araştırma sonuçları bu bakterinin başta süt inekleri olmak üzere sıcak kanlı hayvanlar olarak tanımlanan memeli ve kanatlı hayvanların dışkıları ile ete, süte, toprağa, suya ve dolayısı ile tüm çevreye yayıldığını göstermiştir.

Patojen bakterilerin evrimi üzerinde çalışmalar yoğun şekilde sürmektedir. *Escherichia*, *Salmonella* ve *Shigella* türleri üzerinde yapılan genetik analizler *E. coli* O157:H7 serotipinin bireysel bir patojen olmadığı, bunun enterik bir bakteriden evrimleştiği şeklindeki teori oldukça benimsenmiştir. 16S rRNA ve 5S rRNA dizilişleri ile yapılan filogenetik araştırmalar *Escherichia* spp. ve *Salmonella* spp.'nin memeli hayvanların ilk türeyişi olan 120-160 milyon yıl önce ortak bir atadan ayrıldıkları, *Shigella* spp. nin erken primatların olduğu 80 milyon yıl kadar önce *E. coli*'den türediği, kommensal *E. coli*'lerin memelilerin bağırsağını tercih ederken, patojen *E. coli*'lerin bağırsak epitelini aşp dolaşım sistemine ve buradan uygun bulunduğu yerlere lokalize oldukları kabul edilmektedir [8].

*E. coli* O157:H7 serotipinin genetik çalışmalar sırasında elde edildiği ve bir kaza sonucu doğaya salındığı şeklinde görüşlerde bulunmaktadır. Griffin ve Tauxe'ye göre bu serotip muhtemelen enteropatojenik bir atadan genetik çalışmalar sonucu oldukça yakın bir dönemde ortaya çıkmıştır [12].

*E. coli* O157:H7 serotipi köpek, kuş, koyun, geyik ve insanda görülmekle beraber, sığır temel kaynak olarak ele alınmaktadır. Bunun nedeni, insanlarda bu serotipin neden olduğu kanıtlanmış pek çok vakada yeterince pişirilmemiş sığır etlerinin ve daha az sıklıkta olmak üzere çiğ sütlerin hastalıktan sorumlu olduğu kanıtlanmasıdır. Bununla beraber, hayvan dışkısı ile bulaşmış toprak ve suyun

dolaylı olarak hastalığın taşınmasında ve yayılmasında önemli rol oynadığı da bilinmektedir [7].

Genç ve sağlıklı sığırlar *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarına oldukça dirençlidir. Deneysel olarak yemlerine  $10^7$  düzeyinde *E. coli* O157:H7 katılan hayvanlarda her hangi bir klinik bulguya rastlanılmaması, 6-8 haftalık danalar için bu bakterinin patojen etki göstermemesi, buna karşın rumen ve barsaktan geçerken dışkılarındaki bakteri sayısında ciddi bir azalma olmakla beraber halen yoğun ölçüde bu patojene rastlanması sığırların bu bakterinin kaynağı ve çevreye bu bakterinin yayılmasında önemli olduğu kanıtlanmıştır. Benzer şekilde ahırlarda hayvanların su içtiği kanallardaki segmentlerde bu serotip 4 ay süre ile canlılığını koruyup gelişebilmektedir [8].

### 1.3. Enfeksiyona Aracı Olan Gıdalar

Başta sığır dışkısı olmak üzere doğrudan veya dolaylı olarak hayvanların dışkısının bulaştığı her türlü gıda maddesi *E. coli* O157:H7 enfeksiyonu bakımından potansiyel tehlike taşımaktadır. Nitekim pek çok gıda maddesinde ve ayrıca içme ve kullanma suları ile yüzülen göllerde *E. coli* O157:H7 varlığı gösterilmiş iken başka gıdalarda da bu tehlikenin boyutları deneysel olarak kanıtlanmıştır.

Başta sığır olmak üzere domuz, koyun, piliç etleri ve yine başta hamburger ve köfte olmak üzere kıyma ile hazırlanan et ürünlerinden sıklıkla izole edilmektedir. Farklı hayvanların dışkılarının eti farklı düzeylerde kontamine edebileceği gösterilmiştir. İngiltere’de yapılan bir seri çalışmada sığır dışkılarında %15,7 ; koyun dışkılarında %2,2 düzeyinde pozitif sonuç bulunmuş iken, sığır eti ürünlerinde %1,5 buna karşın kuzu eti ürünlerinde %5,9 pozitif sonuç alınmıştır. Et ürünleri dışında da bulunan ve salgınlara yol açan bu patojen en yaygın olarak çeşitli peynirler, çiğ süt ve genel olarak patojenler açısından güvenilir bir gıda olarak tanımlanmasına karşın yoğurt gibi süt ürünleri; çeşitli su kaynakları, salatalar ve salata sosları, evde yapılan sandviç, turp filizi pastörize edilmemiş elma şarabı ve taze sıkılmış elma suyu gibi gıdalarda çeşitli enfeksiyonlara neden olmuştur [1, 13, 14, 15, 16, 17].

#### 1.4. Biyokimyasal ve Antijenik Özellikleri

*E. coli* O157:H7 serotipi diğer *E. coli*' lerden; 44,5 °C ve üzerinde gelişmemesi, sorbitolü fermente edememesi, β-glucuronidase enzimine sahip olmaması, buna karşı *eae* genine sahip olması, 60 mDa plazmid taşınması ve yaygın olarak görülmeyen 5000-8000 Dalton moleküler ağırlıkta OMP ekspresyonu ve enterohemolisin üretimi ile ayrılır [4, 7, 8]. *E. coli*' lerin %95'i sorbitolü 24 saat içinde fermente ederken *E. coli* O157:H7 sorbitolü 48 saat içinde fermente edememektedir. Buna göre Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' ne göre [18], SLTEC O157 suşları arasında sorbitol pozitif olanlara da rastlanmaktadır. *E. coli* O157:H suşları sorbitol pozitifdir [7]. Yine *E. coli*'lerin %97'si β-glukorinidaz enzimi içerirken *E. coli* O157:H7 serotipi bu enzimi içermez. Yeni bir tip hemolizin olarak kabul edilen enterohemolisin , verotoksin pozitif *E. coli* O157:H7 ve *E. coli* O157:H serotipleri tarafından üretilirken, bu özellik diğer *E. coli*'lerde yoktur. Enterohemolisin sadece eritrositleri yıkanmış kanlı agar petriplerinde belirlenebilir. Bu şekilde 33 adet verotoksik *E. coli* O157:H7 ya da *E. coli* O157:H izolatının 32 adedinin enterohemolisin ürettiği gösterilmiştir. Bunların dışında *E. coli* O157:H7 serotipi diğer *E. coli*'lere göre safra tuzlarına daha az dayanıklıdır. Antijenik yapısı diğer *E. coli*'ler ile kesin bir ayrım sağlar [10, 17, 19].

*E. coli*'nin florojenik MUG belirteci uidA geni tarafından kodlanan β-glukorinidaz enziminin aktivitesine bağlıdır. EHEC *E. coli* O157:H7' de de bu genin varlığı gösterilmiş olmakla beraber, yapılan sekans analizleri bu serotipte uidA geninde birkaç baz mutasyonu olduğunu göstermiştir. Bu nedenle *E. coli* O157:H7 serotipinde diğer *E. coli*'lerde tipik olan MUG reaksiyonu negatiftir.

*E. coli* O157:H7 'nin O157 antijenik determinantı bakterinin selüler lipopolisakkaritinin polisakkarit kısmında bulunur. Yapılan analizler sonucunda bu determinant D-glukoz, L-fruktoz (6-deoksi-L-galaktoz), 2-asetamido-2-deoksi-D-galaktoz, 4-asetamido-4, 6-dideoks-D-mannoz (1:1:1)'dan oluşan ve tekrarlanan tetrasakkarid ünitelerinin doğrusal polimeri olarak tanımlanmıştır [8, 20].

MUG negatif *E. coli* O157:H7 izolatlarının verositotoksin pozitif olduğu söylenebilir. Bir çalışmada 188 *E. coli* O157:H7 serotipinin MUG ve



verositotoksin testleri yapılmış, bunlardan 155 *E. coli* O157:H7, 10 *E. coli* O157:H ve 1 *E. coli* O157:H (rough) olmak üzere 166 adedi MUG negatif ve verositotoksin pozitif iken, diğer 22 izolat (2 *E. coli* O157:H, 1 O157:H, 19 diğer H tipleri ; H6, H16, H19, H25, H42, H45) MUG pozitif ve verositotoksin negatif olarak bulunmuştur [21].

*E. coli* suşları arasında bir bağlantı olduğu ilk kez 1921'de Dodgeon ve arkadaşları tarafından belirtilmiş, sonra 1937'de Lowel *E. coli*'nin kapsül ve somatik olmak üzere 2 çeşit antijeni olduğunu ileri sürmüş, 1943 de ise Kaufmann flagel antijenini de göstermiştir. Buna göre *E. coli*' de O1-O171 arasında gösterilen 165 somatik O antijeni, K1-K90 arasında gösterilen 90 kapsül antijeni ve H1-H56 arasında gösterilen 56 flagella H antijeni saptanmıştır. Çeşitli araştırmalar ile 171 O antijeni belirlenmiş ise de bunlardan 31, 47, 67, 72, 94 ve 122 numaralı listeden çıkarılmış ve 165 O antijeni kalmıştır. En son çalışmalara göre bu gün 174 O, 56 H ve 80 K antijeni olduğu saptanmıştır. *E. coli*'nin somatik O antijenleri ile *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter* ve *Providencia* cinsi bakteriler arasında önemli ölçüde çapraz reaksiyonlar bulunmaktadır. Termostabil özellik gösteren O antijenlerinden en çok rastlanılan 25 kadar antijendir. Hücre zarında, kılıfında ya da kapsülde bulunan kapsül K antijenleri L, B ve A grubundadır. Bunlardan L ve B grubu yüzeysel somatik antijenler, A grubu ise kapsül antijenleridir. K antijenleri de termostabil özellik gösterir. Kapsül antijenleri içinde ayrıca Vi,  $\beta$ , F antijenleri de vardır. Monofazik olan H antijenleri ise sadece hareketli türlerde bulunur ve ısıya duyarlıdır. Flagellar H antijenleri birbirleri ve diğer bakterilerin H antijenleri ile çapraz reaksiyon vermezler [7].

### 1.5. Gelişmesi ve Canlı Kalması

*E. coli* O157:H7 serotipi de diğer *E. coli*' ler gibi optimum olarak 37 °C de pH 7,2' de gelişir [22]. *E. coli* O157:H7 serotipinin gelişmesi üzerine yapılan çalışmaların çoğu bu serotipin izolasyonuna yöneliktir.

Çeşitli araştırmalar gıda kaynaklı hemorajik kolit vakalarında anahtar rol oynayan *E. coli* O157:H7'nin aside dirençli olduğunu ve bu toleransının midenin kuvvetli asit ortamından rahatlıkla geçmesini sağladığını göstermiştir. Bu bakterinin aside direnci insanlarda enfeksiyon dozunun düşük olmasını etkileyen

bir faktör olarak kabul edilmektedir. *Sallmonella*'nın tersine olarak 1-2 pH olan insan midesinde yaklaşık 3 saat süren sindirim sırasında canlı kalabilmesi ve buradan bağırsağa geçmesi bu ilişkiyi açıklamaktadır.

Bu patojenin kuru ortamlarda canlılığını önemli ölçüde koruduğu gerek deneysel gerekse salgına neden olan gıdalar ile gösterilmiştir. Farklı pH ve su aktivitesindeki işlenmiş salamlara inokülasyondan sonra 4 °C' da 32 saat süre ile 4,63 pH da dahi  $10^4$ - $10^5$  kob/g düzeyinde canlılık elde edilmiştir. 1994 yılında işlenmiş kuru salamın ve 1996 yılında Japonya'da turp filizinin neden olduğu salgınlarda her iki ürünüde kuru olması yine kuru gıdalarda bu bakterinin canlı kalabileceğini kanıtlamaktadır [8].

*E. coli* O157:H7 serotipinin normal gelişme sıcaklığının birkaç derece fazlasında inkübasyona bırakıldığı bir çalışmada hücrelerin yeni bir grup protein sentezleyerek daha sonra kendileri için öldürücü olabilecek sıcaklıklara karşı daha iyi bir direnç gösterdikleri bulunmuştur. Aerobik ve anaerobik koşullarda gelişen *E. coli* O157:H7' ye ısı şoku uygulanmasının ısıl işlemde canlı kalabilen bakteri sayısını artırdığı, bakteriye uygulanan ılımlı bir ısı şokunun bakterinin inhibisyonu için seçilen proses sıcaklığında canlı kalabilme yeteneğini yükselttiği görülmüştür [10].

## 1.6. Yaptığı Hastalıklar

Yapılan çeşitli araştırmalar ve klinik bulgular hastalıkların giderek arttığını, HIV/AIDS, Ebola hemoraji ateş, Hepatit B ve *E. coli* O157:H7 enfeksiyonları gibi yeni hastalıkların ortaya çıkarken, halk sağlığı uygulamasındaki ihmaller sonucunda tüberkülozun yeniden yayılmaya başlaması gibi olumsuzlukları da ortaya koymaktadır. Bu hastalıkların ortaya çıkışında ve yayılmasında ekolojik değişmeler, demografik hareketler, insanların ve ticari malların dünya yüzeyinde daha fazla dolaşması, antibiyotiklerde hatalı uygulamalar sonunda mikroorganizmaların direnç kazanması gibi bir çok faktör etkin rol oynamaktadır [8].

Diyarejenik *E. coli*' lerin (DEC) neden olduğu gıda kaynaklı hastalıkların klinik, halk sağlığı ve ekonomik önemi vardır. Sadece *E. coli* O157:H7 serotipinin

neden olduğu hastalıkların tedavi giderleri ve işgücü kaybı bedelinin yılda 229-610 milyon US\$ olduğu tahmin edilmektedir [6]. ABD Hastalık Önleme ve Koruma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention) tahminlerine göre sadece ABD’de gıda kaynaklı mikrobiyolojik hastalıklar toplamı olarak yılda 76 milyon vaka olmakta, bunlardan 300.000’i tedavi görürken 5000 ölüm olmakta, *E. coli* O157:H7 ise 20.000 vaka ve 250 ölümden sorumlu tutulmaktadır [7]. ABD’de hastalığın sıklığı her 100.000 kişide 2,1 kişi iken, bu değer Kanada’da 1991-1996 yılları arasında 3-5,3 kişi olarak değişmiştir [8].

Avrupa’da görülen enfeksiyonların seyri ABD’den farklılık göstermektedir. Avrupa’da HUS vakalarının %10-30 kadarını O157 olmayan STEC suşları oluşturmaktadır. İngiltere’de laboratuvar tarafından doğrulanmış vaka sayısı 1982’de yalnız 1 iken bu sayı 1995 yılında 1000’i geçmiştir. Kıta Avrupa’sı ile İngiltere’deki enfeksiyonlarda farklılık göstermektedir. Özellikle Almanya’da sorbitol pozitif hareketsiz O157 serotipine sıklıkla rastlanmaktadır. Bulaşma kaynaklarında da ABD ile Avrupa ülkeleri arasında farklılık görülmektedir. ABD ve İngiltere’de *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarının asıl kaynağı hamburger ve diğer et ürünleri iken Kıta Avrupa’sında keçi sütü, çeşitli peynirler, gölde yüzmek ve kişiden kişiye bulaşmalar daha önemli olarak görülmektedir. Avustralya’da ise O157 olmayan ve özellikle O111:H serotipi sıklıkla ciddi hastalıklara neden olmaktadır [8].

ABD’de Philadelphia eyaletinde 1971 yılında 5 erişkin hastada izlenen klinik seyir bilinen barsak hastalıkları ile açıklanamamış ve hiçbir etiyolojik etken saptanamayan benzer hastalıkların ABD’nin diğer eyaletleri ile Avrupa ve Japonya’da ihbar edilmesi üzerine ABD Hastalık Önleme ve Koruma Merkezi 1973-1982 arasında geriye dönük olarak 300 *E. coli* suşunu serotiplendirmiş ve kanamalı ağır diyare geçiren California’lı 50 yaşında bir kadından 1975 yılında izole edilen suş *E. coli* O157:H7 olarak saptanmıştır [10].

Bireysel vakalar dışında *E. coli* O157:H7 ilk olarak 1982 yılında ABD’de Oregon’da 26 ve Michigan’da 21 olmak üzere 47 vaka ile ve her iki kişi de yine daha öncekilere benzemeyen kanlı diyare şeklinde 2 salgın ile görülmüştür. Her iki salgında da köfteli sandviçlerin yenilmesinin hastalığa neden olduğu belirlenirken salgınların birinde aynı partiye ait donmuş köftelerde *E. coli*

O157:H7'ye rastlanmıştır. Aynı yıl Kanada Ottawa'da evde yapılan sandviçlerinde salgına neden olduğu belirlenmiştir [1]. Bundan hemen sonra benzer vakalar ABD, Kanada ve İngiltere'de görülmüş, daha sonra Meksika, Çin, Arjantin, Belçika gibi ülkelerde de aynı hastalığa rastlanmıştır, 1996 yaz aylarında ise Japonya'da 16 kişinin ölümüne neden olan salgının etmeni *E. coli* O157:H7 olarak gösterilmiştir [17, 23, 24].

*E. coli* O157:H7'nin yapmış olduğu hastalıklar tipik ve oldukça sert geçen hemorejik kolitis, HUS ve trombotik trombositopenik purpura (TTP) olmak üzere 3 şekilde görülür. Kusma nadirdir. Bunlardan hemorejik kolit aniden ortaya çıkan kramplı karın ağrıları ile başlar ve 24-48 saat içinde sulu diyare ile devam eder. Diyare sırasında görülen kan artar ve dışkı zamanla tümüyle kan olur. Hastalığın ortaya çıkması genellikle 3-9 gün (ortalama 4 gün), hastalık süresi ise 2-9 gündür. Hastalığın ortalama 8 gün sürdüğü şeklinde kaynaklara da rastlanmaktadır. Kramplı karın ağrılarının doğum sonrasına benzer yoğunlukta olduğu ve apandisit ağrısından daha şiddetli olduğu bildirilmektedir. Bu hastalık shigellosiste tanımlanan dizanteri ve invaziv *E. coli*'nin neden olduğu gastroenteritiden ateş olmaması ve kanlı dışkı ile ayrılmaktadır [1, 5, 7, 10, 17].

Bazı hastalarda ve özellikle çok gençlerde böbrek yetersizliği, mikroangiopatik hemolitik anemi ve trombositopeni ile karakterize edilen ve üçlü bir sendrom olarak tanımlanan HUS gelişir. Hemorejik kolitis vakalarında ortalama %0-15 arasında HUS geliştiği tahmin edilmekte, bu oran çocuklarda %10 olarak verilmektedir. HUS, kalıcı böbrek fonksiyon kaybına neden olabilir. Yaşlılarda ise HUS, ateş ve TTP olmak üzere ilave iki semptom ile görülür. Bu durumda yaşlılarda ölüm oranı ortalama %50'ye çıkmaktadır. Kuzey Amerika ülkelerinde ölüm oranı %5 olarak tahmin edilmektedir [1, 7, 8].

Çoğu kez hastalara diyaliz ve kan nakli gerekir, nöbet ve koma ile karakterize edilen merkezi sinir sistemi hastalıkları gelişir ve ölüm görülebilir. HUS'un prodromal kanlı diyare ile başlayan tipik ve diyareli fazı içeren atipik alt grupları vardır. Hastalarda sarılık, sıklıkla yüksek tansiyon ve kalp yetmezliği de görülebilmektedir. *Sh. dysenteriae* serotip-1 ile oluşan enfeksiyon HUS'a neden olurken bazı mikroorganizmalar HUS gibi hastalıklar yapmaktadırlar. VTEC ile

HUS arasındaki bağlantı ise ilk olarak 1985 yılında Karmali ve ark. tarafından gösterilmiştir [17].

TTP'da ise klinik ve patolojik özellikler HUS'a benzer ancak merkezi sinir sistemi bozukluğu genellikle temel özelliktir. Hastalıkta beyinde kan pıhtısı oluşur ve ölüm genellikle görülür [17]. Bununla beraber *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarında TTP'nin nadir olduğu da bildirilmektedir [7].

*E. coli* O157:H7 enfeksiyonları gençlerde daha etkilidir. Japonya'da yapılan araştırmalarda gençlerin ve çocukların *E. coli* O157:H7 serotipinin yapmış oldukları hastalıklara duyarlılığı açık bir şekilde gösterilmiştir. Dışkılarında bu bakteriye rastlanan 20 yaş altındaki kişilerin %80'den fazlası tipik semptomları gösterirken, yine dışkılarında *E. coli* O157:H7 serotipi bulunan 30-46 yaş arasındaki kişilerin %70'i tipik semptomları göstermemiştir [7].

*E. coli* O157:H7'nin neden olduğu hastalıkların yoğunluğunun 100.000'de 10'dan daha az olduğu kabul edilmektedir. Buna karşın hastalar hastalığın ortaya çıkmasından itibaren 10 gün süre ile *E. coli* O157:H7 yayarlar, ortalama %5 kadarı HUS'a yakalanırken. %50'den daha azında dışkıda kan görülür. Bununla birlikte, başka kaynaklar *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarında dışkıda kan görülme olasılığını %90 olarak vermektedir [7].

Bakteri antibiyotiklere dirençlidir ve/veya giderek direnç kazanmaktadır. Bu nedenle hastalıkta antibiyotik ve antikoagulant kullanılması tartışılmaktadır. İskoçya'da yapılan çalışmalar mide asitliğini düşürücü ilaç ve tesadüfen antibiyotik kullanan hastaların HUS/TPP'ye yakalanma risklerinin arttığını ortaya koymuş, benzer sonuçlar ABD'de alınmıştır. Japonya'da 1996 yılında görülen ve çoğu okul çocuğu olan 6000 kişinin etkilendiği salgında ise özellikle enfeksiyonun 7. gününde alınan antidiyarejik ilaçların enfeksiyonu daha da şiddetlendirdiği belirlenmiştir [8].

Japonya'da 1996 yılı ile başlayan salgınlarda ve sporadik vakalarda moleküler analizler hastalıktan tek bir suşun değil, tüm Japonya'ya yayılmış farklı genotiplerdeki suşların sorumlu olduğunu göstermiştir. Yapılan analizler hastalardan izole edilen EHEC suşların %80'den fazlasının O157:H7 serotipi olduğunu, bununla birlikte O26 ve O111 serotiplerinin sayısında giderek bir artış olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde *E. coli* O157:H7 olmayan VTEC suşlarının

giderek HUS ve diyareli hastalardan daha fazla izole edildiği, çeşitli ülkelerde sığır popülasyonu üzerinde yapılan çalışmalarda temel kaynak konumunda olan sığırlardan 100'den daha fazla serotip izole edildiği bildirilmektedir.

Patojenik grupların gıdalarda bulunma sıklığı üzerinde yapılan araştırmalar farklı sonuçları göstermektedir. Eylül 1983'de ABD Washington D.C.'de 45 kişinin Fransa'dan ithal edilen brie peynirinden kaynaklanan benzer semptomlar taşıyan sulu diyare (%91) ve karın krampları (%80) göstermesi üzerine yapılan çalışmalarda hastalık etkeninin ısıya dayanıklı enterotoksin üreten *E. coli* O27:H20 olduğu saptanmıştır. Benzer hastalıklar kısa bir süre sonra ve yine peynirden kaynaklanmak üzere ABD'nin 4 eyaletinde daha görülmüştür. Brezilya'da sığır eti, hamburger ve sosislerden yapılan analizlerde sırasıyla %5; %7,5 ve %10 ETEC suşlarına rastlanmıştır. Buna karşın ABD'de 78 peynir örneğinde ETEC suşları bulunamamıştır. Domuz etinden 274, sığır etinden 248 ve tavuk etinden 278 *E. coli* suşu izole edilmiş ancak bunların hiç birinin ısıya duyarlı toksin yada bunları oluşturan genleri içermediği görülmüştür. EIEC ve EPEC suşlarına nadir olarak gıdalarda rastlanmıştır. EHEC suşlarına ise sığır kıymasında rastlanılmaktadır. Bir başka çalışmada ise toplam 18 örnekten izole edilen 159 *E.coli* suşunun 84 adedinin farklı suş olduğu gösterilmiştir [7, 9, 10].

### 1.7. Virülens Faktörleri

DNA sekans analizleri ile elde edilen bulgulara göre ana toksin *Shigella dysenteriae* type 1 tarafından oluşturulan 'shiga toxin' ile %99 gibi çok büyük bir benzerlik gösterir ve bu nedenle 'shiga like toxin 1; SLT-1 (yeni terminolojide Stx 1)' olarak adlandırılır. Diğer toksin Stx 1 ile sadece %55-60 homolog olmasına karşın SLT-2 (yeni terminolojide Stx 2) olarak adlandırılır. Her iki toksinde HeLa ve Vero doku kültürü hücrelerine toksiktir ve bu nedenle verotoksin 1ve2 (VT-1; VT-2) olarak da adlandırılır. EHEC tarafından oluşturulan bu toksinler doku kültürü analizleri ile belirlenir. Bununla beraber, EHEC suşlarındaki SLT varlığını belirleyebilecek şekilde DNA prob ve PCR analizleri geliştirilmiştir [5, 7, 8]. Shiga toksinlerin konu üzerindeki önemleri açıktır. HUS sadece Stxs üreten bakteriler tarafından oluşturulmaktadır. EPEC serotipleri EHEC'lere benzemekle

beraber bunlarda Stxs olmadığı için HUS'a neden olmazlar. Stx 2'nin Stx 2c, Stx 2d ve Stx 2e şeklinde varyantları vardır. Stx, Stx/Stx 1 ve Stx 2 olarak 2 serogruba ayrılır. EHEC serotipleri tarafından oluşturulan Stx 1 ile *Shigella dysenteriae* 'nın Stx 1'i sadece A polipeptidindeki tek aminoasit ile ayrılır. Stx 2'nin aminoasit dizilişi Stx 1 ile %55 homologdur. Stx 2 böbrek endothelial hücrelerine daha fazla toksiktir. HUS gösteren hastalardan daha fazla sadece Stx 2 üreten suşlar izole edilmiş olması bu görüşü kuvvetlendirmektedir. Stxs bir A polipeptidi ve beş B polipeptidinden oluşmaktadır [8].

*E. coli* O157:H7'nin patojenitesi tam olarak açıklanamamış olmakla beraber önemli virülens faktörleri tanımlanmıştır. Tüm klinik izolatların 1 ya da 2 verotoksin ürettikleri, bunların doku kültüründe geliştirilen Vero ve HeLa hücrelerine sitotoksik oldukları saptanmıştır. Saflaştırılmış broth toksinleri Verotoksin-1 (VT-1) ve Verotoksin-2 (VT-2) olarak adlandırılmıştır. Bunlardan VT-1 immunolojik ve yapısal olarak *Shigella dysenteriae* 1'in oluşturduğu shiga toksinlerinden ayırt edilemediği için bu toksinler shiga'ya benzer anlamında Shiga-like toksinler (SLT-1 = VT-1, SLT2 = VT-2) olarak da adlandırılmaktadır. SLT-1'in nükleotid dizilişi shiga toksine benzemektedir [5, 17].

Verotoksinlerin memeliler üzerindeki etki mekanizması moleküler düzeyde tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla beraber, toksinin B alt birimi hücrelerde glikolipid reseptörüne bağlanarak içeri girdikten sonra A alt biriminin enzimatik olarak A<sub>1</sub> fragmentine indirindiği bu fragmentin daha sonra 60S ribozomlarına bağlanarak protein sentezini inhibe ettiği ve hücre ölümüne yol açtığı tahmin edilmektedir. Araştırmalar, *E. coli* O157:H7 serotipinin taşıdığı 60 MDa 'luk plazmidin patojenitede önemli rol oynadığını belirlemiştir. Enterohemorajik *E. coli* O157:H7'nin RTX sitotoksin olarak belirlenen yeni birhemolitik determinantının 90 kbp plazmidde (pO157) kodlandığı gösterilmiştir [8].

## 1.8. Belirlenmesi

*E. coli* O157:H7 serotipinin çeşitli gıda, klinik ve çevre örneklerinde aranmasına yönelik olarak kısaca klasik ve gelişmiş olarak 2 ana grupta toplanabilir. Diğer bakterilerin aranmasında olduğu gibi *E. coli* O157:H7 serotipi aranmasında da klasik yöntemler ile gelişmiş yöntemler kıyaslandığında klasik yöntemler sarf malzemesi gideri açısından avantajlı ancak, iş gücü maliyeti, analizin duyarlılığı ve süre açısından dezavantajlıdır.

Gıdalar klinik örnekler ve diğer materyalde *E. coli* O157:H7 belirlenmesine ilişkin pek çok yöntem üzerinde çalışmaktadır. Bunlardan klasik olarak tanımlananlar biyokimyasal testler üzerine kurulmuştur ve rutin test laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Başta serolojik yöntemler olmak üzere geliştirilmiş testler öncelikle maliyet ve deneyim faktörleri nedeniyle genellikle araştırma laboratuvarlarında uygulanmaktadır [12].

## 1.9. Klasik Yöntemler

*E. coli* O157:H7 'nin belirlenmesi için kullanılan klasik yöntemlerin büyük çoğunluğu selektif zenginleştirme ve katı besi yerine ekim aşamalarını içeren var/yok testleri şeklindedir. Bu testler ile analiz edilen belirli bir miktar örnekte bu bakterinin varlığı ya da yokluğu araştırılır. Buna göre materyalde *E. coli* O157:H7'nin varlığının gösterilmesi sırasıyla selektif bir sıvı besi yerinde zenginleştirme, selektif ve ayırt edici bir katı besi yerine ekim, şüpheli kolonilerin biyokimyasal veya lateks aglutinasyon testleri ile *E. coli* O157 olarak belirlenmesi ve en son olarak izolatın H7 antijeni içerip içermediğinin belirlenmesidir. *E. coli* O157 olduğu saptanan izolatların verotoksin analizlerinin de yapılması gerekmektedir [5, 10].

Klasik yöntemlerle *E. coli* O157:H7 izolasyonunda yoğun refakatçi flora varlığına bağlı olarak sıklıkla sahte negatif sonuçlar alınabilmektedir. Benzer şekilde analiz edilen diğer mikroorganizmalarda da olduğu gibi, selektif zenginleştirme ortamı olarak kullanılan besi yerinde *E. coli* O157:H7 serotipi ile aynı düzeyde gelişebilen *E. coli* tip1, *Enterobacter* spp., *Hafnai alvei* gibi yakın



akraba türler selektif katı besi yerinde de rahatlıkla gelişebilmekte ve eğer başlangıçta *E. coli* O157:H7 sayısı bu flora içinde yeterli bir oranda değil ise bu bakterilerin baskılanması nedeni ile analiz sonucu hatalı olarak negatif alınmaktadır. Burada hedef bakterinin selektif sıvı ve katı besi yerlerinde gelişebilen refakatçi flora içindeki oranı en düşük %1 oranında olmalıdır. Bu şekilde standart boy bir petri kutusunda bulunan selektif bir katı besi yerine selektif zenginleştirme kültüründen yapılan ekim ve inkübasyon sonucunda oluşacak 100 koloni içinden hedef bakterinin diğerlerinden farklı olan koloni morfolojisine göre ayırt edilmesi ve izolasyonu mümkündür. Burada, petri kutusunda 100 koloni oluşacak şekilde selektif zenginleştirme kültüründen seyreltme yapılması esastır. Bu orandan daha düşük konsantrasyonlarda bulunacak hedef bakteri petri kutusunda görülmesi ve izolasyonu mümkün değildir. gıda maddesinde başlangıçta bu oranın %0,1 olduğu varsayılır ise selektif zenginleştirme sonunda bu oran korunacak, petri kutusunda 100 koloni oluşması sağlanacak şekilde yapılan seyreltme sonunda petri kutusuna hedef bakteriden bir adedin koloni oluşturma olasılığı %10 olacak, bir diğer değişle %90 olasılıkla petri kutusunda hedef bakteri koloni oluşturmayacaktır. Bu koşulda *E. coli* O157:H7' nin koloni oluşturmaları için petri kutusunda 1000 koloni oluşacak şekilde seyreltme yapılması gerekmektedir, ancak bu koşulda da refakatçi bakteri kolonileri hedef bakteriyi maskeleyecek ve 1000 koloni içinden *E. coli* O157:H7' nin seçilip izolasyonu mümkün olmayacaktır. Klasik yöntemlerle yapılan analizlerle yakın akraba refakatçi floranın inhibisyonu üzerinde pek çok çalışma yapılmaktadır. Bunların inhibisyonu için yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı, düşük pH, çeşitli antibiyotiklerin kullanılması, kısa inkübasyon süresi gibi faktörler araştırılmaktadır[24].

Yapılan bir araştırmada brain-heart infusion besi yerinde *H. alei* 'nin gelişmesi *E. coli* O157:H7' nin gelişmesini kayda değer ölçüde engellediği gösterilmiştir [25]. Bu durumda klasik yöntemlerle analiz edilen örnekte *E. coli* O157:H7 varlığının belirlenmesi bir anlamda refakatçi floranın baskılanabilmesi ile doğrudan ilişkilidir.

Gıdalarda fekal koliformların ve dolayısı ile *E. coli*' nin belirlenmesi için kullanılan inkübasyon sıcaklığı olan 44-45,5 °C sıcaklık sınırı refakatçi floranın

gelişimini baskımlarken, *E. coli*'nin gelişimini teşvik etmekte, ancak *E. coli* O157:H7 bu sınırdan zayıf olarak gelişmektedir. *E. coli* O157:H7, *E. coli* tip 1 ve diğer koliformların EC Broth besi yerinde gelişmeleri ve gaz oluşturmaları için gerekli en düşük ve en yüksek sıcaklığın araştırıldığı bir çalışmada *E. coli* O157:H7'nin gelişebildiği sıcaklık sınırları 24 saatte 24,3-41,0 °C ; 36 saatte 19,3-41,0 °C ve 48 saatte 19,3-41,0 °C olarak bulunmuştur. Benzer şekilde TS broth besi yerinde gelişme sıcaklık sınırınının 20-42 °C olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular fekal koliform ve *E. coli*'nin standart aranma yönteminde kullanılan 44,5 °C ın . *E. coli* O157:H7 serotipinin gelişmesine olanak tanımadığını, bu nedenle gıdalarda *E. coli* aranmasına yönelik olarak kullanılan geleneksel yöntemler ile *E. coli* O157:H7 belirlenmesi söz konusu olmayacağını göstermiştir [1, 7, 22]. Benzer şekilde yapılan bir başka çalışmada *E. coli* O157:H7 serotipinin belirlenmesi için en uygun inkübasyon sıcaklığı 41-42 °C olarak bulunmuştur [26].

Selektif katı besiyeri olarak bugün en yaygın kullanılan sorbitol MacConkey Agar (SMAC) ve bu besiyerinin çeşitli modifikasyonlarıdır. Bu besiyerinin standart MacConkey agardan farkı bileşimindeki laktoz yerine sorbitol bulunmasıdır. *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol negatif olduğu için bu besiyerinde renksiz koloniler oluşturmakta, buna karşın sorbitolü kullanan bakterilerin oluşturduğu asitlik bir pH indikatörü yardımı ile kolonilerin kırmızı görülmesine neden olmakta, böylece *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol pozitif bakterilerden ayırt edilmektedir. Her ne kadar *E. coli*'lerin çoğu sorbitolü fermente edebilirken %6 kadar *E. coli* sorbitol negatiftir. Bu nedenle her sorbitol negatif *E. coli* suşu O157:H7 serotipi olarak değerlendirilmemelidir [22].

Klasik yöntemlerle bir çok enfeksiyon teşhis edilebilmekte ise de bunlar bazen yetersiz kalabilmekte ve özellikle refakatçi floranın maskeleymesi nedeniyle çoğu kez sahte negatif sonuçlar alınabilmektedir. Bu nedenle Enzim Bağlı İmmün Deney (ELISA), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), immunoblot analizleri, direkt immüno Floresan ve immün yakalama teknikleri gibi modern yöntemler de bu bakterinin aranmasında kullanılmaktadır [24, 26].

İmmün yakalama tekniklerinden biri olan İmmunomagnetik Ayırım (IMS), farklı kaynaklarda bakteri aranmasında kullanılan etkili bir yöntemdir. Yöntemin

esasını manyetik boncuklara bağlı durumdaki hedef bakteriye spesifik antibadilerin hedef bakteriyi yakalaması oluşturmaktadır. Boncuklara bağlı antikorlar hedef bakteriyi yakaladıktan sonra oluşturulan manyetik alan ile çekilen boncuklar bakterinin ortamdan izolasyonunu sağlamaktadır. Yöntem özellikle hedef bakterinin örneklerde az sayıda bulunduğu durumlarda avantajlıdır. Çünkü bu yöntem ile yapılan bir ön zenginleştirme çalışması incelenen örnekteki hedef bakterinin varlığı üzerine oldukça güvenilir bir sonuç verecektir [27].

Bu çalışmada da Eskişehir'de satışa sunulmuş olan et ve et ürünlerinde *E. coli* O157:H7 varlığının araştırılması amacıyla kültürel yöntemler, PCR ve serolojik testler kullanılmış, hedef bakteri deteksiyonu için bu farklı yöntemlerin birbirlerine olan üstünlükleri ortaya konmaya çalışılmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Et Örnekleri

Çalışmamızda *Escherichia coli* O157:H7 varlığı açısından incelenecek olan et ve et ürünleri Eskişehir ili içerisindeki farklı market ve kasaplardan temin edilmiş ve en kısa zamanda laboratuvar ortamına getirilerek incelemeye alınmışlardır. Çalışmamızda incelenmiş olan et örnekleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Çalışmada incelenmiş olan et örnekleri

Örnek No	Alındığı Yer/Alındığı Tarih	Örneğin özelliği
1	Akarbaşı/Ocak 2003	Dana Kıyma
2	Köprübaşı/Ocak 2003	Dana Kıyma
3	Tunalı/Ocak 2003	Dana Kıyma
4	Yediler/Ocak 2003	Dana Kıyma
5	Akarbaşı/Ocak 2003	Dana Kıyma
6	Köprübaşı/Ocak 2003	Dana Kıyma
7	Köprübaşı/Ocak 2003	Dana Kıyma
8	Köprübaşı/Ocak 2003	Dana Kıyma
9	Köprübaşı/Ocak 2003	Dana Kıyma
10	Akarbaşı/Ocak 2003	Dana Kıyma
11	Tunalı/Şubat 2003	Dana Kıyma
12	Akarbaşı/Şubat 2003	Dana Kıyma
13	Köprübaşı/Şubat 2003	Dana Kıyma
14	Yediler/Şubat 2003	Dana Kıyma
15	Akarbaşı/Mart 2003	Dana Kıyma
16	Köprübaşı/Mart 2003	Dana Kıyma
17	Tunalı/Mart 2003	Dana Kıyma
18	Akarbaşı/Mart 2003	Dana Kıyma
19	Akarbaşı/Mart 2003	Dana Kıyma
20	Köprübaşı/Mart 2003	Dana Kıyma

21	Yediler/Nisan 2003	Dana Kıyma
22	Akarbaşı/Nisan 2003	Dana Kıyma
23	Akarbaşı/Nisan 2003	Dana Kıyma
24	Köprübaşı/Nisan 2003	Dana Kıyma
25	Akarbaşı/Mayıs 2003	Dana Kıyma
26	Köprübaşı/Mayıs 2003	Dana Kıyma
27	Yediler/Mayıs 2003	Dana Kıyma
28	Akarbaşı/Haziran 2003	Dana Kıyma
29	Köprübaşı/Haziran 2003	Dana Kıyma
30	Yediler/Haziran 2003	Dana Kıyma
31	Akarbaşı/Temmuz 2003	Dana Kıyma
32	Köprübaşı/Temmuz 2003	Dana Kıyma
33	Akarbaşı/Temmuz 2003	Dana Kıyma
34	Yediler/Temmuz 2003	Dana Kıyma
35	Tunalı/Temmuz 2003	Dana Kıyma
36	Akarbaşı/Ağustos 2003	Dana Kıyma
37	Tunalı/Ağustos 2003	Dana Kıyma
38	Akarbaşı/Eylül 2003	Dana Kıyma
39	Akarbaşı/Eylül 2003	Dana Kıyma
40	Akarbaşı/Ekim 2003	Dana Kıyma
41	Köprübaşı/Ekim 2003	Dana Kıyma
42	Akarbaşı/Kasım 2003	Dana Kıyma
43	Köprübaşı/Kasım 2003	Dana Kıyma
44	Akarbaşı/Kasım 2003	Dana Kıyma
45	Yediler/Kasım 2003	Dana Kıyma
46	Akarbaşı/Temmuz 2003	Dana Kıyma
47	Köprübaşı/Kası 2003	Dana Kıyma
48	Akarbaşı/Mart 2003	Sucuk
49	Afyon/Temmuz 2003	Sucuk
50	Köprübaşı/Kasım 2003	Sucuk

### 2.1.2. Test Bakterileri

Çalışmamızda kullanılan *Escherichia coli* O157:H7 referans kültürü Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünden temin edilmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan diğer test bakterileri ise Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarındaki referans bakterilerden seçilmişlerdir. Çalışmada kullanılan diğer test bakterileri *Escherichia coli* (NRRL B-3704) ve *Salmonella typhimurium* (NRRL B-4420) Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden sağlanmıştır.

### 2.1.3. Besiyerleri ve Tampon Çözeltiler

#### 2.1.3.1. NUTRIENT BROTH

Nutrient Broth.....8gr  
Distile su.....1000ml

Tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [28].

#### 2.1.3.2. NUTRIENT AGAR

Nutrient Agar.....20 gr  
Distile Su.....1000 ml

121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [28].

### 2.1.3.3. VİOLET RED BİLE AGAR

Violet Red Bile Agar.....	38,5 gr
Distile Su.....	1000 ml

121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [28].

### 2.1.3.4. SORBİTOL MACCONKEY AGAR (SMAC)

Sorbitol MacConkey Agar.....	51.6 gr
Distile Su.....	1000 ml

121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [7].

### 2.1.3.5. SEFİKSİM-TELLURİT ilaveli SORBİTOL MACCONKEY AGAR (CT-SMAC)

Sorbitol MacConkey Agar.....	51.6 gr
Distile Su.....	1000 ml

121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Agar 45-50°C'ye kadar soğuduktan sonra steril şartlar altında 250 mikrolitre/litre Sefiksim-Tellurit eklenerek karıştırıldıktan sonra petrilere dökülmüştür [7, 27].

### 2.1.3.6. PLATE COUNT AGAR

Plate Count Agar.....	22.5 gr
Distile Su.....	1000 ml

121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [28].

### 2.1.3.7. TRYPTİC SOYA BROTH

Tryptic Soya Broth.....	30 gr
Distile Su.....	1000 ml

121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [28].

### 2.1.3.8. FOSFAT TAMPONLU TUZ (PBS) (0.01 M, pH 7.2)

NaCl.....	8gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O.....	2.7gr
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0.4gr
Distile su.....	1000ml

121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [29].

### 2.1.3.9. PBS-TWEEN 20

NaCl.....	8gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O.....	2.7gr
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0.4gr
Tween-20.....	0.5 ml
Distile su.....	1000ml

121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [29].

### 2.1.3.10. TRİS-EDTA (TE) TAMPONU

10 mM Tris-HCl ve 1 mM EDTA istenilen hacimde hazırlanarak pH'sı 8.0'a ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır [29].



### 2.1.3.11. %10'luk SODYUM DODESİLSÜLFAT (SDS) ÇÖZELTİSİ

SDS.....10 gr  
Distile Su.....100 ml

Oda sıcaklığında saklanmıştır [29].

### 2.1.3.12. 2X ÖRNEK UYGULAMA TAMPONU

Tris.....2.5 ml  
SDS.....4 ml  
Gliserol.....2ml  
2-Merkaptoetanol.....1ml  
Bromophenol blue.....0.01 g  
H<sub>2</sub>O.....10 ml'ye tamamlanmıştır.

Kullanılacak hacimlere bölünmüş ve derin dondurucuda (-20°C) saklanmıştır [29].

### 2.1.3.13. TRİS SİTRAT

Tris.....12.1 g  
Sitrik asit.....6.6 g  
Distile su.....1000 ml

Oda sıcaklığında saklanmıştır [29].

### 2.1.3.14. 5X TANK TAMPONU

Tris.....15 g  
SDS.....72 g  
Gliserol.....5 g  
H<sub>2</sub>O.....1 litreye tamamlanmıştır.

4°C' de saklanmıştır. Kullanılacağı zaman oda sıcaklığına getirilerek, 5 kez sulandırılmıştır [29].

#### 2.1.3.15. 1,5 M TRİS

Tris.....18.15 g

Distile su.....100 ml

pH'sı 8,8'e ayarlanarak otoklavlanmıştır [29].

#### 2.1.3.16. 1 M TRİS

Tris.....12.1 g

Distile su.....100 ml

pH'sı 6,8'e ayarlanarak otoklavlanmıştır [29].

#### 2.1.3.17. %10'luk AMONYUMPERSÜLFAT ÇÖZELTİSİ

Amonyum persülfat.....0.5 g

H<sub>2</sub>O.....5 ml tamamlanmıştır.

Küçük hacimler halinde -20°C'de saklanmıştır [29].

#### 2.1.3.18. JEL BOYAMA SOLÜSYONU

% 50 ( v / v ) Metanol

% 0.05 Coomassie brilliant blue R-250

% 10 ( v / v ) Asetik asit

% 40 H<sub>2</sub>O

Boya metanolde çözündürüldükten sonra asetik asit ve su eklenmiştir. Oda sıcaklığında saklanmıştır [29].

**2.1.3.19. DESTAİN SOLUSYONU**

- % 5 ( v / v ) Metanol
- % 7 ( v / v ) Asetik asit
- % 88 H<sub>2</sub>O

Oda sıcaklığında saklanmıştır [29].

**2.1.3.20. FİKSATİF SOLUSYONU**

- % 50 ( v / v ) Metanol
- % 10 ( v / v ) Asetik asit
- % 40 H<sub>2</sub>O

Oda sıcaklığında saklanır [29].

**2.1.3.21. % 10'LUK AYIRMA JELİ (10 ml)**

- Distile su.....4 ml
- % 30 Acrylamide karışımı.....3.3 ml
- 1,5 M Tris (pH 8,8).....2.5 ml
- % 10 SDS.....0.1 ml
- TEMED.....0.004 ml

Karışım süratle iki cam plaka arasına dökülerek donması için beklenmiştir [29].

**2.1.3.22. % 5'LİK YÜKLEME JELİ (3 ml)**

- Distile su.....2.1 ml
- % 30 Acrylamide karışımı.....0.5 ml
- 1,0 M Tris (pH 6,8).....0.38 ml
- % 10 SDS.....0.03 ml
- % 10 AMPS.....0.03 ml
- TEMED.....0.003

[29]

### 2.1.3.23. dNTP SOLUSYONU

100 mM lık stok dATP, dSTP, dGTP ve dTTP (Sigma) solusyonlarından 1.25' er mikrolitre steril bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 95 mikrolitre steril distile su eklenmiştir [30].

### 2.1.3.24. 1 mM TRİS-HCl pH 8.0)

Tris Base.....12.1 g  
Distile su.....80 ml

pH oda sıcaklığında 4 ml HCl eklenerek ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır [29].

### 2.1.3.25. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA.....14.6 g  
Distile su .....80 ml

 z ld kten sonra 100 ml'ye tamamlanmıştır. pH NaOH ile ayarlanmıştır [29].

### 2.1.3.26. TRİPTON BROTH

Tripton.....3 g  
NaCl.....0.3 g  
Distile Su.....100 ml

121 C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [28].

### 2.1.3.27.  - NAFTOL  ZELTİSİ

 -Naftol.....5 g  
Etanol (%95'lik).....100ml

$\alpha$ -Naftol Etanolde çözülerek hazırlanmıştır [28].

### 2.1.3.28. KOVAKS ÇÖZELTİSİ

Para-Dimetil Aminobenzaldehyt.....	5 g
Bütıl alkol.....	75 ml
% 37'lik HCl.....	25 ml

Para-Dimetil Aminobenzaldehyt alkolde çözülmüştür. Solüsyon su banyosunda hafifçe ısıtılmıştır. Bütün içerikler çözüldükten sonra HCl dikkatlice dökülüp karıştırılmıştır [28].

### 2.1.3.29. % 40'LİK KOH ÇÖZELTİSİ

KOH.....	40 g
Kreatin.....	0,3 g
Distile su.....	100 ml

KOH 75 ml distile suda çözülerek solusyon oda sıcaklığında bir süre bırakılmıştır. Daha sonra kreatin ilave edilmiş ve iyice çözüldükten sonra, distile suyun 25 ml'si eklenerek hazırlanmıştır [28].

### 2.1.3.30. SİMMON -SİTRAT AGAR

MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
NaCl.....	5 g
Amonyum Dihidrojen Fosfat.....	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
Sodyum Sitrat.....	5 g
Brom-Timol Mavisi (% 1'lik solüsyonundan).....	8 ml
Agar.....	15 g
Distile su.....	990 ml

Bütün içerikler suda çözülüp pH 7'ye ayarlandıktan sonra Brom-Timol Mavisi indikatörü ilave edilip steril edilmiştir [28].

#### 2.1.3.31. MR-VP BROTH

Pepton.....	7 g
Glukoz.....	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	5 g
Distile su .....	1000 ml

121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [28].

#### 2.1.3.32. METİL RED İNDİKATÖR ÇÖZELTİSİ

Metil red.....	0.1 g
Etanol (% 95'lik).....	250 ml
Distile su.....	250 ml

Metil red etanolde çözülüp üzerine distile su ilave edilerek iyice karıştırılır ve daha sonra filtre kağıdından süzülerek hazırlanır [28].

## 2.2. YÖNTEM

### 2.2.1. Et Örneklerinin Toplanması

Çalışmamızda incelemek amacıyla piyasada tüketime sunulmuş olan et ve et ürünleri Eskişehir'deki çeşitli market ve kasaplardan steril kavanozlara 100g alınarak laboratuvara getirilmiştir.

### 2.2.2. Et Örneklerindeki Toplam Bakteri Sayısının Tespiti

Et örneklerindeki toplam bakteri sayısının tespiti amacıyla et örneğinden 25 g steril şartlarda tartılarak 225 ml Tryptic Soy Broth (TSB) besiyeri ortamına alınmıştır. Besi ortamı birkaç dakika hafifçe çalkalandıktan sonra buradan 1 ml örnek alınarak 9 ml steril TSB içeren tüpe aktarılmış ve sonra aynı şekilde  $10^{-4}$ 'e kadar seyreltmesi yapılmıştır. Her seyreltme tüpünden 1'er ml alınarak steril petriye aktarılmış ve üzerine 45 °C'ye kadar soğutulmuş Plate Count Agar (PCA) dökülerek ortam katılaştıktan sonra 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra oluşan koloniler sayılmıştır [31, 32].

### 2.2.3. Et Örneklerindeki Koliform Grubu Bakterilerin Sayısının Tesbiti

225 ml steril TSB ortamına 25 g et örneğinin konmasından sonra toplam bakteri sayımında olduğu gibi  $10^{-4}$ 'e kadar seyreltmeler hazırlanmış ve her bir seyreltmeden 1'er ml alınarak steril bir petriye aktarılmıştır. Petrilere 45 °C'ye kadar soğutulmuş Viyolet Red Bile Agar (VRBA) dökülerek ortam katılaştıktan sonra 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra oluşan koloniler sayılmıştır [32].

### 2.2.4. Et Örneklerindeki *E. coli* O157:H7 Varlığının Kültürel Yöntemle Belirlenmesi

225 ml steril TSB ortamına 25 g et örneğinin konmasından sonra Sorbitol MacConkey agar (SMAC) ve Sefiksim Tellürid'li Sorbitol MacConkey agar (CT-

SMAC)' a 1'er ml yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petriler 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra oluşan *E. coli* O157:H7 olması muhtemel şüpheli şeffaf kolonilerin varlığı incelenmiştir.

Aynı işlemler et örneğinin TSB ortamına aktarılmasından sonraki 6. 18. ve 24. saat inkübasyondan sonra da tekrarlanmıştır. Şüpheli olarak görülen şeffaf koloniler saflaştırılarak daha sonraki tanımlama testleri için %15 lik gliserol içeren tüplerde -85° C'de saklanmışlardır [32].

### 2.2.5. Immuno Manyetik Ayırma Yöntemi (IMS) ile *E. coli* O157:H7 Varlığının Saptanması

Immunomanyetik ayırma yöntemi ile hedef bakterinin tespiti için et örneği zenginleştirme ortamına alındıktan sonra inkübasyonun 6. ve 18. saatlerinde bu sıvı ortamdan 1 ml alınmıştır. Bu 1 ml sıvı örnek aşağıda açıklandığı şekilde IMS yönteminde kullanılmıştır.

IMS yöntemi için üretici firmanın (Dynal) önerdiği prosedür uygulanmıştır. Buna göre; manyetik plate uzaklaştırılmış ve istenen miktarda mikrosantrifüj tüpü dynal MPC' ye yerleştirilmiştir. Dynabeads anti-*E. coli* O:157 dibindeki pelet gözle görülmez hale gelinceye kadar çalkalanarak süspanse edilmiştir. 20 µl. Dynabeads anti- *E. coli* O:157 herbir tüpe konulmuştur.

1 ml. Ön zenginleştirilmiş sıvı örnek eklenmiştir. Her bir yeni örnek için uç değiştirilmiş ve tüpün ağzı kapatılmıştır. Dynal MPC rakı birkaç kez baş aşağı çevrilmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk. Hafifçe sallanarak inkübe edilmiştir. Manyetik plate dynal MPC' ye yerleştirilmiş, rak birkaç kez baş aşağı edilerek, boncukların tüpün bir kenarında konsantre olması sağlanmış ve 3 dk. yeterli kazanım için beklenmiştir. Tüpün ağzı açılarak örnek süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Manyetik plate dynal MPC' den uzaklaştırılmıştır.

Pipetle çapraz kontaminasyona neden olmamak için tüpe dokunulmadan, 1 ml. yıkama tamponu (PBS-tween) eklenmiştir. Kapaklar kapatılmış ve dynal MPC baş aşağı edilerek boncukların resüspanse olması sağlanmıştır.

Manyetik plate dynal MPC' ye yerleştirilmiş, rak birkaç kez baş aşağı edilerek, boncukların tüpün bir kenarında konsantre olması sağlanmış ve 3 dk.



yeterli kazanım için beklenmiştir. Tüpün ağzı açılarak örnek süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Manyetik plate dynal MPC' den uzaklaştırılmıştır.

Pipetle çapraz kontaminasyona neden olmamak için tüpe dokunulmadan, 1 ml. yıkama tamponu (PBS-tween) eklenmiştir. Kapaklar kapatılmış ve dynal MPC baş aşağı edilerek boncukların resüspanse olması sağlanmıştır.

Manyetik plate dynal MPC'ye yerleştirilmiş, rak birkaç kez baş aşağı edilerek, boncukların tüpün bir kenarında konsantre olması sağlanmış ve 3 dk. yeterli kazanım için beklenmiştir. Tüpün ağzı açılarak örnek süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Manyetik plate dynal MPC' den uzaklaştırılmıştır.

Dynabeads bakteri kompleksi 100µl. yıkama tamponu (PBS-tween) içinde resüspanse edilerek vorteksle karıştırılmıştır.

*E. coli* O:157 İzolasyonu için IMS' den sonra, resüspanse boncuklar 50µl. olarak kültür ortamına transfer edilmiştir. Şüpheli kolonilerin deteksiyon şansını arttırmak için SMAC agar (CT-supplementli)'a ekim yapılmıştır. Boncuk-bakteri kompleksi steril eküvyon ile petrinin bir yarısına yayılmış ve buradan steril kürdan ile çizgiler çekilerek dilüsyon sağlanmıştır. Petriler 35-37 °C' de 18-24 saat inkübe edilmiştir [33].

### **2.2.6. PCR ile *E. coli* O157:H7 Varlığının Araştırılması**

PCR ile hedef bakteri aranması amacıyla kullanılan primerler ve bunlara ait özellikler Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. PCR'da kullanılan primerler ve özellikleri

<u>Locus</u>	<u>Oligomer</u>	<u>Sequence</u>
eaeA	Forward	CAA-TTT-TTC-AGG-GAA-TAA-CAT-TG
	Reverse	AAA-GTT-CAG-ATC-TTG-ATG-ACA-TTG
hlyA	Forward	AAG-CCG-GAA-CAG-TTC-TCT-CAG-C
	Reverse	CTC-CTT-CCC-GTT-GTT-TTC-TCA-G
stx1	Forward	TCT-TAT-CTG-GAT-TTA-ATG-TCG-C
	Reverse	TCA-GCT-GTC-ACA-GTA-ACA-AAC-C
stx2	Forward	TTA-TAC-CAC-TCT-GCA-ACG-TGT-C
	Reverse	AAC-TCC-ATT-AAC-GCC-AGA-TA-
SLT I	Forward	5'-CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG-3'
	Reverse	5'-CACCAGACAATGTAACCGCTG-3'
SLT II	Forward	5'-ATCCTATCCCCGGGAGTTTACG-3'
	Reverse	5'-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3'
H7	Forward	5'-GCGCTGTGTCGAGTTCTATCGAGC-3'
	Reverse	5'-CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC-3'

### 2.2.6.1. Genomik DNA İzolasyonu

Pozitif kontrol olarak kullandığımız referans *E. coli* O157:H7 genomik DNA'nın izolasyonu amacıyla 5 ml nutrient broth besi yerine tek koloniden ekim yapılmış ve 150 devir/dakika hızda 37 °C'de bir gece üremeye bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kültürün 1.5 ml'si 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak peletin üzerine 1 ml Tris-EDTA çözeltisi eklenerek vortekslenmiş ve tekrar 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Çökelti üzerine 567 µl TE+2.83 mg lizozim eklenmiş ve mikropipet yardımıyla süspansiyon haline getirilmiştir. 37 °C'de 30 dakika bekledikten sonra 30 µl %10'luk SDS eklenmiş ve 37 °C'de 15 dakika bekletilmiştir. Sonra sırasıyla 100 µl 5 M NaCl ve 80 µl CTAB/NaCl eklenerek

65 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. Üzerine eşit hacimde kloroform/isoamil alkol (24:1) eklenmiş ve 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Üst faz dikkatli bir şekilde alınıp temiz bir tüpe aktarılmış ve üzerine eşit hacim fenol/kloroform/isoamil alkol (25:24:1) eklenmiştir. 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra üst faz yeni bir tüpe alınmış ve üzerine 0.6 hacim isopropanol eklenmiştir. 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmıştır. Çökelti üzerine 10 µl %70'lik etanol konulmuş ve tüp hemen ters çevrilerek alkolün atılması sağlanmıştır. Oda sıcaklığında bir süre bekletilerek çökeltinin kuruması sağlanmış ve çökelti üzerine 100 µl TE konularak süspansiyon haline getirilmiş ve +4°C'de saklanmıştır. DNA izolasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğinin anlaşılması için TE ile çözelti haline getirilmiş olan örnekten 10µl uygun yükleme tamponuyla karıştırılarak %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve 80 V'da yürütüldükten sonra UV kutusunda incelenmiştir [29].

#### 2.2.6.2. eaeA Genine Spesifik Primerler ile Amplifikasyon

*E. coli* O157:H7 genomik DNA'sı template (kalıp) olarak kullanılmış ve eaeA geni için spesifik primerlerle aşağıdaki koşullar sağlanarak PCR ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. 25 µl'lik reaksiyon aşağıdaki oranlarda hazırlanmıştır [34].

2.5 µl TaqDNA Polimeraz Tamponu; 4 µl dNTP karışımı (her biri 200µM); 2.5µl MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM); 1µl Primer (1µM); Taq DNA Polimeraz 1 ünite; 3µl Kaynak DNA; 10µl steril distile su

##### 35 döngü

95°C 15 saniye

58°C 45 saniye

72°C 45 saniye

### 2.2.6.3. hlyA Genine Spesifik Primerler ile Amplifikasyon

*E. coli* O157:H7 genomik DNA'sı template (kalıp) olarak kullanılmış ve hlyA geni için spesifik primerlerle aşağıdaki koşullar sağlanarak PCR ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir [34].

25 µl'lik reaksiyon aşağıdaki oranlarda hazırlanmıştır.

2.5 µl TaqDNA Polimeraz Tamponu; 4 µl dNTP karışımı (her biri 200µM); 2.5µl MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM); 1µl Primer (1µM); Taq DNA Polimeraz 1 ünite; 3µl Kaynak DNA; 10µl steril distile su

#### 35 döngü

95°C 15 saniye

58°C 45 saniye

72°C 45 saniye

### 2.2.6.4. H7 Genine Spesifik Primerler ile Amplifikasyon

*E. coli* O157:H7 genomik DNA'sı template (kalıp) olarak kullanılmış ve H7 geni için spesifik primerlerle aşağıdaki koşullar sağlanarak PCR ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir [35].

25 µl'lik reaksiyon aşağıdaki oranlarda hazırlanmıştır.

2.5 µl TaqDNA Polimeraz Tamponu; 4 µl dNTP karışımı (her biri 200µM); 2.5µl MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM); 1µl Primer (1µM); Taq DNA Polimeraz 1 ünite; 3µl Kaynak DNA; 10µl steril distile su

#### 40 döngü

94°C 1 dakika

65°C 2 dakika

72°C 2 dakika

### 2.2.6.5. stx1 Genine Spesifik Primerler ile Amplifikasyon

*E.coli* O157:H7 genomik DNA'sı template (kalıp) olarak kullanılmış ve stx1 geni için spesifik primerlerle aşağıdaki koşullar sağlanarak PCR ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir [34].

25 µl'lik reaksiyon aşağıdaki oranlarda hazırlanmıştır.

2.5 µl TaqDNA Polimeraz Tamponu; 4 µl dNTP karışımı (her biri 200µM); 2.5µl MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM); 1µl Primer (1µM); Taq DNA Polimeraz 1 ünite; 3µl Kaynak DNA; 10µl steril distile su

#### 35 döngü

95°C 15 saniye

58°C 45 saniye

72°C 45 saniye

### 2.2.6.6. stx2 Genine Spesifik Primerler ile Amplifikasyon

*E.coli* O157:H7 genomik DNA'sı template (kalıp) olarak kullanılmış ve stx2 geni için spesifik primerlerle aşağıdaki koşullar sağlanarak PCR ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir [34].

25 µl'lik reaksiyon aşağıdaki oranlarda hazırlanmıştır.

2.5 µl TaqDNA Polimeraz Tamponu; 4 µl dNTP karışımı (her biri 200µM); 2.5µl MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM); 1µl Primer (1µM); Taq DNA Polimeraz 1 ünite; 3µl Kaynak DNA; 10µl steril distile su

#### 35 döngü

95°C 15 saniye

58°C 45 saniye

72°C 45 saniye

### 2.2.6.7. slt1 Genine Spesifik Primerler ile Amplifikasyon

*E. coli* O157:H7 genomik DNA'sı template (kalıp) olarak kullanılmış ve slt1 geni için spesifik primerlerle aşağıdaki koşullar sağlanarak PCR ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir [35].

25 µl'lik reaksiyon aşağıdaki oranlarda hazırlanmıştır.

2.5 µl TaqDNA Polimeraz Tamponu; 4 µl dNTP karışımı (her biri 200µM); 2.5µl MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM); 1µl Primer (1µM); Taq DNA Polimeraz 1 ünite; 3µl Kaynak DNA; 10µl steril distile su

40 döngü

94°C 1 dakika

65°C 2 dakika

72°C 2 dakika

### 2.2.6.8. slt2 Genine Spesifik Primerler ile Amplifikasyon

*E. coli* O157:H7 genomik DNA'sı template (kalıp) olarak kullanılmış ve slt2 geni için spesifik primerlerle aşağıdaki koşullar sağlanarak PCR ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir [35].

25 µl'lik reaksiyon aşağıdaki oranlarda hazırlanmıştır.

2.5 µl TaqDNA Polimeraz Tamponu; 4 µl dNTP karışımı (her biri 200µM); 2.5µl MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM); 1µl Primer (1µM); Taq DNA Polimeraz 1 ünite; 3µl Kaynak DNA; 10µl steril distile su

40 döngü

94°C 1 dakika

65°C 2 dakika

72°C 2 dakika

### 2.2.6.9. Et Örneklerindeki *E. coli* O157:H7'lerin belirlenmesi için PCR

Et örneklerindeki *E. coli* O157:H7'lerin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada bu örneklerdeki kalıp DNA'ların hazırlanması kaynatma metodu [35] ile yapılmıştır. Bu amaçla zenginleştirme ortamından inkübasyonun 6. ve 18. saatlerinde alınan 1 ml örnek 12.000 g'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet 1 ml steril su içinde çözülerek 15-20 dakika kaynatılmış ve çözünmeyen materyallerin uzaklaştırılması için 5 dakikalık bir santrifüj yapılmıştır. Süpernatant kısmı kalıp DNA olarak kullanılmıştır. PCR koşulları ise denenen her primer için yukarıda açıklandığı gibi yapılmıştır.

PCR ürünleri %1.2'lik agaroz jelde gözlenmiştir [35].

### 2.2.7. Lateks Agglutinasyon Testi ile O157 ve H7 Antijenlerinin Tesbiti

SMAC ve CT-SMAC besiyerlerinde inkübasyondan sonra şeffaf görünen şüpheli koloniler diğer biyokimyasal testlerin yanında lateks agglutinasyon testine de tabi tutulmuşlardır. Özel test kiti O157 ve H7 ayırımını yapabilecek nitelikte antبادileri içermektedir ve özel bir yüzey üzerinde test edilecek et örneği ve O157 antiserumu ya da H7 antiserumu bir kürdan yardımıyla karıştırıldıktan sonra agglutinasyon varlığı pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir. Lateks agglutinasyon testi aynı zamanda *Escherichia coli* (NRRL B-3704) ve *Salmonella typhimurium* (NRRL B-4420) test bakterilerine de uygulanmış ve negatif kontrol olarak değerlendirmeye alınmışlardır.

### 2.2.8. Biyokimyasal Testler

SMAC, CT-SMAC ve VRBA petrilerinde şüpheli olarak görülen kolonilerin dışında farklı karakterlerdeki koloniler de saflaştırılarak bunların biyokimyasal testleri yapılmıştır [28].

### 2.2.8.1. İndol Testi

Tripton brothlu tüplere izolatlar inoküle edilerek 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda her tüpe yaklaşık 1 ml kloroform ilave edilerek iyice çalkalanmıştır.

Daha sonra tüpe birkaç damla Kovaks çözeltisinden damlatılarak hafifçe çalkalanmış ve kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir [28].

### 2.2.8.2. Metil-Red Testi

MR-VP broth içeren tüplere organizmalar aşılandıktan sonra 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, kültür ortamından 2ml alınarak üzerine 5 damla metil kırmızısı çözeltisinden damlatılmıştır.Üst kısımda kırmızı bir rengik oluşumu pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir [28].

### 2.2.8.3. Voges-Proskauer Testi

MR-VP broth içeren tüplere organizmalar aşılandıktan sonra, 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, kültür üzerine 0.5 ml  $\alpha$ -Naftol çözeltisinden ve daha sonra 0.5 ml KOH çözeltisinden ilave edilmiştir.Tüpler çalkalanarak 5-10 dakika beklenmiş ve kırmızı renge dönüşüm pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir [28].

### 2.2.8.4. Sitrat Testi

Simon Sitrat agar içeren tüplere inokülasyondan sonra, 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda, besi yeri renginin yeşilden maviye dönüşümü pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir [28].



## 2.2.9. PROTEİN ANALİZLERİ

### 2.2.9.1. TOTAL HÜCRE PROTEİNLERİNİN ELDESİ

Bakteri hücreleri öncelikle katı besi ortamında aktif hale getirilmiş sonra da 100 ml nütrient broth içine yoğun aşılama yapılarak çalkalamalı etüvde (37 °C) 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra steril santrifüj tüplerinde 10.000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifügasyon yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet üzerine 8 mg lizozim ve 4 ml Tris-citrate tamponundan i lave edilerek o da sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tüpler vortex ve elde hafifçe karıştırılarak homojen süspansiyon haline getirilmiştir. Sonikatör şişelerine aktarılan süspansiyonlar 3 sn-3 sn periyotlarda buz üzerinde 5-6 dakika sonike edildikten sonra kırılma 40X objektifle gözlenmiştir. Elde edilen süspansiyon 20.000 g'de 20 dakika +4°C'de santrifüj edilmiş, pelete dokunulmadan sadece süpernatant kısmı küçük hacimler halinde ependorflara paylaştırılmış, etiketlenmiş ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir [36].

### 2.2.9.2. Bradford Yöntemi ile Örneklerdeki Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Sonike edilmiş olan örneklerdeki protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla Bradford yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde ilk olarak Bovin serum albumin proteininin bir dilüsyon serisi Bradford boyası içinde hazırlanmış ve A<sub>595</sub>'de spektrofotometrede yapılan ölçüm ile bir standart eğri oluşturulmuştur. Daha sonra kendi örneklerimizin A<sub>595</sub>'deki absorbansı spektrofotometrede okunmuş, bulunan değer standart eğri yardımıyla o örnekteki protein miktarının µg/ml cinsinden hesaplanmasında kullanılmıştır [37].

### 2.2.9.3.SDS POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ

Elektroforez için gerekli olan malzemeler hazırlandıktan sonra tümü uygun ortamlarda muhafaza edilmiştir. Elektroforez tankı uygun biçimde kurulduktan sonra jelin hazırlanması işlemine geçilmiştir.

%10'luk 10 ml ayırma jelinin hazırlanması gerekli olan H<sub>2</sub>O, %30 akrilamid karışımı, 1.5 M Tris (pH 8.8), %10 SDS, %10 AMPS ve TEMED materyal bölümünde belirtildiği miktarlarda steril sarı ve mavi uçlar aracılığıyla temiz bir tüp içinde hazırlanmış ve sonrada jel ağıtına karışım boşaltılmıştır. Düz bir yüzey elde etmek için dökülen jel üzerine su ile doyurulmuş bütanolde 4-5 damla ilave edilmiştir. Jel donduktan sonra bütanol distile su ile temizlenmiş ve kurutma kağıdı aracılığıyla da suyu alınmıştır.

3 ml yükleme jelinin hazırlanması için gerekli olan H<sub>2</sub>O, %30 akrilamid karışımı, 1 M Tris (pH 6.8), %10 SDS, %10 AMPS ve TEMED gerekli miktarda steril mavi ve sarı uçlar aracılığıyla hazırlanmış ve donmuş olan yükleme jelinin üzerine dökülmüştür. Bu işlemi takiben 12 çukurlu tarak teli yerleştirilmiştir. Yükleme jeli kurulduktan sonra 1X yürütme tamponu ile elektroforez tankı doldurulmuş, tarak jeli bozmayacak şekilde dikkatlice çıkarılmış ve tarağın oluşturduğu çukurlara numara verilmiştir.

Jel dökme işlemi bittikten sonra yürütülecek protein örnekleri ve işaretleyici protein temiz ependorf tüpleri içinde hazırlanmıştır. Jel çukurlarına yüklenen protein miktarının 25µg/30µl-30µg/30µl arasında olmasına özen gösterilmiştir.

30µl protein örneğinin üzerine 10µl 2X jel yükleme tamponu ilave edilerek toplam 40µl hacim elde edilmiştir. Benzer şekilde 5µl geniş aralıklı işaretleyici protein (MBI Fermentas Protein Ladder 10-200 kDa SM0661 200-150-120-100-85-70-60-50-40-30-25-20-15-10) üzerine 10µl 2X jel yükleme tamponu ve 25 µl distile su ilave edilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan protein örnekleri 2-3 dakika kaynayan su içinde bekletilmiş ve ependorflarda toplanan su buharını toplamak için 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Hazırlanan protein örnekleri Hamilton şırınga yardımı ile donmuş jelde oluşmuş çukura aktarılmış ve 80 V'luk elektrik akımı uygulanarak elektroforeze tabi tutulmuştur. Boya ayırma jelinin başlangıç çizgisine geldiğinde güç kaynağı 120 V'a ayarlanmıştır. Boya jelin sonuna ulaştığında elektroforeze son verilmiş ve jel elektroforez tankından çıkarılmıştır. Temiz bir kaba alınan jel, jel boyası (Coomasie Brilliant Blue) ile en az 2 saat boyanmıştır. Boyama işleminden sonra yıkama tamponunu içine konulan jel bir gece boyunca hafifçe çalkalanarak fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. daha sonra jel, koruma solüsyonu içine alınarak fotoğrafları çekilmiştir [29].

## 2.2.10. PLAZMİD ANALİZİ

### 2.2.10.1. ALKALİ-LİZİS YÖNTEMİ İLE PLAZMİD İZOLASYONU

5 ml nütrient broth içine tek koloniden ekim yapılmıştır. 150 devir/dakika hızda, 37 °C'da, bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda 5000 devir/dakika hızda, 4°C'da, 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

Pelet üzerine 1 ml TE konulduktan sonra vorteks yardımı ile süspansiyon haline getirilmiş ve 1.5 ml'lik tüpe aktarılmıştır.

10.000 devir/dakika hızda, 4 °C'da 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

Pelet üzerine 100 µl solüsyon I (50 mM Glukoz, 25 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) eklenerek, vorteks yardımı ile süspansiyon haline getirilmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Üzerine 200 µl solüsyon II (0.2 N NaOH, %1 SDS) eklenmiş ve alt üst edilerek karıştırılmıştır. 10 dakika buzda bekletilmiştir.

150 µl soğuk solüsyon III (60 ml 5 M potasyum asetat (Kac), 11.5 ml glasiyel asetik asit, 28.5 ml H<sub>2</sub>O, Etanol %100 (absolü)) eklenmiş ve alt üst edilerek karıştırılmıştır. 10 dakika buzda bekletilmiştir.

15.000 devir/dakika hızda, 4°C'da, 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant temiz bir tüpe alınmıştır.

Üzerine 2 hacim etanol eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

15.000 devir/dakika hızda, 4°C'da, 20 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Çökelti kuruyuncaya kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Pelet üzerine RNaz içeren (20 mg/ml) 50 µl TE eklenerek süspansiyon haline getirilmiştir [29].

### 2.2.10.2. Plazmidler için Agaroz Jel Elektroforezi

Kullanılacak jelin büyüklüğüne göre %1 oranında olacak şekilde tartılan agaroz TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu içinde kaynatma yolu ile çözündürülmüştür. 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra 0.5 µg/ml etidyum bromür ilave edilmiştir. Kenarları özel lastikleri ile kapatılarak sızdırmaz duruma getirilmiş olan özel kabına dökülerek, yükleme yapılacak kuyucukları oluşturacak tarak yerleştirilmiştir. Jel donduktan sonra jeli taşıyan kabın lastikleri uzaklaştırılarak bu kap elektroforez tankına alınmıştır. TBE tamponu ile dolu durumda olan tankın içerisinde tarak jelden uzaklaştırılarak yükleme için hazır hale getirilmiştir.

TE tamponu içinde çözülmüş durumda olan plazmid örneklerinden 10 µl alınarak 2 µl yükleme boyası ile karıştırılmış ve jeldeki kuyucuklara yüklenmişlerdir. Tüm örnekler jele uygulandıktan sonra plazmidlerin moleküler ağırlıklarını karşılaştırabilmek amacıyla 1kb DNA marker da jeldeki bir çukura yüklenip 80V akım ile 30-45 dakika yürütülmüştür. Süre sonunda jel UV transilluminatöre alınmış ve jel görüntüleme sisteminde gerekli incelemeler için fotoğraflanarak bilgisayara kaydedilmiştir [29].

### 2.2.11. HİNDİ KIYMASINDA CANLI KALMA SÜRESİNİN TESBİTİ

*E. coli* O157:H7 nin hindi kıymasında canlı kalma süresini tespit edebilmek için, marketten alınan kıyma örneği 25'er gramlık parçalara bölünmüş ve her 25 gramlık parçaya gramında 1-10, 10-100 ve 100-1000 canlı bakteri olacak şekilde *E. coli* O157:H7 aşılanmıştır. Bu örneklerde mevcut olarak bulunan bakteriyel yükün belirlenmesi için *E. coli* O157:H7 aşılması yapılmayan 25

gramlık bir parça TSB ortamına alınmış ve bir süre çalkalandıktan sonra PCA ve VRBA'ya ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılan bu petriler 37°C'de 1 gece inkübe edildikten sonra toplam bakteri ve toplam koliform sayıları kaydedilmiştir.

1-10, 10-100 ve 100-1000 canlı hücre/gram *E. coli* O157:H7 aşılansmış olan hindi kıyması örnekleri ise +4 °C'ye konmuştur. Aşılamanın yapıldığı gün 0. gün olarak kaydedilerek, bundan sonra 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerde bu örnekler TSB ortamına alınarak 37°C'de ön zenginleştirmeye tabi tutulduktan sonra diğer et örneklerinde olduğu gibi SMAC ve CT-SMAC besiyerlerine direkt ekim, İmmunomanyetik ayırımdan sonra CT-SMAC'a ekim ve PCR da farklı primerlerle hedef bakteriye ait genlerin saptanması amacıyla incelenmişlerdir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Et Örneklerindeki Toplam Bakteri Sayısının Tespiti

37 °C'de 1 gece inkübasyondan sonra PCA petrilerindeki koloniler sayılmıştır. 30-300 arasında koloniye sahip petriler seçilerek, dilüsyon faktörüne göre et örneğindeki toplam bakteri sayısı hesaplanmıştır. Buna göre çalışmamızda incelenmiş olan et örneklerindeki toplam bakteri sayıları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

#### 3.2. Et Örneklerindeki Koliform Grubu Bakterilerin Sayısının Tesbiti

37 °C'de 1 gece inkübasyondan sonra VRBA petrilerindeki koloniler sayılmıştır. 30-300 arasında koloniye sahip petriler seçilerek, dilüsyon faktörüne göre et örneğindeki koliform grubu bakteri sayısı hesaplanmıştır. Buna göre çalışmamızda incelenmiş olan et örneklerindeki koliform grubu bakteri sayıları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Et örneklerindeki toplam bakteri sayıları

ÖRNEK NO	Toplam Bakteri Sayısı	Koliform Grubu Bakteri sayısı
1	$2.10^6$	$1.10^4$
2	$1.10^3$	$8.10^2$
3	$2.10^4$	$4.10^3$
4	$9.10^3$	$2.10^2$
5	$5.10^3$	$3.10^2$
6	$3.10^2$	$2.10^2$
7	$8.10^2$	$2.10^2$
8	$7.10^1$	$5.10^1$
9	$1.10^6$	$2.10^3$
10	$2.10^5$	$5.10^3$
11	$5.10^3$	$3.10^2$
12	$6.10^2$	$1.10^1$
13	$4.10^3$	$6.10^2$

14	$3 \cdot 10^2$	$7 \cdot 10^1$
<b>15</b>	$3 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^2$
16	$2 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2$
17	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^3$
18	$1 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^2$
19	$4 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^3$
20	$3 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^1$
21	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^2$
22	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^2$
23	$5 \cdot 10^2$	$6 \cdot 10^1$
24	$4 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^3$
25	$2 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^1$
26	$1 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^3$
27	$2 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^1$
28	$3 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^4$
29	$5 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^1$
30	$9 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^1$
31	$2 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$
32	$2 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^2$
33	$6 \cdot 10^2$	$7 \cdot 10^1$
34	$5 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^2$
35	$1 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^2$
36	$6 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$
37	$2 \cdot 10^2$	$7 \cdot 10^1$
<b>38</b>	$9 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$
39	$3 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^2$
40	$2 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^2$
41	$6 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2$
42	$1 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^1$
43	$8 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^1$
44	$4 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^1$
45	$2 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^2$
46	$3 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^1$
47	$8 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$
48	$1 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^3$
49	$2 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^2$
50	$2 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^2$

### 3.3. Et Örneklerindeki *E. coli* O157:H7 Varlığının Kültürel Yöntemle Belirlenmesi

Et örneklerinde *E. coli* O157:H7 varlığının belirlenmesi amacıyla 0., 6., 18. ve 24. saatlerde zenginleştirme ortamından SMAC ve CT-SMAC besi ortamlarına ekim yapılmış ve 37°C'de 1 gece inkübasyondan sonra şüpheli şeffaf kolonilerin varlığı incelenmiştir.

Buna göre çalışmamız sırasında incelenen et örneklerinde 0. ve 6. saat ekimleri sonrasında hiçbir şüpheli koloni izole edilememiştir. 15 ve 38 numaralı et örneklerinin 18. ve 24. saat ekimleri sonrasında şüpheli koloniler elde edilmiş ve bunların *E. coli* O157:H7 oldukları daha sonraki testlerle doğrulanmıştır.

### 3.4. Immuno Manyetik Ayırma Yöntemi (IMS) ile *E. coli* O157:H7 Varlığının Saptanması

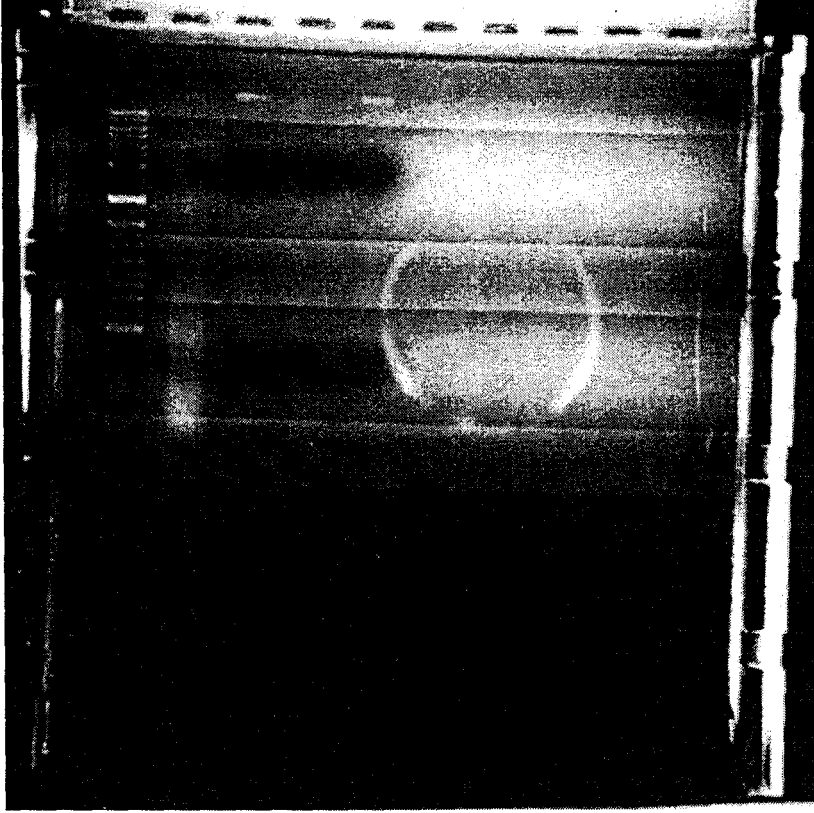
Et örneklerinde *E. coli* O157:H7 varlığının belirlenmesi amacıyla 6. ve 18. saatlerde zenginleştirme ortamından alınan 1 ml örnek immunomanyetik ayırım işlemine tabi tutulmuş ve işlem sonrasında 50 mikrolitre CT-SMAC besi ortamına ekilerek ve 37°C'de 1 gece inkübasyondan sonra şüpheli şeffaf kolonilerin varlığı incelenmiştir.

Çalışmamızda incelenen 50 et örneği arasında 1 tanesi (15. örnek) 6. saat immunomanyetik ayırım işleminden sonra ve 5 tanesi (29., 38., 42., 45. ve 48. örnekler) 18. saat immunomanyetik ayırımdan sonra pozitif olarak sonuç vermişlerdir.

### 3.5. PCR ile *E. coli* O157:H7 Varlığının Araştırılması

Çalışmamızda PCR yöntemini kullanarak et örneklerindeki *E. coli* O157:H7 varlığının belirlenmesi amacıyla ilk olarak bu bakteriye ait genomik DNA başarılı bir şekilde izole edilmiştir. Şekil 3.1'de *E. coli* O157:H7 genomik DNA'sının %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü verilmiştir.





Şekil 3.1. *E. coli* O157:H7 genomik DNA'sı

DNA izolasyonundan sonra stx1, stx2, eaeA, hlyA, slt1, slt2 ve H7 primerleri için ayrı ayrı reaksiyonlar kurularak bunların optimizasyonları sağlanmaya çalışılmıştır. 25 µl'lik reaksiyon aşağıdaki oranlarda hazırlanmıştır.

2.5 µl TaqDNA Polimeraz Tamponu; 4 µl dNTP karışımı (her biri 200µM); 2.5µl MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM); 1µl Primer (1µM); Taq DNA Polimeraz 1 ünite; 3µl Kaynak DNA; 10µl steril distile su

slt1, slt2 ve H7 primerleri ile amplifikasyon için aşağıdaki şartların en uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

40 döngü

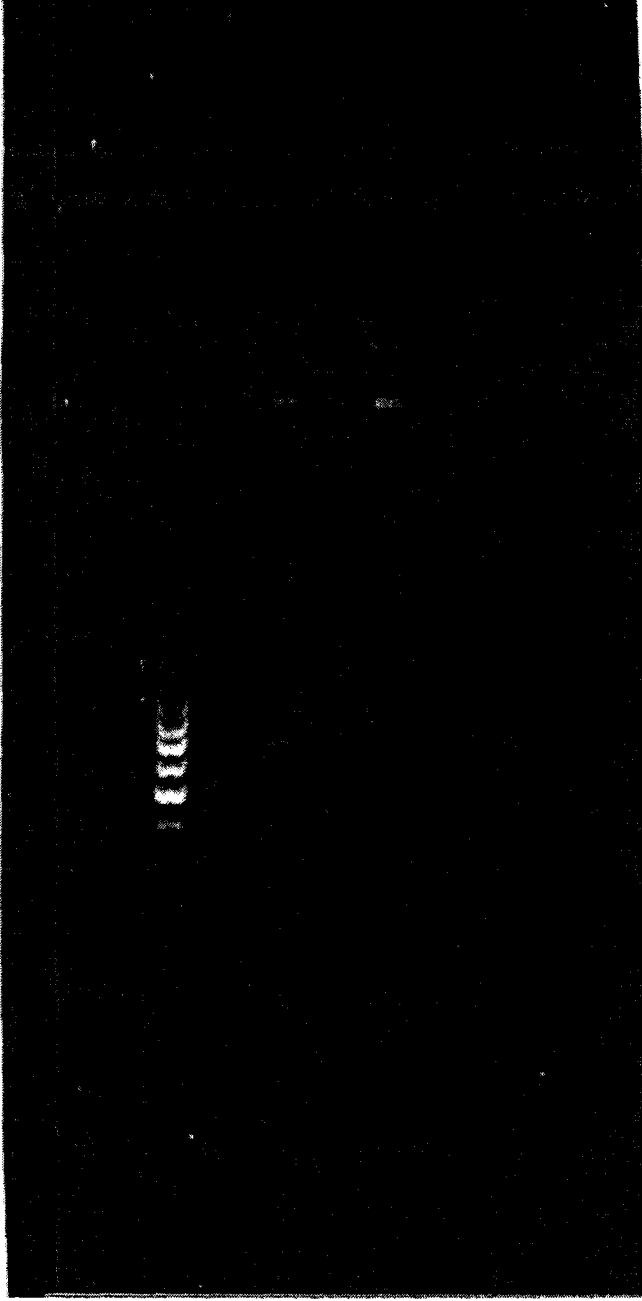
94°C 1 dakika

65°C 2 dakika

72°C 2 dakika

Bu genlerin amplifikasyon ürünleri beklenildiği gibi slt1 için 348 bp, slt2 için 584 bp ve H7 için ise 625 bp olarak gözlenmiştir.

PCR reaksiyonları sonucu oluşan ürünler %1.5 lik jelde gözlenmiştir. Şekil 3.2'de bu üç primerin referans bakteriye ait DNA ile verdikleri PCR ürünleri gösterilmektedir.



**Şekil 3.2. Agaroz jelde slt1, slt2 ve H7 primerlerinin verdiği reaksiyon ürünleri**

Şekil 3.2'de birinci çukurda GeneRuler 50 bp'lik marker (Fermentas), ikinci çukurda slt1, üçüncü ve dördüncü çukurlarda ise sırasıyla slt2 ve H7 primerlerinin reaksiyon ürünleri görülmektedir.

eaeA, hlyA, stx1 ve stx2 primerleri ile amplifikasyon için en uygun şartlar aşağıdaki gibi bulunmuştur.

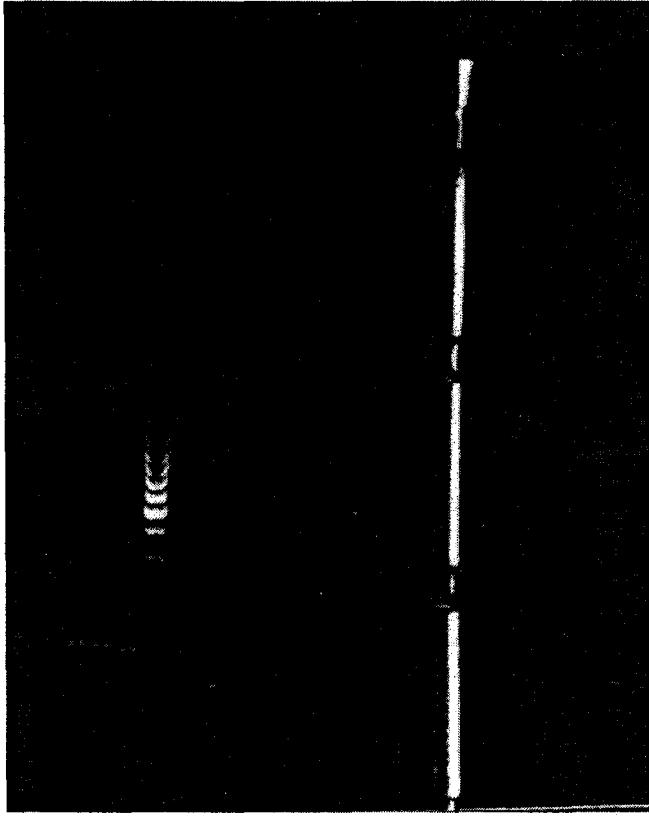
35 döngü

95oC 15 saniye

58oC 45 saniye

72oC 45 saniye

Bu genlerin amplifikasyon ürünleri sırasıyla 104 bp, 96 bp, 89 bp ve 96 bp olarak tespit edilmiştir. Bu ürünler %2'lik agaroz jelde gözlenmişlerdir. Şekil 3.3'de bu üç primerin referans bakteriye ait DNA ile verdikleri PCR ürünleri verilmiştir.



Şekil 3.3. Agaroz jelde eae, hlyA ve stx1 primerlerinin verdiği reaksiyon ürünleri

Şekil 3.3'de son çukurda GeneRuler 50 bp'lik marker (Fermentas), birinci çukurda eae, ikinci ve üçüncü çukurlarda ise sırasıyla hlyA ve stx1 primerlerinin reaksiyon ürünleri görülmektedir.



11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	+	+	+	+	-	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	+	+	-	+
30	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	+	+	+	+	-	+
39	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	+	+	-	-

43	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	+	+	-	+
46	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	+	+	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-

### 3.7. Lateks Agglutinasyon Testi ile O157 ve H7 Antijenlerinin Tesbiti

15, 29, 38, 42, 45 48 nolu et örneklerinden IMS'den sonra CT-SMAC'a yapılan ekim sonucunda şüpheli olarak görülen şeffaf koloniler lateks agglutinasyon test kiti (Wellcolex *E. coli* O157:H7) ile denenerek bu şüpheli kolonilerin O157 pozitif ve H7 pozitif oldukları yani hem O157 hem de H7 antikolarıyla agglütinasyon oluşturdukları gözlenmiştir.

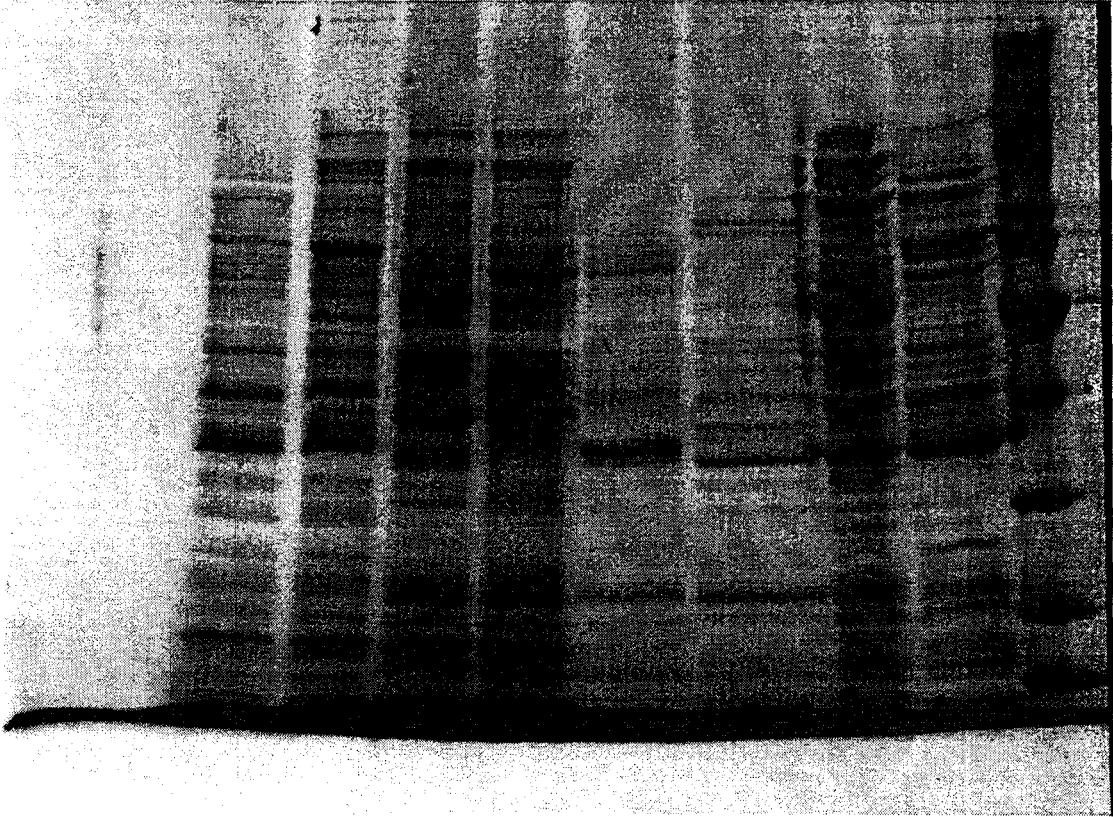
### 3.8. Biyokimyasal Testler

VRBA, SMAC ve CT-SMAC petrilerinden çekilerek saflaştırılan izolatlar IMVIC testleri uygulanmıştır. Bu farklı izolatlar için IMVIC testleri sonucunda teste tabi tutulan 80 izolattan 44 tanesinin *Enterobacter* spp., 36 tanesi *Escherichia coli* tip I olarak değerlendirilmiştir.

### 3.9. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Çalışmamızda *E. coli* O:157:H7 olarak tanımladığımız 6 izolatımızla beraber referans *E. coli* O:157:H7 ve *E. coli* NRRL B-3704 suşlarının toplam protein profilleri arasındaki benzerlikleri ortaya koymak amacıyla SDS-PAGE uygulanmıştır.

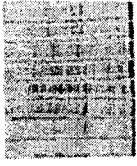
SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi uygulamasından sonra jel Jel Dokümantasyon Sisteminde fotoğraflanmıştır. Şekil 3.4'de SDS-PAGE sonundaki jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.4. SDS-PAGE işleminden sonra total protein profilleri (Sırasıyla 15, 29, 38, 42, 45, 48 nolu et örneklerinden izole edilen suşlar; *E. coli*, *E. coli* O157:H7 ve son çukurda marker (Protein ladder))

Jel Dokümantasyon Sisteminde yer alan UVI-Band isimli analiz programında SDS poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutulan bu örneklerin birbirleriyle olan homolojileri şekil 3.5'de gösterilmiştir.

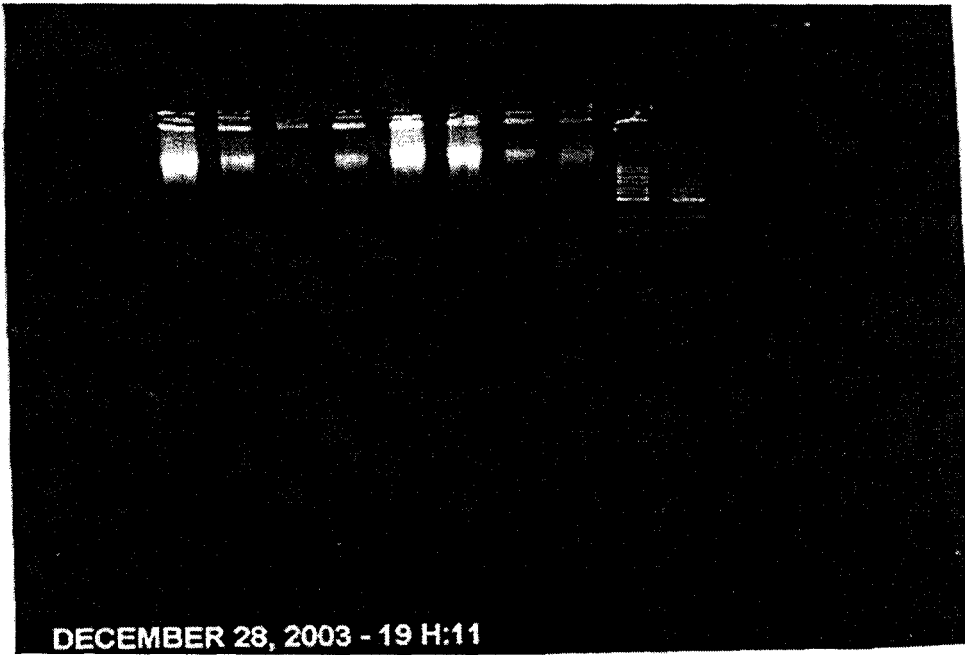




Şekil 3.5. UVI Band programı ile elde edilen örnekler arasındaki benzerlik dendrogramı

### 3.10. Plazmid Analizi

Yöntem kısmında belirtilen şekilde plazmid izolasyonu prosedürü uygulandıktan sonra agaroz jelde yürütülen örneklerin fotoğrafı Şekil 3.6'de verilmiştir.



Şekil 3.6. Plazmid izolasyonundan sonra örneklerin %1'lik jeldeki görüntüleri (Sırasıyla 15, 29, 38, 42, 45, 48 nolu et örneklerinden elde edilen izolatlar; *E. coli*, *E. coli* O157:H7 ve marker (1 kb Fermentas))

### 3.11. Hindi Kıymasında Canlı Kalma Süresinin Tesbiti

Hindi kıymasına farklı miktarlarda aşıl原因an ve +4 °C'ye alınan örneklerde farklı günlerde farklı yöntemler kullanılarak hedef bakteri araması yapılmıştır. Çizelge 3.3.'de bu farklı yöntemlerin deteksiyon sonuçları gösterilmektedir.

Çizelge 3.3. Hindi kıymasına aşıl原因an E. coli O157:H7 nin farklı yöntemlerle tesbiti

Gün	Aşıl原因an miktar Canlı hücre/gram	CT-SMAC		IMS		PCR	
		6.saat	18. saat	6.saat	18. saat	6.saat	18. saat
1. Gün	1-10	-	-	+	+	-	-
	10-100	-	+	+	+	-	-
	100-1000	-	+	+	+	+	-
3. Gün	1-10	-	-	+	+	-	-
	10-100	-	-	+	+	-	-
	100-1000	+	-	+	+	+	-
5. Gün	1-10	-	-	-	-	-	-
	10-100	-	-	+	+	-	-
	100-1000	-	-	+	+	-	-
7. Gün	1-10	-	-	-	-	-	-
	10-100	-	-	-	-	-	-
	100-1000	-	-	+	+	-	-
10. Gün	1-10	-	-	-	-	-	-
	10-100	-	-	-	-	-	-
	100-1000	-	-	-	-	-	-

+ = Pozitif sonuç (Hedef bakteri bulunmuştur)

- = Negatif sonuç (Hedef bakteri bulunamamıştır)

İncelenen hindi kıyması örneğinin toplam bakteri yükünün belirlenmesi amacıyla PCA besiyerine yapılan ekim sonrasında  $6.10^4$  bakteri içerdiği tespit edilmiştir. Aynı örnekten VRBA besi yerine yapılan ekimler ile de koliform grubu bakteri sayısı  $1.10^3$  ve olarak bulunmuştur.

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde gıdalarda bulunan patojenlerin tespiti halk sağlığı açısından çok büyük öneme sahiptir. Bu patojenlerin en önemlilerinden birisi de hiç kuşkusuz ki *E. coli* O157:H7 serotipidir.

Gıdalarda ve diğer kaynaklarda *E. coli* O157:H7'nin deteksiyonu üzerine bir çok çalışma yapılmış durumdadır [9, 10, 15].

*E. coli* O157:H7 serotipinin çeşitli gıda, klinik ve çevre örneklerinde aranmasına yönelik olarak kısaca klasik ve gelişmiş olarak iki ana grupta toplanabilecek çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Klasik yöntemlerin büyük çoğunluğu selektif zenginleştirme ve katı besiyerine ekim aşamalarını içeren var/yok testleri şeklindedir. Bu testler ile analiz edilen belirli bir miktar örnekte bu bakterinin varlığı ya da yokluğu araştırılmaktadır. Genellikle materyalde *E. coli* O157:H7'nin varlığının gösterilmesi selektif sıvı besiyerinde zenginleştirme, selektif ve ayırt edici bir katı besiyerine ekim ve son olarak da şüpheli kolonilerin biyokimyasal testlerle ya da serolojik testler kullanılarak O157 ve H7 olup olmadığının belirlenmesi şeklindedir.

Bahsedilen bu klasik yöntemlerle *E. coli* O157:H7 izolasyonunda yoğun refakatçi flora varlığına bağlı olarak sıklıkla “hatalı negatif” sonuçlar alınabilmektedir. Aynı zamanda zenginleştirme ortamı olarak kullanılan besiyerinde *E. coli* O157:H7 ile aynı düzeyde gelişebilen *E. coli* tip 1, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Hafnia alvei* gibi yakın akraba türler selektif katı besiyerinde de rahatlıkla gelişebilmekte ve eğer başlangıçtaki *E. coli* O157:H7 sayısı bu flora içinde yeterli bir oranda değilse bu bakterilerin baskılaması nedeniyle analiz sonucu hatalı olarak negatif olarak alınabilmektedir. Nitekim bizim yaptığımız çalışmada da, yukarıda bahsedilen kültürel metodlarla negatif olarak değerlendirdiğimiz bazı örneklerin diğer gelişmiş yöntemlerle pozitif olarak değerlendirilebilecekleri tesbit edilmiştir. Yani et örneklerinde bulunan mikrobiyal flora nedeniyle zenginleştirme ve seleksiyon amaçlı kullanılan besiyerlerinde hedef bakteri olan *E. coli* O157:H7 baskılanabilmekte ve tesbit edilememektedir.

Yapılan bir çalışmada *H. alvei*'nin brain heart broth besi ortamında *E. coli* O157:H7 gelişimini kayda değer ölçüde engellediği ortaya konmuştur [25].

Gıdalarda fekal koliformların dolayısıyla *E. coli* nin belirlenmesi için kullanılan inkübasyon sıcaklığı olan 44-45.5°C sıcaklık sınırı refakatçi floranın gelişimini baskımlarken *E. coli* nin gelişimini teşvik etmektedir. Ancak *E. coli* O157:H7 bu sıcaklıkta zayıf olarak gelişebilmektedir. Biz de yaptığımız ön çalışmalar da 44-45.5°C sıcaklıkta *E. coli* O157:H7 gelişimi için uygun olmadığını tespit ettik. Bu nedenle çalışmalarımız sırasında zenginleştirme ortamı için inkübasyon sıcaklığını 37°C olarak belirledik.

Selektif katı besiyeri olarak bugün en yaygın kullanılan SMAC agar ve bu besiyerinin modifikasyonlarıdır. Bu besiyerinin standart MacConkey agardan farkı bileşiminde laktöz yerine sorbitol bulunmasıdır. *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol negatif olduğu için bu besiyerinde renksiz koloniler oluşturmakta, buna karşılık sorbitolü kullanan bakterilerin oluşturduğu asitlik bir pH indikatörü ile kolonilerin kırmızı görünmesine neden olmakta, böylece *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol pozitif bakterilerden ayırt edilebilmektedir. Her ne kadar *E. coli*'lerin çoğu sorbitolü fermente edebilse de %6 kadarı da sorbitol negatiftir. Bu atipik suşlar gıdalarda da bulunabildiğinden her sorbitol negatif suş *E. coli* O157:H7 olarak değerlendirilmemeli serolojik testlerle ya da başka yöntemlerle kontrolü yapılmalıdır. Biz de çalışmamızda SMAC agar üzerinde elde ettiğimiz şüpheli sorbitol negatif renksiz kolonilerin bir çoğunun aslında *E. coli* O157:H7 olmadığını sonradan yaptığımız lateks agglütinasyon testi ile belirledik. Bu nedenle şüpheli kolonilerin mutlaka doğrulama testlerinin yapılması gerekmektedir.

Son dönemlerde yapılan çalışmaların çoğunda SMAC besi ortamına çeşitli katkıları eklenerek seçiciliği ve ayırt ediciliği arttırılmaya çalışılmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanları da sefiksim ve tellurittir. Biz de yapmış olduğumuz bu çalışmada CT-SMAC agarlı besiyerlerini kullandık. Elde ettiğimiz sonuçlara göre CT-SMAC oldukça seçici ve ayırd edici bir besi ortamı olarak bulunmuştur.

Klasik yöntemle *E. coli* O157:H7 aranmasında son aşama selektif katı besiyerinden izole edilen şüpheli kolonilerin tanımlanmasıdır. Bu tanımlama

O157 serotipi için biyokimyasal testlerle yapılabileceği gibi doğrudan lateks agglütinasyon testi ile de yapılabilmektedir. Ancak O157 olduğu belirlenen izolatin H7 olup olmadığı ancak H7 antiserumu ile belirlenebilmektedir. [38]. Bizim çalışmamızda da selektif katı ortamda şüpheli olarak bulunan kolonilerin lateks agglütinasyon testi ile O157 ve H7 antijeni içerip içermedikleri kontrol edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada araştırmacılar sığırdışkısından izole ettikleri ve *E. coli*'ler içinde sadece O157:H7 serotipine özgüllük gösteren spesifik bir kolifajın *E. coli* O157:H7 identifikasyonunda başarı ile kullanılabilceği gösterilmiştir [39].

Klasik yöntemlerle birçok enfeksiyon teşhis edilmekte ise de bunlar bazen yetersiz kalabilmekte ve özellikle refakatçi floranın maskeleymesi nedeni ile çoğu kez hatalı negatif sonuçlar alınabilmektedir. Bu nedenle, giderek gelişen analiz teknikleri içinde başta DNA esaslı testler ve immüno enzimatik yöntemler olmak üzere çeşitli analiz yöntemleri üzerinde çalışılmakta, bunlardan bir kısmı ticari olarak üretilip pazarlanmaktadır. Bu yöntemlere son zamanlarda yeni serolojik metodlar, özellikle, immüno assay (RIA), floresan immüno assay (FIA), enzim immüno assay (EIA), immüno peroksidaz testleri vb. katılarak bakterilerin belirlenmesinde daha güvenli ve erken sonuçlar alınabilmektedir. Ancak, bu testler pahalı olduğu gibi yetişmiş personele ve iyi donatılmış laboratuvarlara gereksinim duymaktadır. Bu kadar duyarlı olmalarına rağmen, bazı olgularda da yine çapraz reaksiyonlar ve şüpheli durumlar ortaya çıkmakta ve tanı gecikmektedir [12].

İmmünomanyetik ayırım yöntemi de son zamanlarda bu patojenin aranmasında oldukça sık kullanılan bir yöntem haline gelmiştir [24]. İmmünomanyetik ayırma yönteminde O157 spesifik antikorların paramanyetik parçacıklara tutturulması şeklindeki bir selektif zenginleştirme ile dışkıda gramda  $10^7$  koloni oluşturan birim koliform bakteri bulunurken  $10^2$  kob/gr düzeyinde *E. coli* O157:H7 belirlenebilmiştir. Bu yöntem pek çok araştırmacı tarafından güvenilir ve duyarlı olarak bulunmuş ve doğrulama için doğrudan izolasyon sağlaması nedeni ile diğer gelişmiş analiz yöntemlerine göre de avantajlı olarak tanımlanmıştır [15].

Çalışmamızda farklı et örneklerinde *E. coli* O157:H7 varlığını test ederken immünomanyetik ayırma yönteminin çok daha başarılı ve daha hızlı olduğu belirlenmiştir.

Limberger ve arkadaşları, büyük çaplı ve su kaynaklı salgınlardan sorumlu *E. coli* O157:H7 ve *Campylobacter jejuni*'nin deteksiyonu, izolasyonu ve moleküler alt tiplendirmesi üzerine bir çalışma yapmışlar ve bu çalışmada *E. coli* O157:H7 deteksiyonu için immüno manyetik ayırma yöntemi ile beraber seçici katı besi ortamı olarak CT-SMAC'ı kullanmışlardır. Yapılan bu çalışmada zenginleştirme ortamından SMAC ve CT-SMAC besi ortamlarına direkt ekimler yapılmış ve buna paralel olarak aynı ortamlardan alınan 1 ml'lik örnekler immünomanyetik ayırım işleminden sonra CT-SMAC ortamına ekilmiştir. Sonuçta CT-SMAC ile beraber immünomanyetik ayırım yönteminin kombine kullanıldığı durum çok başarılı sonuçlar vermiştir. Limberger ve arkadaşları diğer çalışmalarından farklı olarak birinci zenginleştirme ortamından alınan örneğe immünomanyetik ayırım işlemi uyguladıktan sonra bu işlem görmüş örneği ikinci bir zenginleştirme ortamına almışlar ve bu ikinci zenginleştirme ortamındaki inkübasyondan sonra tekrar bir IMS işlemi uygulayıp CT-SMAC'a ekim yapmışlardır. İki zenginleştirme ortamı ve iki kere IMS uygulamasını içeren bu yöntem gayet başarılı bir şekilde hedef bakteri aranmasında kullanılmıştır [27]. Çalışmamızda bu kombine yöntemi uygulayarak başlangıçta tek IMS uygulaması ile negatif sonuç aldığımız bazı et örneklerinde aslında hedef bakterinin var olduğunu tespit edilmiştir. Bu açıdan bu yöntem tek IMS uygulamasına göre biraz daha uzun sürede sonuç verse de sonuçta daha güvenilir olması açısından tercih edilmesi gerekmektedir [27].

Moleküler temelli teknikler farklı yiyecek gruplarında patojenlerin tespiti amacıyla kullanılmaktadır. Özellikle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) süt ve süt ürünlerinde ve diğer gıdalarda *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* ve *Bacillus spp.*'nin deteksiyonu için başarıyla kullanılmaktadır [27].

Birçok besin elemanı hücre parçalamasına etkiyerek (örneğin DNA ekstraksiyonunda), nükleik asit degradasyonuna katkıda bulunarak ya da Taq DNA polimerazı inhibe ederek PCR için inhibitör haline gelebilmektedir [30].

Besinlerdeki insan patojenlerinin tespiti için nükleik asite dayalı hızlı yöntemler kullanılan DNA ya da RNA ekstraksiyonunun güvenilirliğine bağlıdır. McKillip ve arkadaşları [30], yaptıkları çalışmada süt tozu, yağsız süt, peynir ve peynir tozuna dilüye ederek *E. coli* O157:H7 aşılama ve DNA ekstraksiyonu amacıyla; (i) çözücü temelli prosedürü kullanarak direkt olarak yiyeceklerden ve (ii) önceki bakteri konsantrasyonlarından sonra guanidin izotiyosyanat (GITC) prosedürünü kullanmışlardır. Araştırmacılar her iki prosedürün DNA ekstraksiyonundaki etkililiği ve genel olarak PCR deteksiyon limitleri çalışılıp değerlendirilmiştir. PCR deteksiyon limitleri spesifik yiyeceklere bağlı olarak değişmekle birlikte  $10^1$  ile  $10^4$  koloni oluşturan birim/mililitre olarak belirlenmiştir.

Bizim çalışmamızda da PCR yardımıyla et örneklerinde *E. coli* O157:H7 varlığı araştırılmış ancak çoğu zaman spesifik PCR ürünleri elde edilememiştir. Yukarıda da belirtildiği gibi özellikle gıdalardaki patojenlerin aranmasında o gıda örneğinde bulunduğu varsayılan hedef bakteriye ait DNA'nın eldesi ve bunun template olarak PCR reaksiyonlarında kullanılabilmesi birçok olumsuz faktör tarafından engellenebilmektedir. Bu faktörlerin başında DNA ekstraksiyonu sırasında hücre parçalanmasına etkileri olan gıda bileşenleri ve Taq DNA polimerazı inhibe edebilen bileşenler sayılabilir. Yaptığımız pilot çalışmalardan birinde referans *E. coli* O157:H7 bakterimizden elde edilen DNA'dan bir miktar 25 gram et örneği eklenmiş ve bir süre bu şekilde beklemiş zenginleştirme ortam sıvısına katılmış ve bu sıvı daha sonraki işlemlerden sonra PCR'da template olarak kullanılmıştır. Ancak bu templateler hiçbir primerimiz ile spesifik ürün oluşmasına yol açmamıştır. Kısacası gıdanın bileşimindeki bazı değişken maddeler farklı durumlarda farklı sonuçlara neden olabilecek yapıdadırlar. Ayrıca PCR şartlarını tamamıyla optimize etmek uzun zaman almaktadır. Ayrıca pahalı bir teknik olarak sayılabilecek bu tekniğin mutlaka immünoyenetik ayırma yöntemiyle de desteklenmesi gereklidir. Çünkü IMS yöntemi sonunda hedef bakterinin kültürasyonu işlemi de gerçekleştirilmektedir.

PCR yönteminin *E. coli* O157:H7 aranmasında başarıyla kullanıldığı örnekler de mevcuttur. Son zamanlarda özellikle multipleks PCR adı verilen yöntem *E. coli* suşlarının belirlenmesinde kullanılabileceği ortaya konmuştur.



*E. coli*'nin birçok straini Shiga benzeri (stx) toksinleri de içeren güçlü toksinler üretmektedir. Shiga toksin üreten *E. coli* izolatları (STEC) insanlar için hastalık yapıcı olduğundan bunların hızlı bir şekilde belirlenmesi özellikle serolojik ve PCR gibi nükleik asitlere bağlı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Multipleks PCR primer çeşitlerinin tek tek primerlerin kullanıldığı PCR yöntemlerinden ve PCR-RFLP yöntemlerinden daha spesifik olduğu belirlenmiştir [34, 40, 41].

*E. coli* O157 ve O157 olmayan strainlerinin majör virülens faktörlerini kodlayan gen serilerine spesifik primerlerin kullanılması multipleks PCR yöntemini gayet etkili hale getirmekte ve bu sayede sonraki aşamalarda endonükleazlarla kesim adımına gerek duyulmamaktadır.

Sonuç olarak *E. coli* O157:H7 nin et ve et ürünlerindeki mevcudiyetinin belirlenmesinde immüno manyetik ayırma yönteminin CT-SMAC seçici ortamı ile birlikte kombine kullanımı oldukça güvenilir sonuçlar vermektedir. PCR ile de majör virülens faktörlerin varlığına yönelik testlerin yapılması yani multipleks PCR yönteminin kullanılması gıdalardaki PCR şartlarını olumsuz etkileyen bileşenlerin giderilmeye çalışılması yoluna gidilerek daha etken ve güvenilir hale getirilmesi gerekliliği ortadadır.

## 5. KAYNAKLAR

1. ANONYMUS, Report of WHO Consultation on "Shigalike toxin" Producing *E. coli*, With special Emphasis on Zoonotic Aspects, WHO/ CDS/ WHP/ 92, 103 WHO Report Giessen, Germany, 26 p., (1995).
2. KARAPINAR, M. ve GÖNÜL, Ş. A., *Gıda Kaynaklı Mikrobiyal Hastalıklar*, "Gıda Mikrobiyolojisi, Eds. A. Ünlütürk ve F. Turantaş, Mengi Tan Basımevi İzmir, 605 s" 109-164, (1998).
3. SZABO, R. A., TODD, E. C. D. ve JEAN, A., *Method to isolate Escherichia coli O157:H7 from food*, J. Food Prot., (49), 10, 78-772, (1986).
4. ÜNLÜTÜRK, A., Süt ve süt ürünlerinde mikrobiyolojik bozulmalar, patojen mikroorganizmalar ve muhafaza yöntemleri, "Gıda Mikrobiyolojisi, Eds. A. Ünlütürk ve F. Turantaş, Mengi Tan Basımevi İzmir, 605" 289-307, (1998).
5. TUNAIL, N. Mikrobiyal İnfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar. Alınmıştır, "Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, Sim Matbaacılık Ltd. Ankara, 522" 81-184, (2000).
6. MURINDA, S.E. ROBERTS, R.F. ve WILSON, R.A. *Evaluation of colicins For Inhibitopy Activity Againts Diarrheagenic E. coli Strains, Including Serotype O157:H7*. Appl. Envr. Micr. 62 (9) 3196-3202, (1996).
7. DOYLE, M.P., ZHAO, T., MENG, J. ve ZHAO, S. E. coli O157:H7 In Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Eds. M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville. ASM Press Washington D.C. 768 p". 171-191, (1997).
8. PARK S., WOROBO, R. ve DRUST, R. *E. coli O157:H7 As an Emerging Foodborne Pathogen: A Literature Review*. Critical Reviews in Food Sci and Nutrition 39(6)481-502, (1999).
9. OLSVIC, O., WASTESON, Y., LUND, A. ve HORNES, E. Pathogenic E.coli Found in Food. Int J Food Micr. 12: 103-114, (1991).
10. ÖZBAŞ, Y. ve AYTAÇ, A. *E. coli O157:H7 Epidomiyolojisi, Gıdalarla İlişkisi, patojenitesi ve İzolasyon Yöntemleri*. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 52(1)47-53, (1995).
11. ACHESON, D.W., *How does E. coli O157:H7 Testing in Meat Compare whit what We are Seeing Clinically* J Food Prot 63 (6) 819-821, (2000).

12. HALKMAN, A. K., NOVEIR, M. R. ve DOĞAN, H. B., *Escherichia coli O157:H7 serotipi*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, (2001).
13. CHALMERS, R. M., AIRD, H. ve BOLTON, F. J. *Waterborne E. coli O157* Suppl to J Appl Micro 87 (1)17, (1999).
14. CHALMERS, R. M., AIRD, H. ve BOLTON, F. J. *Waterborne Esherichia. coli O157*. Symp Ser Soc Appl Micro 29:124-132.,(2000).
15. CHAPMAN, P. A. *Sources of Esherichia. coli O157 and Experiences Over the Past Fifteen Years in Sheffield, UK*. Suppl to J Appl Micro 87 (1) 8, (1999).
16. CHAPMAN, P. A. *Sources of Esherichia. coli O157: and Experiences over the Past 15 Years in Sheffield, UK*. Symp Ser Soc Appl Micro 29:51-60, (2000).
17. DOYLE, P. *E. coli O157:H7 and its Significance in Foods*. Int J Food Micro 12: 289-302, (1991).
18. ANONYMOUS, *E. coli O157:H7*. [Http:// vm.cfsan. fda.. gov/mow.chap 15.html](http://vm.cfsan.fda.gov/mow.chap15.html).
19. PADHAYE, N. V. ve DOYLE, M. P. Rapid Procedure For Detecting Enterohemorrhagic *Esherichia coli O 157:H7* In Food. Appl Envr Micro 57(9) 2693-2698, (1991).
20. PERRY, M. B., BUNDLE, D. R., GIDNEY, M. A. ve LIOR, H. Identification of *Esherichia coli* Serotype O157 Strains by Using a Monoclonal Antibody . J Clin Micro 26(11)2391-2394,(1998).
21. THOMPSON, J. S., HODGE, D.S. ve BORCZYK, A.A. Rapid Biochemical Test to Identify Verocytotoxin-Positive Strains of *Esherichia. coli* Serotype O157. J Clin Micro 28(10) 2165-2168, 1990.
22. DOYLE, M.P. ve SCHOENI. J.L. *Survival and Growth Characteristics of Esherichia coli Associated whit Hemorrhagic Colits*. Appl Envr Micro 48(4)855-856, (1984).
23. HALKMAN, A.K., YILMAZ, I., NOVEIR, M.R. ve ERDAL, N.*Koli Basili O157:H7* Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi 29(10) 96-99, (1996).
24. BOER, E. D. ve HEUVELINK, A.E. *Methods for the Detection and Isolation of Shiga Toxin-Producing Esherichia coli*. Symp Ser Appl Micro 29:133-143, (2000).
25. DUFFY, G., WHITING, R. C. ve SHERIDAN, J. J. *The Effect of Competitive Microflora, pH and Temperature on the Growth Kinetics of Esherichia coli O157:H7*. Food Micro 16:299-307., (1999).
26. BOER, E. D. *Methods for Shiga toxin-producing Esherichia coli* Suppl to J Appl Micro 87(1) 19, (1999).

27. BOPP D. J., SAUDERS B. D., WALLACE B. J., KELLY M., MORSE D. L. ve LİMBERGER R. J., *Detection, isolation and molecular subtyping of E. coli O157:H7 and Campylobacter jejuni associated with a large waterborne outbreak*, J. of Clinical Mic.,(41), 1,. 174-180, (2003).
28. TAMER, A. Ü., UÇAR, F., ÜNVER, E., KARABOZ, İ., BURSALIOĞLU, M., ve OĞULTEKİN, R., *Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, Anadolu Üniversitesi Eğitim, Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No. 74, Eskişehir, (1989).
29. TEMİZKAN, G., ARDA, N., *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Nobel Tıp Kitap Evi, p. 26-28; 34-39, (1999).
30. MCKILLIP J. L., JAYKUS L. A. ve DRAKE M. A., *A comparison of methods for the detection of E. coli O157:H7 from artificially-contaminated dairy products using PCR*, Journal of Applied Microbiology, 89, 49-55, (2000).
31. YU K., MELISSA C. N., DOUGLAS D. A.ve HAMILTON-KEMP T. R., *Survival of E. coli O157:H7 on strawberry fruit and reduction of pathogen population by chemical agents*, Journal of Food Protection (64), 9, 1334-1340, (2001).
32. NOVEIR, M. R., DOĞAN, H. B.ve HALKMAN A. K., *A note on E. coli O157:H7 serotype in Turkish meat products*, Meat Science 56, 331-335, (2000).
33. CHINEN I., TAMARO J. D., LOUND L.H., LEDRI S. ve RIVAS M., *Isolation and characterization of E. coli O157:H7 from retail meats in Argentina*, Journal of Food Protection, (65), 9, 1346-1351, (2001).
34. CALL, R. DOUGLAS, BROCKMAN, J. F. ve CHANDLER, P. D., *Detecting and genotyping Escherichia coli O157:H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays*, International Journal of Food Microbiology, 67, 71-80, (2001).
35. RADU S., LING, O. W., RUSUL, G. ve KARIM, M. I. A., *Detection of E. coli O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses*, J. of Microbiological Methods, 46, 131-139, (2001).
36. VIOLA,D.G. ve LOPEZ, D., *Numerical Analysis of Electrophoretic Periplasmic Protein Patterns, a Possible Marker System for Epidemiologic Studies*, Journal of Clinical Microbiology, 28, 1, 136-139, (1990).
37. BRADFORD MM, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal Biochem. ;72:248-54, (1976).

38. KANG D., BARKOCY-GALLAGHER G. A., KOOHMARAIE M. ve SIRAUUSA G. R., *Screening bovine carcass sponge samples for E. coli O157 using a short enrichment coupled with Immunomagnetic separation and Polymerase Chain Based (BAX) detection step*, J. of Food Prot., (64), 10, p.1610-1612, (2001).
39. RONNER, A. B. ve D. O. CLIVER.. *Isolation and characterization of a coliphage specific for Escherichia coli O157:H7*, J. Food Prot. 53:944-947, 1990.
40. PATON W. A. ve PATON J. C., *Detection and characterization of Shiga toxigenic Escherichia coli by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, Enterohemorrhagic E. coli hlyA, rfbO111 and rfb O157*, J. of Clin. Microb.,Feb., .598-602, (1998).
41. DAVIS M. A., HANCOCK D. D., BESSER T. E. ve CALL D. R., *Evaluation of Pulse-Field Gel Electrophoresis the degree of genetic relatedness between strains of E. coli O157:H7*, J. of Clin. Mic., May , 1843-1849, (2003).